



ΜΠΕΝΑΚΕΙΟ
ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΙΤΛΟΣ

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ
ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΖΩΑ ΣΥΝΤΡΟΦΙΑΣ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΑΙΦΝΙΔΙΟΥΣ
ΘΑΝΑΤΟΥΣ**

ΜΙΧΑΛΟΠΟΥΛΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2024



ΜΠΕΝΑΚΕΙΟ
ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY
MASTER OF SCIENCE
“TOXICOLOGY”**

MASTER OF SCIENCE DEGREE

TITLE

**DETECTION OF AGRICULTURAL PESTICIDES AND OTHER
CHEMICAL COMPOUNDS IN PETS AFTER SUDDEN DEATH**

PANAGIOTA MICHALOPOULOU

LARISSA 2024



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΙΤΛΟΣ

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ
ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΖΩΑ ΣΥΝΤΡΟΦΙΑΣ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΑΙΦΝΙΔΙΟΥΣ
ΘΑΝΑΤΟΥΣ**

ΜΙΧΑΛΟΠΟΥΛΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ

Αριθμός Γενικού Μητρώου:

Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων στο
Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΣΙΩΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΚΑΣΙΩΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Χημικός - Ερευνητής Α', Εργαστήριο Τοξικολογικού
Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο

ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, Καθηγητής Φυσιολογίας – Τοξικολογίας, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΤΣΙΚΟΥ ΔΑΝΙΕΛΑ, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας
Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Copyright © Μιχαλοπούλου Παναγιώτα, 2024

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των απαιτήσεων του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η έγκρισή της δεν υποδηλώνει απαραίτητως και την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος Βιοχημείας Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποσκοπεί σε μια εμπειριστατωμένη προσέγγιση -μελέτη αιφνίδιων θανάτων ζώων συντροφιάς στην Ελλάδα, σε υποψία λήψης γεωργικών φαρμάκων (δηλητηρίαση). Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε νέα μέθοδος υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας LC-ESI-MS στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των πιο συχνών ομάδων γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη δηλητηρίαση ζώων συντροφιάς στη χώρα μας, βάση δεδομένων προηγούμενων ετών.

Από την ταυτόχρονη ανάλυση δειγμάτων στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο και στο Εργαστήριο Τοξικολογίας, του Τμήματος Τοξικολογίας, Καταλοίπων και Περιβαλλοντικών Ρυπαντών της Δ/σης του Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών βγήκαν σαφή και ασφαλή συμπεράσματα για την δηλητηρίαση ζώων συντροφιάς από γεωργικά φάρμακα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον ερευνητή Α' Δρ. Κωνσταντίνο Κασιώτη, επιστημονικό συνεργάτη του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας που ανέλαβε την επίβλεψη της παρούσας εργασίας, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και την πολύτιμη επιστημονική του καθοδήγησή σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Ευχαριστίες για τη συνεισφορά τους κατά την πορεία εκπόνησης αυτής της μελέτης εκφράζω και στα δύο άλλα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής.

Ξεχωριστές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στη κ. Ευσταθία Βουζαζάκη για την άνογη συνεργασία μας και την ανεκτίμητη βοήθεια τόσο στο πειραματικό μέρος της εργασίας μου όσο σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης.

Στο σημείο αυτό οφείλω να αναφερθώ σε όλο το επιστημονικό προσωπικό του Εργαστηρίου Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο κυρίως στην Κα Ηλέκτρα Κάργα που μου προσέφεραν γνώση και αμέριστη καθοδήγηση.

Κλείνοντας, θα ήθελα να αφιερώσω το πόνημα στο σύζυγο μου, που στις πολλές δύσκολες στιγμές, δεν έπαψε να μου συμπαραστέκεται και να με εμπνέει για την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας και να με εμπνέει για την κατάκτηση νέων στόχων.

Βεβαιώνω ότι η παρούσα διπλωματική εργασία είναι αποτέλεσμα δικής μου δουλειάς και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής. Στις δημοσιευμένες ή μη δημοσιευμένες πηγές που αναφέρω έχω χρησιμοποιήσει εισαγωγικά όπου απαιτείται και έχω παραθέσει τις πηγές τους στο τμήμα της βιβλιογραφίας.

Υπογραφή:.....

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1. ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΙΣ ΣΤΑ ΖΩΑ.....	1
1.1. Δηλητηρίαση – Ιστορική αναδρομή.....	1
1.2. Η Επιστήμη που μελετά τις δηλητηριάσεις- Τοξικολογία	3
1.2.1. Γενικά – Ορισμός και χρησιμότητα	3
1.2.2. Πεδία Τοξικολογίας	3
1.3. Η έννοια του δηλητηρίου – Η δηλητηρίαση	5
1.4. Τοξικότητα	6
1.4.1. Δόση.....	6
1.4.2. LD50	7
1.4.3. Οδοί εισόδου τοξικής ουσίας στον οργανισμό.....	8
1.5. Μορφές Δηλητηρίασης	10
1.6. Αίτια Δηλητηρίασης.....	11
1.7. Η Ανάπτυξη της Κτηνιατρικής Τοξικολογίας.....	11
1.7.1. Κτηνιατρική Τοξικολογία και Δημόσια Υγεία.....	12
1.7.2. Διάγνωση των δηλητηριάσεων στα ζώα	13
1.7.3. Κτηνιατρική Αναλυτική Τοξικολογία.....	13
1.7.4. Κτηνιατρική Τοξικολογία Στην Ελλάδα	13
1.7.5. Ο Ρόλος της Κτηνιατρικής Τοξικολογίας	14
2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ.....	15
2.1. Εισαγωγή.....	15
2.2. Οργανική χημική ανάλυση.....	18
2.2.1. Εισαγωγή.....	18
2.2.2. Φασματομετρία UV-Vis.....	18
2.2.3. Χρωματογραφία	19
2.2.4. Φασματομετρία μαζών (MS).....	28
2.2.5. Παρασκευή δείγματος για οργανική ανάλυση	29
2.3. Επικύρωση μεθόδων	32
2.3.1. Δειγματοληψία	32
2.3.2. Ανάλυση δειγμάτων	33
2.3.3. Παράμετροι αξιολόγησης.....	36
3. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΟΞΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	39
3.1. Παρασιτοκτόνα – Κατηγορίες ανάλογα με τη χρήση τους	41
3.2. Παρασιτοκτόνα – Κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό τοξικότητας.....	41

3.3.	Οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα	43
3.3.1.	Τρόπος δράσης	43
3.3.2.	Τοξικότητα-Κλινική εικόνα-Διάγνωση-Θεραπεία	45
3.4.	Καρβαμιδικά παρασιτοκτόνα	46
3.4.1.	Γενικά	46
3.4.2.	Τρόπος δράσης	46
3.4.3.	Τοξικότητα-Κλινική εικόνα-Διάγνωση-Θεραπεία	46
3.5.	Οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα	48
3.5.1.	Γενικά	48
3.5.2.	Κατηγορίες οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων	48
3.5.3.	Τρόπος δράσης οργανοχλωριωμένων	48
3.5.4.	Κλινικές ενδείξεις	49
3.6.	Πυρεθροειδή	49
3.6.1.	Κλινικές ενδείξεις-θεραπεία	51
3.7.	Ζιζανιοκτόνα	51
3.8.	Τρωκτικοκτόνα	54
3.8.1.	Αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα	54
3.8.2.	Μη αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα	55
3.9.	Βαρέα μέταλλα	58
3.9.1.	Χαλκός	58
3.9.2.	Μόλυβδος	58
3.9.3.	Αρσενικό	59
3.10.	Κυανιούχα	60
3.11.	Κοχλιοκτόνα- μαλακιοκτόνα	61
B.	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	63
1.	ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	63
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	65
2.1.	Αντιδραστήρια	65
2.1.1.	Πρότυπες ουσίες	65
2.1.2.	Διαλύτες και Χημικά	65
2.1.3.	Διαλύματα	65
2.2.	Εργαστηριακά σκεύη & Αναλώσιμα	66
2.3.	Όργανα & Διατάξεις	66
2.4.	Αναλυτικές μέθοδοι	67
2.4.1.	Παραλαβή δείγματος	68
2.4.2.	Διαδικασίες τοξικολογικής εργαστηριακής διερεύνησης	68

2.4.3.	Οργανοληπτικός έλεγχος.....	69
2.4.4.	Ανίχνευση φυτοπροστατευτικών και τρωκτικοκτόνων με LC-ESI/MS.....	72
2.4.5.	Ανάπτυξη και Βελτιστοποίηση Αναλυτικής Μεθόδου	74
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	78
3.1.	Αποτελέσματα Επικύρωσης.....	78
3.1.1.	Εκλεκτικότητα.....	78
3.1.2.	Προσδιορισμός ορίων	79
3.1.3.	Γραμμικότητα & Καμπύλη Βαθμονόμησης.....	79
3.2.	Είδη δειγμάτων και Περιοχή μελέτης	79
3.2.1.	Κατηγορίες δραστικών ουσιών	80
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	84
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	92
	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	92
	ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ.....	94

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Τιμές LD50 σε μερικούς αντιπροσωπευτικούς χημικούς παράγοντες (Eaton & Gilbert 2008)	7
Πίνακας 1.2: Παραδείγματα ουσιών και θανατηφόρος δόση ανάλογα με το βαθμό τοξικότητάς τους (Daunoras 2012).	7
Πίνακας 3.1: Κατηγορίες παρασιτοκτόνων ανάλογα με το βαθμό τοξικότητας που καθορίζεται από τη θανατηφόρα δόση της ουσίας (LD50), καθώς και ο τρόπος που εκτίθεται το σώμα στην ουσία αυτή (Hock 2016).	42
Πίνακας 3.2: Κατηγορίες φυτοπροστατευτικών σύμφωνα με τη χημική δομή (Jarayaj et al. 2016).....	42
Πίνακας 3.3: Τοξικότητα καρβαμιδικών παρασιτοκτόνων σε ομάδες ζώων (Fishel 2005)	47
Πίνακας 3.4: Τοξικότητα πυρεθροειδών (Ensley 2007).....	50
Πίνακας 3.5: Κατηγορίες ζιζανιοκτόνων ανάλογα με τη τοξικότητα τους σύμφωνα με τον ΠΟΥ (Πηγή: Gupta 2007).	53
Πίνακας 3.6: Τοξικότητα διπυρολικών ζιζανιοκτόνων σε διάφορα είδη ζώων (Πηγή: Lorgue et al. 1996).	54

Πίνακας 3.7: Τύποι και χημικές ομάδες Rodenticide (Rodenticides, n.d.)	57
Πίνακας 3.8: Κατάταξη Οξείας Τοξικότητας – Τρωκτικοκτόνα (Rodenticides, n.d.)	57
Πίνακας 3.9: Τοξικότητα κυανίου σε διαφορετικές δόσεις και χρονικό διάστημα μεταξύ έκθεσης και θανάτου	61
Πίνακας 2.1: Δραστικές ουσίες και προμηθευτής (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ).....	65
Πίνακας 2.2: Αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση ομάδων τοξικών ουσιών (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ)	67
Πίνακας 2.3: Συχνότερα απαντημένες τοξικές ουσίες, χαρακτηριστικά ιόντα, που ανιχνεύτηκαν στο εργαστήριο Τοξικολογίας στο GC-MS (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ).....	71
Πίνακας 2.4: Βαθμωτό Πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών LC- ESI-MS (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ)	73
Πίνακας 2.5: Δραστικές ουσίες που αναλύθηκαν, R/T και LOQ (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ) ..	73
Πίνακας 2.6: Παράμετροι Φασματογράφου Μάζας (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ)	74
Πίνακας 3.1: Δραστικές και ανακτήσεις τους σε διάφορες συγκεντρώσεις(ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ)	78
Πίνακας 3.2: Τοξικές Ουσίες που ανιχνεύτηκαν στα ύποπτα δείγματα (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ)	81

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2.1 : Σχηματικό διάγραμμα ποσοτικής φασματοφωτομετρίας (Κουμπάρης 2016)..	19
Εικόνα 2.2: Ανάλυση διαφόρων ουσιών με υγρή ή αέρια χρωματογραφία βάσει της πτητικότητας και πολικότητας αυτών (Steed, 2007).....	21
Εικόνα 2.3: Διάγραμμα ροής Χρωματογράφου HPLC (Πηγή: Ηλεκτρονικές σημειώσεις Κουμπάρης 2011)	22
Εικόνα 2.4: Διαφορετική εμφάνιση κορυφών κατά την ισοκρατική και Gradient έκλουση (Πηγή: Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC) Courtesy of Agilent Technologies, Inc).	23
Εικόνα 2.5: Χρωματογράφημα (Πηγή: ηλεκτρονικές σημειώσεις Κουμπάρης, Κεφ. 20 Β Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) 2011).....	25
Εικόνα 2.6: Χρωματογράφημα HPLC-FLD Εργαστηρίου	25
Εικόνα 2.7: Σχηματική παράσταση Αέριος χρωματογραφία/ Φασματογραφία/ Βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (GC/MS/EI) (Dunnivant & Ginsbach 2008).....	27

Εικόνα 2.8: Χρωματογράφημα GC-MS Εργαστηρίου.....	28
Εικόνα 2.9: Μέθοδοι και τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα στην Κτηνιατρική Τοξικολογία (Filigenzi 2018)	29
Εικόνα 2.10: Οι παραλλαγές της μεθόδου QuEChERS. (Lehotay et al 2010).....	31
Εικόνα 3.1: Επίδραση της ακετυλοχολίνης από καρβαμιδικά και οργανοφωσφορικά στις νευρομυϊκές συνάψεις. (Timchalk 2006)	43
Εικόνα 3.2: Χημική δομή οργανοφωσφορικών ουσιών. Αριστερά: παρασιτοκτόνα, δεξιά: νευρικοί παράγοντες. (Jacquet et al. 2016)	45
Εικόνα 3.3: Χημική δομή πυρεθροειδών (Ensley 2007)	50
Εικόνα 3.4: Χημική δομή Diquat, Paraquat (Gupta 2007).....	52
Εικόνα 2.1: Χρωματογραφική κορυφή και τα χαρακτηριστικά ιόντα του καρβαμιδικού φυτοπροστατευτικού Methomyl.	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 3.1: Σύνολο ύποπτων βιολογικών δειγμάτων ανά είδος ζώου που αναλύθηκαν	80
Γράφημα 3.2: Αναλογία θετικών δειγμάτων και ύπαρξη 2 δραστικών ουσιών.....	82
Γράφημα 3.3: Ομάδες δραστικών ουσιών ανάλογα με είδος ζώου και δολωμάτων.....	82
Γράφημα 3.4: Ποσοστό δραστικών ουσιών που ανιχνεύθηκαν	83

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

PMR	:	postmortem redistribution of xenobiotics
AAS	:	Atomic absorption spectrometry /φασματοσκοπία Ατομικής απορρόφησης
UV/VIS	:	ultra violet /φασματομετρία υπεριώδους – ορατού
IC	:	ion chromatography/ Χρωματογραφία ιόντων
GC	:	Gas Chromatography /αέρια χρωματογραφία
FI-AAS	:	flame atomic absorption spectrometry
ICP-AES	:	inductively coupled plasma atomic emission spectrometry
MS	:	mass spectrometry
HPLC	:	High-performance liquid chromatography
RPC	:	Reversed-Phase Liquid Chromatography
AA	:	Ατομική Απορρόφηση
ELISA	:	enzyme-linked immunosorbent assay
ECD	:	electron capture detector /Ανιχνευτής δέσμησης ηλεκτρονίων
FID	:	flame ionization detector /Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας
PAD	:	pulsed amperometry detector
ESI	:	Electron Spray Ionization
QCMM	:	quartz crystal mass monitors.
DAD	:	Diode array Detector (DAD)
TLC	:	thin layer chromatography /χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
SFC	:	supercritical fluid chromatography
QqQ	:	Τριπλός τετράπολος αναλυτής
RP	:	Reversed-Phase /αντίστροφης φάσης
LOD	:	limit of detection /όριο ανίχνευσης
AChE	:	ακετυλοχολινεστεράση
HCN	:	υδροκυάνιο
DTNB	:	dithiobisnitro – benzoate
Rt	:	retention time
LLE	:	Υγρή εκχύλιση υγρών (Liquid-liquid extraction)
SPE	:	Εκχύλιση στερεάς φάσης
QuEChERS	:	Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
Π.Ε.	:	Περιφερειακή Ενότητα
ΥΠΑΑΤ	:	Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων

Δ/νση : Διεύθυνση
Υ.Α. : Υπουργική Απόφαση
Κ.Υ.Α. : Κοινή Υπουργική Απόφαση
LD50 : lethal dose
ΟΡ : Οργανοφωσφορικά
HRAMS : High-resolution, accurate mass spectrometry
LC-ESI-MS : Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry
ΥΠΕΝ : Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας της Ελλάδος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι δηλητηριάσεις ζώων, τυχαίες ή εσκεμμένες, στοχευμένες ή μη, εξακολουθούν να αποτελούν διαδεδομένο φαινόμενο στην Ελλάδα, παρά το νομικό πλαίσιο για την ευζωία των ζώων που θεσπίστηκε το 2012 (4038/2012) και του Νόμου 4830/2021. Η δηλητηρίαση είναι μορφή κακοποίησης και διώκεται ποινικά με βαρύτατες κυρώσεις καθιστώντας το ρόλο της Κτηνιατρικής Τοξικολογίας ιδιαίτερα σημαντικό.

Η παρούσα μελέτη ασχολείται με την ανάπτυξη νέας μεθόδου υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας LC-ESI-MS στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο για την ανίχνευση των πιο συχνών ομάδων γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη δηλητηρίαση ζώων συντροφιάς στη χώρα μας, βάση δεδομένων προηγούμενων ετών. Επίσης συμπεριελήφθησαν και άλλες ομάδες ουσιών όπως πυρεθρίνες, νικοτινοειδή, στρυχνίνη, μεταλδεϋδή και αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα πρώτης και δεύτερης γενιάς καθώς έγινε και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Κατά την ανάπτυξη της νέας μεθόδου σε LC-ESI-MS μετά την εφαρμογή αρκετών πειραματικών πρωτοκόλλων επιλέχθηκε το πιο εύχρηστο, αξιόπιστο για το σύνολο των εξεταζόμενων δραστικών ουσιών, οικονομικό με ικανοποιητικά αποτελέσματα στο πλαίσιο της Κτηνιατρικής Τοξικολογίας.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τοξικολογικών αναλύσεων 70 πραγματικών βιολογικών δειγμάτων ζώων συντροφιάς με υποψία δηλητηρίασης και δολωμάτων. Τα δείγματα επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν και με αέριο χρωματογράφο-φασματογράφου μάζας στο Εργαστήριο Τοξικολογίας, του Τμήματος Τοξικολογίας, Καταλοίπων και Περιβαλλοντικών Ρυπαντών της Δ/σης του Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών, του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων και με το νέο πειραματικό πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε σε υγρή χρωματογραφία φασματογράφου μάζας, στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο. Τα δείγματα προέρχονται από όλες τις Περιφέρειες της Ελλάδας και σταλθήκαν μέσω Αγροτικών Κτηνιατρείων, Τμημάτων Κτηνιατρικής των Περιφερειών, Δήμων και Αστυνομικών Αρχών και Δασαρχείων κατά το έτος 2023.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν το φαινόμενο που επικρατεί στην Ελλάδα αλλά και στις υπόλοιπες μεσογειακές χώρες επί δεκαετίες, ήτοι η χρήση απαγορευμένων και μη

γεωργικών φαρμάκων -φυτοπροστατευτικών, μεγάλης τοξικότητας και σε μεγάλες συγκεντρώσεις.

Τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν την πιο συχνή αιτία δηλητηρίασης με τα καρβαμιδικά παρασιτοκτόνα να ανιχνεύονται σε ποσοστό 51,6% για δείγματα σκύλων, 28,58% για δείγματα γατών, ενώ στα δολώματα το ποσοστό είναι 70% και τα κουμαρινικά παράγωγα 2ης γενιάς σε ποσοστό 64% σε σκύλους 14,2% σε γάτες και 30% σε δολώματα. Η ανίχνευση σε αρκετά βιολογικά δείγματα 2 τουλάχιστον ομάδων δραστικών ουσιών, συνηγορεί στην εξέταση των δειγμάτων ταυτόχρονα με πολλαπλές μεθόδους και ανιχνευτές ώστε να αυξάνεται το εύρος των ανιχνεύσιμων ουσιών.

Η ανίχνευση φυτοπροστατευτικών ουσιών που έχουν απαγορευτεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση εδώ και πολλά χρόνια, συνηγορεί στην ανάγκη πιο εντατικών ελέγχων για την παράνομη διακίνηση φυτοφαρμάκων.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: δηλητηριάσεις ζώων, τοξικότητα, γεωργικά φάρμακα

ABSTRACT

Animal poisoning, accidental or deliberate, is still a widespread phenomenon in Greece, despite the legal framework introduced in 2012 and 4830/2021 with criminal sanctions against perpetrators. Poisoning is a form of abuse and is prosecuted with severe penalties making the role of Veterinary Toxicology of great importance.

The study presents the development of a new LC-ESI-MS liquid chromatography-mass spectrometry method at the Laboratory of Toxicological Control of Agricultural Chemicals at the Benakeio Phytopathological Institute for the detection of the most frequent groups of pesticides used to poison companion animals in our country, based data from previous years. Other groups of substances such as pyrethrins, nicotinoids, strychnine, metaldehyde and anticoagulant rodenticides were also included as the results were quantified.

During the development of the new method in LC-ESI-MS after the application of several experimental protocols, the most easy-to-use, reliable for all the examined active substances in all matrix, economical with satisfactory results in the context of Veterinary Toxicology was chosen.

The present study also presents and investigates the results of toxicological analysis of animal biological samples and baits. The samples were processed and analyzed with a gas chromatograph-mass spectrometer in the Toxicology Laboratory, of the Department of Toxicology, Residues and Environmental Pollutants of the Administration of the Veterinary Center of Athens, of the Ministry of Rural Development and Food and with the new experimental protocol developed in liquid chromatography at the Benakeio Phytopathological Institute. The samples come from all the Regions of Greece and were sent through Rural Veterinary Clinics, Veterinary Departments of the Regions, Municipalities and Police Authorities and Forestry Departments in the year 2023.

The results confirm the phenomenon that prevails in Greece but also in the rest of the Mediterranean countries for decades, namely the use of prohibited and non pesticides, of high toxicity and in high concentrations.

Plant protection substances - agricultural drugs are the most frequent cause of poisoning with carbamate pesticides being detected in 51.6% for dog samples, 28.58% for cat samples, while in baits the percentage is 70% and 2nd generation coumarin derivatives 64% in dogs, 14.2% in cats and 30% in baits. The detection in several biological samples

of at least 2 groups of toxic substances advocates the examination of the samples simultaneously with multiple methods and detectors to increase the range of detectable substances.

The detection of plant protection substances that have been banned by the European Union for many years advocates the need for more intensive monitoring on the illegal trafficking of pesticides.

KEY WORDS: animal poisoning, toxicity, pesticides

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΙΣ ΣΤΑ ΖΩΑ

1.1.Δηλητηρίαση – Ιστορική αναδρομή

Το δηλητήριο συχνά αναφέρεται ως “το όπλο του δειλού”, καθώς η χρήση του για τη δολοφονία ανθρώπων γίνεται προσχεδιασμένα και εν γνώσει του χρήστη ότι το άτομο που θα το καταναλώσει τις περισσότερες φορές θα υποφέρει καθώς πεθαίνει. Όμως, η έννοια του δηλητηρίου από μόνη της είναι μια διφορούμενη έννοια, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις οι ίδιες ουσίες που μπορούν να προκαλέσουν το θάνατο σε ένα άτομο, παράλληλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικούς σκοπούς σε άλλο. Αυτή η παράμετρος που διαφοροποιεί το εκάστοτε αποτέλεσμα είναι η ποσότητα που χορηγείται. Ένα τυπικό παράδειγμα που χρησιμοποιείται εδώ για να τονιστεί πόσο σημαντική είναι η ποσότητα κάθε ουσίας που καταναλώνεται είναι το αλάτι. Σε μικρές ποσότητες είναι απαραίτητο για τη ζωή, όμως μια εφάπαξ υπερβολική δόση φέρνει το θάνατο. Ιστορική η ρήση από τον Παράκελσο τον 15ο αιώνα, όπου αναφέρεται ότι “η δόση είναι που διαχωρίζει το φάρμακο από το δηλητήριο” (Παπαδόπουλος 2015). Το ίδιο επισημαίνει και ο γνωστός τοξικολόγος του 19ου αιώνα Alfred Swaine Taylor “ένα δηλητήριο σε μικρές δόσεις είναι φάρμακο, και ένα φάρμακο σε μεγάλες δόσεις είναι δηλητήριο” (Holdsworth et al. 2001).

Είναι γνωστό από αρχαιολογικά ευρήματα ότι οι αρχέγονοι άνθρωποι γνώριζαν τις ιδιότητες των δηλητηρίων. Έχει βρεθεί ότι χρησιμοποιούνταν στα όπλα τους για να γίνονται πιο αποτελεσματικά στο κυνήγι ζώων και για να αντιμετωπίσουν τον εχθρό. Έχουν βρεθεί δείγματα τέτοιων επιβλαβών ουσιών, όπως η τουβοκουραρίνη, πάνω σε όπλα. Η ουσία αυτή αποτελεί ανταγωνιστή στις νευρομυικές συνάψεις και μπλοκάρει τους νικοτινικούς χολινεργικούς υποδοχείς, εμποδίζοντας τη σύνδεση της ακετυλοχολίνης σε αυτούς. Τα ευρήματα αυτά φαίνεται να έμεναν μυστικά ανάμεσα στα άτομα της φυλής, ενώ πρόσβαση είχαν μόνο τα πιο σημαντικά και πνευματικά άτομα στη φυλή (Holdsworth et al. 2001).

Η χρήση ουσιών ως θεραπευτικές είναι ήδη καταγεγραμμένη από αρχαίους χρόνους. Ένα από τα παλαιότερα ευρήματα αποτελεί ο πάπυρος του Ebers, ο οποίος χρονολογείται στα 1550 π.Χ. στην Αίγυπτο και αποτελεί ένα ιατρικό συνταγολόγιο για την αντιμετώπιση

διαφόρων παθήσεων, από καρκίνο μέχρι ψυχιατρικές διαταραχές όπως η κατάθλιψη. Περιλαμβάνει πληροφορίες για διάφορα δηλητήρια, π.χ. ακόνιτο, όπιο, βαρέα μέταλλα (μόλυβδος, χαλκός), ακόμη και για τη δακτυλίτιδα, τα αλκαλοειδή Atropa, κ.ά. Γνώριζαν επίσης τη δράση του κωνίου και διαφόρων δηλητηρίων ζωικής προέλευσης (Νιώπας 2016).

Αναφορές για τη χρήση δηλητηρίων επίσης καταγράφονται και από την αρχαία Μεσοποταμία με τη θεά Gula, θεά της ίασης και προστατίδα των γιατρών, όπου καταγράφονται κείμενα που τη συσχετίζουν με δηλητήρια (Holdsworth et al. 2001).

Οι αρχαίοι Έλληνες, επίσης χρησιμοποιούσαν διάφορα σκευάσματα για τη θεραπεία ασθενειών και την ανακούφιση συμπτωμάτων. Όμως, ο όρος “φάρμακο” είχε και διαφορετική σημασία στην αρχαία ελληνική σε σχέση με σήμερα, είχε και την έννοια του δηλητηρίου. Γνωστοί είναι οι πλατωνικοί διάλογοι στους οποίους το κώνειο που πίνει ο Σωκράτης στη θανατική του καταδίκη αναφέρεται με τον όρο “φάρμακον” (Παπαδόπουλος 2011). Άλλες αναφορές βρίσκουμε στον Όμηρο, όπου στην Ιλιάδα χρησιμοποιούνται δηλητηριασμένα βέλη (Ομήρου Ίλιάς – Ραψωδία Ο). Ο Ιπποκράτης (400 π.Χ.) ταξινομήσε τα δηλητήρια και έθεσε τις βάσεις της Κλινικής Τοξικολογίας.

Ο Διοσκουρίδης (50 μ.Χ.), μεγάλος φαρμακολόγος και βοτανολόγος της αρχαιότητας, αναφέρεται στα βιβλία του, σε δηλητηριώδη φυτά, όπως και σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Θεωρεί ότι το κώνειο, όταν το πει κάποιος, προκαλεί σκοτοδίνη, απώλεια όρασης και ψυχικές διαταραχές, ενώ του αποδίδει και θεραπευτικές ιδιότητες (Διοσκουρίδης 2006). Γνωστός γιατρός, ο Ιμπίν Μαϊμόν (Ραβί Μωυσής Μαϊμονίδης, 1135-1204), στα 10 ιατρικά βιβλία που έγραψε, γίνεται η πρώτη καταγραφή και περιγραφή του άσθματος. Μέσα στα κείμενά του αναφέρονται θεραπευτικές αντιμετώπισεις των δηλητηριάσεων από δαγκώματα εντόμων, φιδιών και λυσσασμένων σκύλων. Περιέγραψε επίσης το αντικείμενο της “βιοαπορρόφησης” και αναφέρει ως συνταγή για βραδύτερη απορρόφηση ενός δηλητηρίου, την κατανάλωση γάλακτος, βουτύρου και κρέμας (Gallo 2008). Ο Ellenbong (1480) εισάγει την Αρχή της Επαγγελματικής Τοξικολογίας από μόλυβδο (Pb) και υδράργυρο (Hg). Σε επιστημονικό επίπεδο, ο Orfila (1787-1853) θεωρείται ο πατέρας της Ιατροδικαστικής Τοξικολογίας και εισάγει την Αρχή της Αναλυτικής Τοξικολογίας (ανίχνευση δηλητηρίου σε βιολογικά υγρά).

Το 1961 αναγνωρίζεται η Τοξικολογία ως αυτόνομη επιστήμη.

1.2. Η Επιστήμη που μελετά τις δηλητηριάσεις- Τοξικολογία

1.2.1. Γενικά – Ορισμός και χρησιμότητα

Η Τοξικολογία είναι η επιστήμη που μελετά τις αρνητικές επιδράσεις τοξικών ουσιών στους ζωντανούς οργανισμούς. Αναλυτικά ασχολείται με τη μελέτη των τοξικών ουσιών, την προέλευση και τις ιδιότητες τους, τους μηχανισμούς δράσης, τις μεθόδους ανίχνευσης και προσδιορισμού τους, αποτίμηση των κινδύνων που απορρέουν από τη χρήση τους καθώς και τη θεραπεία, ενώ παράλληλα προτείνει μέτρα προφύλαξης και πρόληψης από τις βλαβερές δράσεις τους. Ένας τοξικολόγος έχει εκπαιδευτεί για να εξετάζει τη φύση αυτών των παρενεργειών (σε επίπεδο, μοριακό, κλινικό και βιοχημικό) και εκτιμά την πιθανότητα εμφάνισής τους κατά περίπτωση. Θεμελιώδες στοιχείο σε αυτή τη διαδικασία αποτελεί η συσχέτιση της δόσης στην οποία εκτίθεται το υποκείμενο σε σχέση με την επίδρασή της σε αυτό. Στη σημερινή κοινωνία, είναι απαραίτητο να υπάρχει ιδιαίτερη εξειδίκευση πάνω στον τομέα αυτόν, καθώς οι χημικές ουσίες στις οποίες εκτιθέμεθα καθημερινά λόγω του τρόπου ζωής στο σύγχρονο κόσμο είναι πολλές και ποικίλες (Eaton & Gilbert 2008).

1.2.2. Πεδία Τοξικολογίας

Αν και ιστορικά η Τοξικολογία δημιουργήθηκε από την Ιατρική, σήμερα αναφέρεται σε πάρα πολλές επιστήμες και τοξικολόγοι είναι επιστήμονες από πολλούς διαφορετικούς κλάδους. Η Τοξικολογία σήμερα είναι αρκετά διεγερμένη σε όλους τους τομείς, όπου μια τοξική ουσία μπορεί να επιφέρει βλαπτικές επιδράσεις, όχι μόνο στον άνθρωπο, αλλά και στα ζώα, όπως και στο οικοσύστημα, ενώ οι περιβαλλοντικές και οικονομικές επιπτώσεις είναι τεράστιας σημασίας.

Οι βασικοί προσανατολισμοί είναι οι εξής (Σκουρολιάκου 2015):

- 1) Περιγραφική-Αναλυτική Τοξικολογία: σε αυτόν τον τομέα μελετώνται τόσο η φύση όσο και οι ιδιότητες μιας τοξικής ουσίας και ασχολείται με την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τοξικών ουσιών.
- 2) Δικαστική Τοξικολογία: η εξειδίκευση ως προς την εφαρμογή των γνώσεων για τις τοξικές ουσίες για τη διαλεύκανση δικαστικών υποθέσεων.

- 3) Κλινική Τοξικολογία: ασχολείται με την καταγραφή των συμπτωμάτων από την τοξική δράση διαφόρων ουσιών και την ανάπτυξη αντιδότων και θεραπευτικών σχημάτων οξείων και χρόνιων δηλητηριάσεων.

Από τους παραπάνω κλάδους προκύπτουν επιμέρους κλάδοι, όπως οι παρακάτω:

- 1) Επαγγελματική ή Βιομηχανική Τοξικολογία: ο κλάδος αυτός μελετά την επίδραση τοξικών ουσιών που χρησιμοποιούνται ή παράγονται στο εργασιακό και ιδιαίτερα στο βιομηχανικό περιβάλλον.
- 2) Βιοχημική Τοξικολογία: μελετάται η αντίδραση μιας τοξικής ουσίας στον οργανισμό και εξετάζονται παράμετροι, όπως η απορρόφηση, η αποικοδόμηση η απέκκριση μιας ουσίας σε μοριακό επίπεδο. Αποτελεί γνώση που θέτει τις βάσεις για άλλα πεδία τοξικολογίας.
- 3) Γενετική Τοξικολογία: μελετά την επίδραση των τοξικών ουσιών πάνω στο γενετικό υλικό των ζωντανών οργανισμών. Η Τοξικογενετική (toxicogenomics) επιτρέπει στους τοξικολόγους να αναγνωρίσουν και να προστατεύσουν τα άτομα από επικίνδυνους τοξικούς παράγοντες και να προσαρμόζεται στο εκάστοτε άτομο η δόση μιας ουσίας ανάλογα το γενετικό τους προφίλ (Eaton & Gilbert 2008).
- 4) Περιβαλλοντική Τοξικολογία: Μελετά τις επιπτώσεις των τοξικών ουσιών στο φυσικό περιβάλλον που έρχεται σε άμεση ή έμμεση επαφή με τον άνθρωπο. Παράδειγμα αποτελούν, οι ρύποι της ατμοσφαιρικής ρύπανσης που προέρχονται από τις εξατμίσεις των αυτοκινήτων ή από τις βιομηχανικές μονάδες.
- 5) Τοξικολογία Τροφίμων: ανήκει στην περιβαλλοντική τοξικολογία και μελετά τις επιπτώσεις των χημικών ουσιών που υπάρχουν στα τρόφιμα π.χ. συντηρητικά, χρωστικές ουσίες κλπ., αλλά ακόμα και ουσίες που επιδρούν στους φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς που προέρχονται από το περιβάλλον και εισέρχονται μέσω της τροφής στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως διάφοροι ρύποι των υδάτινων οικοσυστημάτων.
- 6) Οικονομική Τοξικολογία: Έχει να κάνει με την επίδραση μιας τοξικής ουσίας στους ζωντανούς οργανισμούς που έρχεται σε επαφή με τον άνθρωπο επειδή χρησιμοποιείται για την επίτευξη ενός οικονομικού στόχου πχ. παρασιτοκτόνα, χημειοθεραπείες κ.λ.π.. Πολλές από αυτές τις ουσίες έχουν βλαπτική επίδραση στους μικροοργανισμούς που π.χ. προσβάλουν τις φυτικές καλλιέργειες και

χρησιμοποιούνται για αυτόν το σκοπό. Εδώ, η γνώση των κλινικών στοιχείων να συνδιάζονται με τοξικολογικές αναλύσεις (Σκουρολιάκου 2015).

- 7) Ρυθμιστική Τοξικολογία: Ασχολείται με τον καθορισμό της τοξικότητας μιας ουσίας, τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της και την εκτίμηση της ασφάλειας ή της επικινδυνότητας της χρήσης της.
- 8) Κτηνιατρική Τοξικολογία: Ασχολείται με όλους τους τοξικούς παράγοντες που συσχετίζονται με την υγεία των ζώων και κατ'επέκταση των ζωικών προϊόντων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.

1.3. Η έννοια του δηλητηρίου – Η δηλητηρίαση

Η έννοια “δηλητήριο” είναι δύσκολο να οριστεί. Δεν υπάρχει, μέχρι στιγμής κάποιος ικανοποιητικός ορισμός του δηλητηρίου. Θα μπορούσε να οριστεί ως οποιαδήποτε ουσία ή υλικό (στερεό, υγρό, ή αέριο), που όταν έρθει σε επαφή με έναν οργανισμό, σε πολύ μικρή δόση, μπορεί να επιφέρει βλάβη, λόγω των ιδιοτήτων του, χωρίς τη μεσολάβηση οποιασδήποτε μηχανικής επίδρασης στον οργανισμό και η οποία δρα ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία. Είναι αμφίβολο αν μπορεί να αποδοθεί ένας πληρέστερος ορισμός, και η εύρεση αυτού εμπίπτει περισσότερο στο εύρος της γλωσσολογίας παρά της τοξικολογίας. Το αν μια ουσία είναι ή όχι δηλητηριώδης, εξαρτάται από το είδος που έρχεται σε επαφή με αυτήν, την ποσότητα έκθεσης, καθώς και τη διαδρομή που ακολουθεί η ουσία αυτή στον οργανισμό (Locke, 2023). Μια μικρή ποσότητα βιταμίνης Α που προσλαμβάνεται από τον οργανισμό είναι ζωτικής σημασίας για την ικανότητα όρασης, όμως υπερβολική δόση μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές διαταραχές του πεπτικού συστήματος. Έχει βρεθεί ότι η κατανάλωση ζάχαρης μπορεί να προκαλέσει δηλητηρίαση σε βοοειδή και χοίρους, ενώ ήδη έχει αναφερθεί η δηλητηρίαση από αλάτι. Όπως φαίνεται, είναι δύσκολος ο διαχωρισμός ανάμεσα σε ουσίες ευρέως διαδεδομένες ως μη τοξικές, όπως η ζάχαρη, και ουσίες όπως το δηλητήριο ενός φιδιού (Daunoras 2012).

Ως δηλητηρίαση μπορεί να οριστεί η διαταραχή μιας θεμελιώδους λειτουργίας του οργανισμού εξαιτίας της επαφής με μια τοξική γι' αυτόν ουσία. Αυτή η τοξική ουσία μπορεί να έχει ποικίλες πηγές προέλευσης, από έναν μικροοργανισμό, ένα φυτό, ένα μύκητα ή ακόμη και ουσίες που βρίσκονται σε ορυκτά, ενώ μπορεί να είναι και μια συνθετική ουσία. Στη δηλητηρίαση, η τοξική ουσία παρεμποδίζει την επίτευξη μιας ενζυμικής αντίδρασης που εξυπηρετεί μια συγκεκριμένη λειτουργία στον οργανισμό (Σκουρολιάκου 2015). Η έκθεση στην τοξική ουσία μπορεί να προέλθει λόγω

επαγγέλματος, από το περιβάλλον ή ακόμα και από πρακτικές ιατρικής, ενώ κάποιος μπορεί να δηλητηριαστεί από κατάχρηση μιας ουσίας π.χ. αλκοόλ.

1.4.Τοξικότητα

Ως τοξικότητα αναφέρεται ο βαθμός στον οποίο μια ουσία μπορεί να προκαλέσει βλάβες στον οργανισμό ανθρώπων ή ζώων. Η τοξική δράση μιας ουσίας εξαρτάται από την ποσότητά της (δόση), τη LD50, την οδό εισόδου στον οργανισμό, τη μεταφορά της στον τόπο δράσης (όργανα-στόχοι), τη διάρκεια δράσης και την ευαισθησία του οργανισμού στην ουσία (Lipnick et al., 1995).

Άλλοι παράμετροι που καθορίζουν τη τοξικότητα είναι η συχνότητα της έκθεσης, καθώς μια χημική ουσία που σε εφάπαξ δόση προκαλεί οξεία τοξίκωση, σε χαμηλές επαναλαμβανόμενες δόσεις να μην προκαλεί κάποια παρενέργεια. Βασικός παράγοντας επίσης αποτελεί ο χρόνος που χρειάζεται να απεκκριθεί η ουσία από τον οργανισμό, χρόνος ημιζωής (Gallo 2008).

1.4.1. Δόση

Οι δηλητηριάσεις των θηλαστικών και άλλων σπονδυλωτών εκφράζονται συνήθως ως η ποσότητα τοξικής ουσίας ανά μονάδα σωματικού βάρους. Η δόση είναι η σωστή ορολογία για την τοξικότητα και εκφράζεται ως ποσότητα τοξικής ουσίας ανά μονάδα σωματικού βάρους. Οι κοινώς αποδεκτές μονάδες μέτρησης για κτηνιατρικά φάρμακα είναι mg/kg σωματικού βάρους. Η τοξικότητα μιας ουσίας μπορεί να εκφραστεί σε mg ή μικρογραμμάρια (μg) ανά κιλό σωματικού βάρους. Μερικοί ερευνητές θεώρησαν ότι ο υπολογισμός της δόσης σε επιφάνεια σώματος, θα ήταν πιο ακριβής στη περίπτωση διαφορετικού μεγέθους ζώων. Για την κλινική τοξικολογία όμως, καθώς τα ζώα αυξάνουν σε βάρος, η επιφάνεια του σώματος αυξάνεται αναλογικά λιγότερο και αυτό μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό μεταβολισμού, την απέκκριση και την αλληλεπίδραση των υποδοχέων με τα τοξικά. Σε μερικές περιπτώσεις δραστικών ουσιών, τα μεγαλόσωμα ζώα μπορούν να δηλητηριαστούν με σχετικά χαμηλότερες δόσεις σωματικού βάρους από ότι τα μικρόσωμα θηλαστικά. Η δόση είναι ένας όρος για η συνολική ποσότητα ενός φαρμάκου ή τοξικής ουσίας που δίνεται σε έναν μεμονωμένο οργανισμό (EFSA, 2023).

1.4.2. LD50

Η τοξικότητα μιας ουσίας καθορίζεται από τη μέση θανατηφόρα δόση /το δείκτη LD₅₀, ο οποίος δείχνει την ποσότητα της ουσίας που πρέπει να καταναλωθεί, για να πεθάνει το 50% των ζώων εργαστηρίου (Eaton & Gilbert 2008). Προκειμένου να καθοριστεί η οξεία τοξικότητα των διαφόρων ουσιών, χρησιμοποιούνται ζώα εργαστηρίων και συγκεκριμένα αρουραίοι, αν και συμπεράσματα αντλούνται και από τυχαία περιστατικά έκθεσης ανθρώπων σε βλαβερές ουσίες (Gad, 2014). Ο Πίνακας 1.1 παραθέτει ενδεικτικές τοξικές χημικές ουσίες μαζί με τον αντίστοιχο δείκτη, LD₅₀.

Πίνακας 1.1: Τιμές LD50 σε μερικούς αντιπροσωπευτικούς χημικούς παράγοντες (Eaton & Gilbert 2008)

Παράγοντας	LD ₅₀ , mg/kg
Elhyl alcohol	10000
Sodium chloride	4000
Ferrous sulfate	1500
Morphine sulfate	900
Phenobarbital sodium	150
Picrotoxin	5
Strychnine sulfate	2
Nicotine	1
d-Tubocurarine	0.5
Hemicholinium-3	0.2
Tetrodotoxin	0.10
Dioxin (TCDD)	0.001
Botulinum toxin	0.00001

Πίνακας 1.2: Παραδείγματα ουσιών και θανατηφόρος δόση ανάλογα με το βαθμό τοξικότητάς τους (Daunoras 2012).

Rating Gass	Oral LD ₅₀ in rats mg kg	Probable lethal dose in man	Example
6 Super toxic	less than 5	5 drops	Strychnine
5. Extremely toxic	5-50	1 teaspoon	Parathion
4. Very toxic	50-500	1 ounce	Phenobarbital
3. Moderately toxic	500-5000	1 lb (or 1 pt)	Ethanol
2. Slightly toxic	5 000-15 000	1 quart	Ethanol
1. Practically nontoxic	over 15 000	over 1 quart	Linseed oil

Άλλοι δείκτες που καθορίζουν την τοξικότητα μιας ουσίας είναι :

- Ελάχιστη θανατηφόρα δόση (MLD): είναι η δόση της ουσίας που χορηγούμενη σε μια ομάδα πειραματόζωων βάρους 1 kg, προκαλεί το θάνατο ενός πειραματόζωου (Pillai et al., 2021).
- Μέγιστη μη τοξική δόση (HNTD): είναι η μέγιστη δόση μιας ουσίας που δεν θα επιφέρει, αιματολογικές, χημικές, κλινικές ή παθολογικές αλλοιώσεις στα πειραματόζωα (Pillai et al., 2021).
- Θεραπευτικός δείκτης ή πλάτος: ορίζεται ο λόγος της μέσης δόσης της ουσίας που απαιτείται για να προκαλέσει τοξικότητα ή θάνατο στο 50% των πειραματόζωων προς τη μέση δόση που απαιτείται για να επιφέρει το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα. $TI = LD_{50}/ED_{50}$ ή TD_{50}/ED_{50} . Επομένως όσο μεγαλύτερος ο θεραπευτικός δείκτης μιας ουσίας, τόσο πιο ακίνδυνη είναι (Yartsev, 2023).
- No observed adverse effect level (NOAEL): δηλώνει το επίπεδο της έκθεσης που δεν θα προκαλέσει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία. Έχει άμεση σχέση με τη Δημόσια υγεία και τη διαγνωστική Τοξικολογία. Συνήθως ο NOAEL σε πειραματόζωα, βασίζεται σε εκθέσεις που κυμαίνονται από 90 ημέρες έως 2 ή περισσότερα έτη, ανάλογα με το είδος (Beckett et al., 2023).

Επίσης, η τοξικότητα μιας ουσίας επηρεάζεται από τη χημική σύνθεση της ουσίας, τη σταθερότητα της, τις συνθήκες δηλητηρίασης, ατομικούς παράγοντες του ζώου (είδος, φύλο, φυλή, ηλικία κ.α.) και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ακόμα επηρεάζεται από τη συνεργασία, ανταγωνισμό, εθισμό, ιδιοσυγκρασία, αναφυλαξία, ατομική αντίσταση και παθολογικούς παράγοντες.

1.4.3. Οδοί εισόδου τοξικής ουσίας στον οργανισμό

Προκειμένου ένα δηλητήριο να προκαλέσει παρενέργειες στον οργανισμό, πρέπει να απορροφηθεί και να περάσει στην κυκλοφορία του αίματος. Στη συνέχεια, αυτή θα κατανεμηθεί στα διάφορα όργανα θα υποστεί βιομετασχηματισμούς και εν συνεχεία θα αποβληθεί από τον οργανισμό. Το σύνολο αυτών των διεργασιών καλείται Τοξικοκινητική (Shanmugam et al., 2023).

Η απορρόφηση γίνεται περνώντας την κυτταρική μεμβράνη, η οποία κατά τη θεωρία του Danniely, αποτελείται από μια διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, πόρους διαφόρων μεγεθών και πρωτεϊνικά στρώματα. Μπορεί να είναι παθητική ή ενεργητική. Η οδός, μέσω της οποίας έγινε η έκθεση και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της τοξικής ουσίας, όπως η χημική

συγγένεια με τα ενδοκυτταρικά συστατικά, το μοριακό της βάρος, η ικανότητα διάλυσης σε υδατικό ή λιπιδικό περιβάλλον, καθώς και αν κατανέμεται ως ασθενές οξύ ή ασθενής βάση, παίζουν ρόλο στο πώς και πόση ουσία θα απορροφηθεί. Η βιοαπορροφησιμότητα (bioavailability), αναφέρεται στο ποσοστό που πραγματικά απορροφάται από τον οργανισμό από μια συγκεκριμένη δόση τοξικών ουσιών (Firth et al., 2020).

Οι πιο συχνές οδοί εισόδου/απορρόφησης είναι η αναπνευστική, η γαστρεντερική, η δερματική, και η παρεντερική (Daunoras 2012).

- 1) Αναπνευστική οδός: το εκτεταμένο πνευμονικό επιθήλιο αποτελεί ένα εξαιρετικό μέσο απορρόφησης δηλητηρίου για στερεά, υγρά και αέρια, ιδίως αν είναι σε μορφή σπρέι ή σε πολύ μικρά σωματίδια. Το μέγεθος των μορίων της τοξικής ουσίας που εισέρχονται στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα, θα καθορίσει σε μεγάλο βαθμό αν θα εναποτεθεί στο ρινοφαρυγγικό σωλήνα ή στις κυψελίδες των πνευμόνων ή θα απορροφηθεί στη κυκλοφορία του αίματος. Δεν υπάρχει δυνατότητα αδρανοποίησης των τοξικών ουσιών εντός του αναπνευστικού συστήματος.
- 2) Γαστρεντερική οδός: είναι η πιο κοινή οδός εισόδου των τοξικών ουσιών. Δυο σημαντικοί παράγοντες για την απορρόφηση των ουσιών από το γαστρεντερικό σωλήνα, είναι η πυκνότητα και η διαλυτότητα αυτών. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα και η πυκνότητα, τόσο μεγαλύτερη η απορρόφηση από το στομάχι. Σε όλα τα είδη ο μεγαλύτερος βαθμός απορρόφησης γίνεται στο λεπτό και στο παχύ έντερο λόγω μεγαλύτερης επιφάνειας απορρόφησης και πλουσιότερης αιμάτωσης. Στο σκύλο μπορεί να γίνει και στο στομάχι. Το υδροχλωρικό οξύ του στομάχου μπορεί να διαλύσει μια αδιάλυτη ουσία, γι' αυτό όταν το στομάχι είναι γεμάτο το δηλητήριο μπορεί να καθυστερήσει να απορροφηθεί ή να καθυστερήσει η διάλυσή του στο γαστρικό υγρό σε σημείο που να το καθιστά σχεδόν αβλαβές. Η ικανότητα απορρόφησης τοξικών ουσιών είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού βάρους. Γι' αυτό στη θεραπεία των δηλητηριάσεων γίνεται προσπάθεια μετατροπής τους σε μεγαλομοριακές ενώσεις με τη χορήγηση πρωτεϊνών.
- 3) Απορρόφηση από το δέρμα: Το δέρμα που δεν έχει λύσεις συνεχείας δεν προσφέρεται για εύκολη απορρόφηση ουσιών. Εξαίρεση αποτελεί η νικοτίνη, η οποία, όταν διαλυθεί στο νερό, απορροφάται πολύ εύκολα μέσω δέρματος. Η

απορρόφηση γίνεται πιο εύκολα σε λιποδιαλυτές ουσίες όπως ο αιθέρας, η φαινόλη, οι οργανοφωσφορικοί εστέρες, ο τετρααιθυλιούχος μόλυβδος και τα βαρέα μέταλλα.

- 4) Παρεντερική απορρόφηση: η υποδόρια και ενδομυϊκή χορήγηση είναι εξίσου αποτελεσματικές, αλλά η ενδοφλέβια είναι μέθοδος επιλογής για την άμεση διοχέτευση της ουσίας στην κυκλοφορία του αίματος. Δεν ενδείκνυται σε ελαιώδη και υπότονα διαλύματα.

Στη κατανομή των τοξικών ουσιών περιλαμβάνεται η βιολογική δράση, που γίνεται μέσω ειδικών υποδοχέων σε κυτταρικό επίπεδο και η αποθήκευση, που γίνεται στα κύτταρα των ιστών στο ενδοκυττάριο κι εξωκυττάριο χώρο, στα λίπη και στις πρωτεΐνες του αίματος.

Κατά το βιομετασχηματισμό/μεταβολισμό των τοξικών ουσιών στον οργανισμό παράγονται οι μεταβολίτες. Σκοπός του βιομετασχηματισμού είναι η μείωση της τοξικής δράσης των ουσιών. Γίνεται με τη δημιουργία παραγώγων που αποβάλλονται ευκολότερα από τον οργανισμό και είναι λιγότερα τοξικά. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου οι μεταβολίτες είναι πιο τοξικοί από την αρχική ουσία όπως οι αλκοόλες (φορμαλδεϋδη, ακεταλδεϋδη).

Η απέκκριση των τοξικών ουσιών και των μεταβολιτών τους γίνεται μέσω των νεφρών, της χολής και τους μαστούς (Αφλατοξίνη Α στο γάλα).

1.5.Μορφές Δηλητηρίασης

Ανάλογα με τη διάρκεια δράσης, ταχύτητα της εμφάνισης και τη διάρκεια των συμπτωμάτων που είναι συνάρτηση και της ταχύτητας απορρόφησης μιας τοξικής ουσίας, η δηλητηρίαση διακρίνεται σε οξεία, υποξεία και χρόνια (Deshmukh & Pawar, 2020; Tarlok et al., 2015).

- A. Οξεία Δηλητηρίαση: Δεν αναφέρεται στη βαρύτητα άλλα στη μικρή διάρκεια δράσης εντός 24ώρου με κλινικά συμπτώματα που γρήγορα υποχωρούν ή επιφέρουν το θάνατο.
- B. Υποξεία Δηλητηρίαση: Προκαλείται μετά από πολλαπλές εκθέσεις στην τοξική ουσία μέσα σε μια περίοδο λίγων ημερών, μέχρι την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων.
- Γ. Χρόνια Δηλητηρίαση: Προκαλείται μετά από παρατεταμένη έκθεση ημερών και μηνών στη τοξική ουσία μέχρι την εμφάνιση των συμπτωμάτων (De Jong et al.

2012), συνήθως λόγω μικρότερου ρυθμού αποδόμησης της από αυτόν της εισόδου της ή λόγω καρκινογένεσης. Συνήθως δεν είναι θανατηφόρα, αλλά προκαλεί μεγάλες αλλαγές σε επιμέρους λειτουργίες του οργανισμού, όπως στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και τη συμπεριφορά (Newman, 2010). Στη χρόνια τοξικότητα παίζει ρόλο η διάρκεια και συχνότητα έκθεσης καθώς και ο βαθμός συσσώρευσης της τοξικής ουσίας στον οργανισμό. Μερικές φορές μια χρόνια δηλητηρίαση μπορεί να παρουσιάσει κλινική εικόνα οξείας (π.χ. σε χρόνια δηλητηρίαση από μόλυβδο, κατά τη θεραπεία η συσσωρευμένη τοξική ουσία να μεταφερθεί στην κυκλοφορία, προκαλώντας εικόνα οξείας δηλητηρίασης με κολικούς) (Αντωνίου et. al., 1993).

1.6. Αίτια Δηλητηρίασης

Οι δηλητηριάσεις διακρίνονται στις ενδογενείς και στις εξωγενείς, όπου οι ενδογενείς οφείλονται σε μικρόβια και τις τοξίνες τους και οι εξωγενείς διακρίνονται στις τυχαίες και τις εκ προθέσεως.

- A. Τυχαίες δηλητηριάσεις: Οφείλονται σε αμέλεια ή απροσεξία, λάθη στη δοσολογία φαρμάκων, επαγγελματικές δηλητηριάσεις στους ανθρώπους, τροφικές (π.χ. κατανάλωση τοξικών φυτών), σε ιοβόλα ζώα, κακή διαχείριση φυτοπροστατευτικών κ.α..
- B. Δηλητηρίαση από πρόθεση: Είναι εγκληματική ενέργεια και γίνεται συνήθως σε περιπτώσεις αντιδικίας μεταξύ ανθρώπων ή σε ηθελημένη προσπάθεια εξόντωσης ζώων.
- Γ. Στις εξωγενείς δηλητηριάσεις, γίνεται λεπτομερής αναφορά στη μελέτη μας καθώς αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των δηλητηριάσεων.

1.7. Η Ανάπτυξη της Κτηνιατρικής Τοξικολογίας

Η εργασία εστιάζεται στην Κτηνιατρική Τοξικολογία, όπου εννοείται η κατανόηση των πηγών δηλητηρίασης, οι συνθήκες έκθεσης, η διάγνωση των διαφόρων τύπων δηλητηριάσεων, η θεραπευτική αντιμετώπιση και η εύρεση εκπαιδευτικών στρατηγικών πρόληψης προκειμένου να αποφευχθεί η δηλητηρίαση στα ζώα. Οι περισσότερες ειδικεύσεις στην κτηνιατρική τοξικολογία εστιάζουν στη σημαντική αρχή της σχέσης δόσης και απόκρισης.

Η κτηνιατρική τοξικολογία άρχισε να αναπτύσσεται κατά τα τέλη του 19ου αιώνα στην Αμερική με κύριο ενδιαφέρον τις δηλητηριάσεις παραγωγικών ζώων από τοξικά φυτά, λόγω των μεγάλων οικονομικών κυρίως συνεπειών τους. Με την ανακάλυψη και την αλόγιστη χρήση των φυτοφαρμάκων, κυρίως μετά το 2ο Παγκόσμιο πόλεμο, χιλιάδες ζώα που προορίζονταν για ανθρώπινη κατανάλωση δηλητηριάστηκαν. Το γεγονός αυτό, συντέλεσε στην ανάπτυξη εξειδικευμένου κλάδου που μελετά τις πιθανές επιδράσεις των τοξικών χημικών ουσιών στα ζώα και τα φυτά που καλλιεργούνται. Οι κτηνίατροι τοξικολόγοι ασχολούνται επίσης με την εκτίμηση των τοξικών επιδράσεων στον άνθρωπο όταν εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της τροφής ή αν έρθουν σε επαφή μέσω δέρματος. Οι γενικές αρχές παραμένουν ίδιες με την τοξικολογία στον άνθρωπο όσον αφορά την κλινική εκτίμηση της ασφάλειας νέων συστατικών που μπορεί να εισαχθούν στους οργανισμούς. Γι' αυτό οι δύο κλάδοι της ανθρώπινης και της κτηνιατρικής τοξικολογίας είναι πολύ στενά συνδεδεμένοι (Daunoras 2012).

Οι δυσκολίες στη Κτηνιατρική Τοξικολογία είναι μεγάλες, αν αναλογιστεί κανείς ότι αναφέρεται σε πολλά διαφορετικά είδη ζώων με βασικές ανατομικές, φυσιοπαθολογικές και βιοχημικές διαφορές, μεγάλη ποικιλία αντιδράσεων και συνεπειών στις τοξικές ουσίες με πολλαπλότητα κλινικών εικόνων άλλα και θεραπευτικών αντιμετώπισεων. Ανάλογα με τα είδη ζώων, οι ενζυμικές δραστηριότητες και τα συστήματα μετασχηματισμού στο ήπαρ είναι διαφορετικοί. Αλλά και για τα ίδια είδη ζώων, οι συνέπειες της επίδρασης μιας ουσίας, είναι ποικίλες, εξαρτώμενες από τη διατροφή τους, την ύδρευση τους, τις συνθήκες διαβίωσης κ.α..

1.7.1. Κτηνιατρική Τοξικολογία και Δημόσια Υγεία

Τα τελευταία χρόνια είναι απόλυτα σαφής, η στενή σχέση που υπάρχει μεταξύ Κτηνιατρικής Τοξικολογίας και Δημόσιας Υγείας αφού οι ζωνοόσοι και οι διάφορες τοξικές των ζώων, επηρεάζουν σημαντικά την υγεία των ανθρώπων αλλά και το περιβάλλον γενικότερα.

Η κτηνιατρική τοξικολογία περιλαμβάνει και τη μελέτη των πειραματόζωων, με απώτερο σκοπό, τον έλεγχο της ασφάλειας μιας ουσίας, για την χρήση της στον άνθρωπο. Πεδίο έρευνας της Κτηνιατρικής Τοξικολογίας είναι και η μόλυνση του περιβάλλοντος από τα ζώα (π.χ. τόνων κοπρομάζας και ποσότητας αερίων που παράγονται), όπως και η ανίχνευση φαρμάκων (αντιβιοτικά, ορμόνες), που εμπεριέχονται στα ζωικά προϊόντα. (Αντωνίου et. al., 1993).

1.7.2. Διάγνωση των δηλητηριάσεων στα ζώα

Η διάγνωση των δηλητηριάσεων των ζώων, στηρίζεται στο ιστορικό, στη λήψη πληροφοριών, στη κλινική εικόνα και στις εργαστηριακές εξετάσεις στις όποιες συμπεριλαμβάνονται οι Τοξικολογικές, οι Παθολογοανατομικές και οι Βιοχημικές. Είναι σημαντικό να συμπεριλάβουμε τη συλλογή των δειγμάτων, τη σωστή συντήρηση, και αποστολή τους και το δελτίο αποστολής παθολογικού υλικού στο οποίο καταγράφεται όλο το ιστορικό. Η άμεση συνεργασία του Τοξικολόγου με τον Παθολογοανατόμο και τον Κλινικό Κτηνίατρο κρίνεται επιτακτική για την έκβαση της τελικής διάγνωσης.

Οι τοξικολογικές αναλύσεις διενεργούνται σε βιολογικά υγρά τόσο ζώντων όσο και νεκρών ζώων. Πολλές φορές, οι αναλύσεις, αφορούν την Κτηνιατροδικαστική διερεύνηση δηλητηριάσεων ζώων, γι' αυτό μια έκθεση Τοξικολογικής Ανάλυσης, πρέπει να είναι λεπτομερής και κατατοπιστική (Daunoras 2012).

1.7.3. Κτηνιατρική Αναλυτική Τοξικολογία

Η κτηνιατρική διαγνωστική τοξικολογία συνδυάζει τις ειδικότητες της κτηνιατρικής τοξικολογίας και της αναλυτικής χημείας. Ακόμη και σε καταστάσεις όπου η διάγνωση φαίνεται προφανής, συχνά απαιτούνται χημικές δοκιμές για την επιβεβαίωση της τελικής διάγνωσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι αρχές που αποστέλλουν τα δείγματα αιτούν από τα τοξικολογικά εργαστήρια, γενική τοξικολογική διερεύνηση “poison screen”, χωρίς να προσκομίζουν πλήρες ιστορικό του ζώου και νεκροτομικά ευρήματα. Το γεγονός αυτό, καθιστά ιδιαίτερα δύσκολο το έργο του τοξικολόγου δεδομένου ότι τα εμπλεκόμενα βιολογικά συστήματα, οι τοξικές ουσίες και η φύση της αναλυτικής χημείας συνθέτουν ένα υπερβολικά πολύπλοκο σύνολο. Έτσι, είναι δύσκολο να δοθούν απαντήσεις και αποτελέσματα με μια απλή αναλυτική δοκιμή. Επίσης, ανάλυση μπορεί να απαιτηθεί στοχευμένα, για φυτοφάρμακα, τοξικά μέταλλα, τοξικά φυτά, μυκοτοξίνες, φάρμακα, βιομηχανικά χημικά και σχεδόν οποιαδήποτε άλλη χημική ουσία ή μη, που μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την υγεία οποιουδήποτε είδος ζώου.

1.7.4. Κτηνιατρική Τοξικολογία Στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα, τις πρώτες δεκαετίες, η διερεύνηση ήταν εστιασμένη στα παραγωγικά ζώα και σποραδικά στα ζώα άγριας πανίδας. Η κτηνοτροφία ήταν πολύ ανεπτυγμένη, όχι τόσο συστηματική και η απώλεια παραγωγικών ζώων είχε και έχει σημαντική οικονομική επίπτωση τόσο στους κτηνοτρόφους όσο και στο κράτος. Συλλογή δειγμάτων γίνονταν

από τους κτηνιάτρους των Αγροτικών Κτηνιατρείων και στέλνονταν για τοξικολογική ανάλυση στα Κτηνιατρικά Εργαστήρια και κυρίως στα Τοξικολογικά Εργαστήρια Αθήνας Θεσσαλονίκης και Πατρών. Από το 2005 έως σήμερα λειτουργεί ένα Εργαστήριο Τοξικολογίας που ανήκει στη Δ/ση Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών.

1.7.5. Ο Ρόλος της Κτηνιατρικής Τοξικολογίας

Διαχωρίζεται στην Κλινική και στη Δικαστική Τοξικολογία και διαφοροποιείται ο ρόλος:

Κλινική Τοξικολογία αναφέρεται σε περιπτώσεις οξείων δηλητηριάσεων στη διαφοροδιάγνωση του Κλινικού όπου το ζώο είναι ζωντανό.

Τα κλινικά συμπτώματα προέρχονται από τη λήψη δηλητηρίου ή από νόσημα; πχ σπασμούς προκαλούν τα καρβαμιδικά παρασοτοκτόνα αλλά και η επιληψία και ο τέτανος

Δικαστική Τοξικολογία αναφέρεται στη διερεύνηση της αιτίας θανάτου και απόδοση ευθυνών σε περιπτώσεις αυτοφώρου, μηνυτήριων αναφορών και αυτεπάγγελτα σύμφωνα με το νόμο 4830/21 και ΥΑ 168599/1495/2018 του ΥΠΕΝ

2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

2.1.Εισαγωγή

Τα κτηνιατρικά εργαστήρια τοξικολογίας ανά τον κόσμο διαθέτουν αναλυτικά όργανα και μεθόδους για την ανίχνευση των δηλητηρίων. Όπως έχει προαναφερθεί δεν υπάρχει μια μέθοδος που να μπορεί να ανιχνεύσει την δραστική ουσία, αντίθετα, υπάρχουν αμέτρητες ουσίες που μπορούν να προκαλέσουν δηλητηρίαση, αλλά επίσης και εκατοντάδες μέθοδοι για την ανίχνευση τους. Η ύπαρξη διαφορετικών μεθόδων και η ικανότητα ανίχνευσης διαφορετικού εύρους ουσιών σε κάθε τοξικολογικό εργαστήριο οφείλεται κυρίως στην διαθεσιμότητα κατάλληλου εργαστηριακού εξοπλισμού, στην επάρκεια προσωπικού, ύπαρξη πόρων για εκπαιδεύσεις και αγορά αντιδραστηρίων και αναλωσίμων.

Τα είδη των δειγμάτων που μπορούν να αναλυθούν είναι σχεδόν απεριόριστα και περιλαμβάνουν κάθε είδους ζωικού ιστού ή σωματικού υγρού, οτιδήποτε που ένα ζώο μπορεί να καταπιεί, και περιβαλλοντικά δείγματα. Δεν υπάρχουν καθορισμένες (standard) αναλυτικές μέθοδοι για την ανίχνευση πολλών ομάδων ενώσεων και για όλα τα είδη δειγμάτων, οπότε η ανάπτυξη και η τροποποίηση νέων αναλυτικών μεθόδων είναι επιτακτική ανάγκη ανάλογα με τον αναλυτικό εργαστηριακό εξοπλισμό και το προσωπικό που διαθέτει κάθε εργαστήριο.

Το πεδίο της αναλυτικής χημείας εξελίσσεται ραγδαία, με τη συνεχή εισαγωγή νέων αναλυτικών μεθόδων και οργάνων που παρέχουν ταχύτερες, πιο αξιόπιστες αναλύσεις με συνεχώς αυξανόμενα επίπεδα ευαισθησίας και όλο και χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Σε αντιδιαστολή, τα κτηνιατρικά διαγνωστικά εργαστήρια λόγω χαμηλού προϋπολογισμού έχουν περιορίσει σημαντικά, πολλές από τις δυνατότητές τους στον τομέα της τοξικολογίας (Gwaltney-Brant 2016).

Επίσης, με βάση το γεγονός ότι οι αναλυτικές μέθοδοι έχουν πλέον επικεντρωθεί στην ανάλυση υπολειμμάτων στα τρόφιμα, ανιχνεύοντας πολύ μικρές συγκεντρώσεις, εγκυμονεί μεγάλος κίνδυνος παρερμηνείας των αποτελεσμάτων ως ψευδώς θετικά. Γι' αυτό χρειάζεται καλή γνώση του αντικειμένου και ορθή αξιολόγηση του συνόλου των δεδομένων που αναφέρονται σε κάθε περιστατικό.

Αν μια συγκεκριμένη δοκιμή δεν προσφέρεται από ένα εργαστήριο, μπορεί να προωθηθεί το δείγμα σε άλλο τοξικολογικό εργαστήριο για να πραγματοποιηθεί. Κι επειδή πολλές

περιπτώσεις δηλητηριάσεων είναι στα πλαίσια δικαστικής κτηνιατρικής τοξικολογίας όπου η τελική διάγνωση αποτελεί στοιχείο για την επιβολή κυρώσεων, πρέπει να εξεταστεί το δείγμα με όλα τα δυνατά μέσα Έτσι ανεξάρτητα από τη μεθοδολογία ή τη διαδικασία που θα ακολουθηθεί, ο στόχος είναι η ανίχνευση της τοξικής ουσίας.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι για ορισμένες τοξικές ουσίες δεν είναι απαραίτητη η ποσοτικοποίηση των συγκεντρώσεων των ουσιών στους ιστούς. Η απλή παρουσία των τοξικών ουσιών με συνδυασμό με τα προθανάτια κλινικά συμπτώματα και τα νεκροτομικά ευρήματα, είναι επαρκή στοιχεία, για την έκβαση της διάγνωσης. Αντίθετα, για παρακολούθηση (Monitoring) στοιχείων του περιβάλλοντος και την τοξική επίδραση τους στους ιστούς των ζώων είτε σε οξεία είτε χρόνια δηλητηρίαση η ποσοτικοποίηση είναι απαραίτητη (Poppenga & Braselton 1990).

Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στα τοξικολογικά εργαστήρια περιλαμβάνουν οργανοληπτικό έλεγχο, βιοανάλυση, φυσικοχημικές (χρωμομετρικές) αντιδράσεις, φασματοσκοπία ή φασματομετρία, ανοσοπροσδιορισμοί, φασματομετρία μάζας και χρωματογραφία (Levine 2010).

A. Οργανοληπτικός Έλεγχος. Ο Οργανοληπτικός Έλεγχος περιλαμβάνει οπτική και οσφρητική εκτίμηση των χαρακτηριστικών του δείγματος. Συμπληρωματικά ένας μεγεθυντικός φακός και ένα μικροσκόπιο βοηθούν στην οπτική εκτίμηση. Ο έλεγχος αυτός χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό τοξικών φυτών και μανιταριών, τοξική άλγη και προσμίξεις ή ξένα σώματα στις ζωοτροφές και παράσιτα στα κόπρανα. Οσφρητικές ενδείξεις και αξιολόγηση των φυσικών ιδιοτήτων του δείγματος (π.χ. διάλυση σε διαλύτες, προσδιορισμός πυκνότητας) είναι επίσης συστατικά της φυσικής επιθεώρησης π.χ. χαρακτηριστική οσμή πικραμύγδαλου κατά την διάνοιξη του περιέκτη του δείγματος οδηγεί στην υποψία υδροκυανίου, γλυκιά/φρουτώδης οσμή, παραπέμπει σε αλκοόλη, οσμή βενζίνης παραπέμπει σε υδρογονάνθρακες, οσμή σκόρδου σε οργανοφωσφορικά ή αρσενικό, οσμή αχλαδιού σε ένυδρη χλωράλη (Βερονίκη και Παπαδόπουλος 2001).

B. Βιοδοκιμές τοξικότητας. Οι βιοδοκιμές χρησιμοποιούν ζωντανά ζώα ως πειραματόζωα για να βοηθήσουν στη διάγνωση της δηλητηρίασης. Για παράδειγμα, η απόδειξη ότι κατά τη δηλητηρίαση από οργανοφωσφορικά, η χορήγηση θεικής ατροπίνης μειώνει τα μουσκαρινικά συμπτώματα. Η χρήση τοξικών ουσιών σε πειραματόζωα μειώνεται σημαντικά τα τελευταία χρόνια με

εξαίρεση τη δοκιμή σε ποντίκια με τη βοτουλινική τοξίνη τύπου Α (botulinum toxin type A) (Kwak et al., 2023).

- Γ. Φυσικοχημικές αντιδράσεις. Οι φυσικοχημικές αντιδράσεις μερικές φορές χρησιμοποιούνται ως ποιοτικές δοκιμές για την ένδειξη της παρουσίας ορισμένων ενώσεων. Για παράδειγμα, όταν η προσθήκη θεικού σιδήρου και ανόργανου οξέος στο δείγμα δίνει το χαρακτηριστικό κυανό χρώμα του Βερολίνου (Prussian blue) υποδηλώνει την ύπαρξη κυανιούχων ή μέτρηση νιτρικών με τα στριπς ελέγχοντας την αλλαγή του χρώματος. Το Εργαστήριο Τοξικολογίας πραγματοποιεί πολλές φυσικοχημικές αντιδράσεις στη προσπάθεια άμεσης ταυτοποίησης ομάδων τοξικών ουσιών.
- Δ. Φασματοσκοπία – Φασματομετρία. Οι κυριότερες φασματοσκοπικές / Φασματομετρικές τεχνικές ανάλυσης είναι οι εξής: UV/VIS, IR, Raman, NMR και η φασματομετρία μαζών, θα αναφερθούν εκτενώς στη συνέχεια.
- Ε. Ανοσοπροσδιορισμοί. Στηρίζονται στη σύζευξη αντιγόνου -αντισώματος για τον εντοπισμό και τη μέτρηση χημικών ενώσεων. Η αλλαγή χρώματος υποδεικνύει την παρουσία ή την απουσία μιας συγκεκριμένης χημικής ένωσης.
- ΣΤ. Χρωματογραφία. Η χρωματογραφία είναι μια διαδικασία διαχωρισμού στην οποία η κινητή φάση διέρχεται από μία στατική φάση. Διαφορετικά συστατικά της κινητής φάσης θα περάσουν μέσω της στατικής φάσης με διαφορετικούς ρυθμούς λόγω αλληλεπιδράσεων με τη στατική φάση, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους. Χωρίζεται στην υγρή και στην αέρια χρωματογραφία.

Οι ουσίες προς ανίχνευση ταξινομούνται ανάλογα με τη χημική τους δομή, ιδιότητες και συμπεριφορά.

Στην αναλυτική τοξικολογία διαχωρίζονται σε πρώτη φάση σε ανόργανες και οργανικές:

- α) Οι ανόργανες αν περιέχουν μέταλλα προσδιορίζονται με ατομική απορρόφηση κι αν δεν περιέχουν από χαρακτηριστικές αντιδράσεις ανιόντων.
- β) Οι οργανικές προσδιορίζονται με διάφορες μεθόδους ανάλυσης αφού προηγουμένως απομονωθούν από το βιολογικό υπόστρωμα σε όξινο, ουδέτερο ή αλκαλικό pH ή/και εφαρμοστούν διάφορες τεχνικές απομόνωσης.

2.2.Οργανική χημική ανάλυση

2.2.1. Εισαγωγή

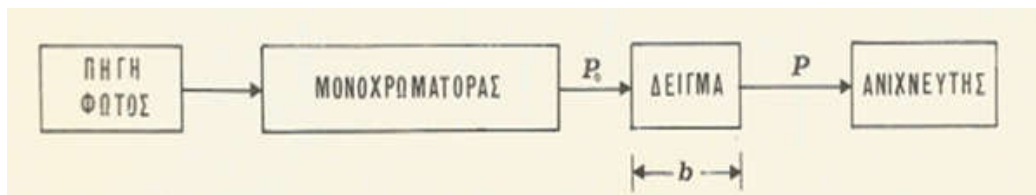
Οι οργανικές τοξικές ουσίες που αφορούν την κτηνιατρική τοξικολογία είναι αρκετά πολύπλοκες γιατί παρουσιάζουν παρόμοια χημικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους και είναι δύσκολος ο διαχωρισμός τους. Επίσης, οι πολύ μικρές (ίχνη) συγκεντρώσεις που απαιτούνται για ανίχνευση, ιδιαίτερα στο χώρο των τροφίμων, καθιστούν αναγκαία τη χρήση πολύπλοκου δαπανηρού εξοπλισμού. Στην ομάδα των οργανικών τοξικών ουσιών συμπεριλαμβάνονται τα φυτοπροστατευτικά, τα τρωκτικοκτόνα και πολλά ζιζανιοκτόνα, πυρεθροειδή, που αποτελούν και την πιο συχνή αιτία δηλητηριάσεων για ζώα συντροφιάς αλλά και για τα παραγωγικά ζώα. Στο πεδίο της οργανικής χημικής ανάλυσης κυριαρχούν μέθοδοι που περιλαμβάνουν χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας.

Η ταχεία αναγνώριση τοξικών οργανικών χημικών ουσιών σε ποικίλα βιολογικά υποστρώματα έχει μέγιστη σημασία στην τοξικολογική διάγνωση. Δεδομένου ότι οι κλινικές ενδείξεις από δηλητηριάσεις διαφορετικών τοξικών ουσιών συμπίπτουν ή τα κλινικά συμπτώματα που δεν είναι γνωστά, η μη συστηματική νεκροτομική διερεύνηση και μια υποθετική διάγνωση μπορούν μερικές φορές να είναι ένας ανεπαρκής οδηγός στην επιλογή επιβεβαιωτικών δοκιμών. Σε αυτές τις περιπτώσεις η αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (GC/MS), σε συνδυασμό με την ηλεκτρονική αναζήτηση στη βάση δεδομένων φασματικής μάζας (ηλεκτρονική βιβλιοθήκη), παρέχει την δυνατότητα στον αναλυτή να εξετάσει (screening) μια αρκετά μεγάλη ομάδα τοξικών ουσιών σε μία μόνο δοκιμή. Μέθοδοι εκχύλισης και καθαρισμού των δειγμάτων είναι σχεδόν πάντα απαραίτητες λόγω της πολύπλοκης σύστασης της μήτρας π.χ. το περιεχόμενο του στόμαχου αλλά και της δυσκολίας του αναλύτη (ουσία προς ανίχνευση) να διαχωριστεί και να απομονωθεί από τη μήτρα.

2.2.2. Φασματομετρία UV-Vis

Οι φασματομετρικές μέθοδοι είναι οι μοριακές και ατομικές φασματομετρικές. Η φασματομετρία υπεριώδους – ορατού UV – Vis αποτελεί έναν εύκολο τρόπο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης κυρίως φαρμάκων και ουσιών σε υγρή μορφή μέσω του χαρακτηριστικού μήκους κύματος που εκπέμπουν όταν γνωρίζουμε την αρχική συγκέντρωση (Hallbach & Guder 1991).

Η Φασματομετρία UV – Vis στηρίζεται στην μέτρηση της απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (~190-800nm) από τα μόρια των διαφόρων χημικών ενώσεων, τα οποία υφίστανται ηλεκτρονικές μετάπτωσης.



Εικόνα 2.1 : Σχηματικό διάγραμμα ποσοτικής φασματοφωτομετρίας (Κουμπάρης 2016)

Η ποσοτικοποίηση των συγκεντρώσεων γίνεται με το νόμο Lambert – Beer. Ως Απορρόφηση (A) ορίζεται ο λογάριθμος του κλάσματος ελαττώσεως της ισχύος.

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = -\log T = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \log\left(\frac{100}{\%T}\right) = 2 - \log \%T$$

Όπου:

- P_0 = ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας,
- P = ισχύς εξερχόμενης ακτινοβολίας,
- T = διαπερατότητα

Ως διαπερατότητα (T) ορίζεται το κλάσμα του φωτός που περνά το δείγμα. Η βασική σχέση μεταξύ A και T είναι: $A = -\log T$ (Κουμπάρης 2016).

2.2.3. Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία είναι μια διαδικασία διαχωρισμού στην οποία η κινητή φάση διέρχεται από μία στατική φάση. Διαφορετικά συστατικά της κινητής φάσης θα περάσουν μέσω αυτής, με διαφορετικούς ρυθμούς, λόγω των αλληλεπιδράσεων με τη στατική φάση, που θα έχει ως αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους. Το δείγμα αποτελούμενο από διαφορετικά συστατικά εισάγεται στην είσοδο της στήλης. Με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά θα ταξιδέψουν κατά μήκος της στήλης αναπτύσσοντας δεσμούς με το πληρωτικό υλικό. Εξαιτίας του διαφορετικού συντελεστή κατανομής μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης ο χρόνος θραύσης αυτών των δεσμών είναι μεταβλητός με αποτέλεσμα να δημιουργείται χρονική υστέρηση των συστατικών που εμφανίζουν ισχυρότερους δεσμούς ως προς αυτά με τους λιγότερο ισχυρούς δεσμούς. Συνέπεια των παραπάνω είναι στην έξοδο της στήλης να εμφανίζεται πρωτίστως το συστατικό που έχει σχηματίζει τους λιγότερο ισχυρούς δεσμούς με τη στατική φάση της στήλης και κατόπιν

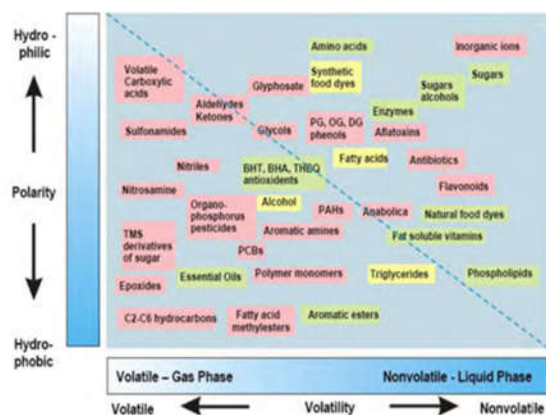
αυτά με τους ισχυρότερους δεσμούς. Ο ανιχνευτής καταγράφει με τη μορφή ηλεκτρικών σημάτων την έξοδο κάθε διαφορετικής ουσίας και την αποδίδει με την μορφή καμπυλών Gauss. (Δεληγιαννάκης et. al., 2010).

Ενώ πολλές διαφορετικές χρωματογραφικές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί, χρησιμοποιούνται μόνο μερικές στην Κτηνιατρική τοξικολογία (GC, LC, TLC).

Στάδια ανάλυσης:

- i. Προετοιμασία δείγματος
- ii. Εκχύλιση του δείγματος
- iii. Καθαρισμός του εκχυλίσματος
- iv. Συμπύκνωση του εκχυλίσματος
- v. Χρωματογραφική ανάλυση (ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός)
- vi. Ποσοστά ανάκτησης της ουσίας για αξιολόγηση της μεθόδου εκχύλισης

Η χρωματογραφία χρησιμοποιείται συνήθως για την ανίχνευση φαρμάκων, φυτοπροστατευτικών και άλλων οργανικών τοξικών ουσιών. Η Χρωματογραφία διαχωρίζει ενώσεις με βάση τις χημικές τους ιδιότητες, και οι διαχωρισμένες ενώσεις ανιχνεύονται κατόπιν ανάλυση για χημικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένου του υπεριώδους φωτός απορρόφηση, φθορισμό, οξείδωση / αναγωγή, ηλεκτρόνιο μεταφορά και βάρος μάζας, υγρό υψηλής απόδοσης κ.τ.λ. Η υγρή χρωματογραφία (HPLC) διαχωρίζει τις χημικές ουσίες των υγρών, ενώ η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) διαχωρίζει ενώσεις σε στερεή μήτρα και αέρια χρωματογραφία (GC) διαχωρίζει τις ενώσεις σε μια μήτρα αερίων. Η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC/MS) θεωρείται από πολλούς μέθοδος επιλογής για την ανίχνευση οργανικών ουσιών, αν και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC/MS) και η φασματομετρία μάζας σε σειρά (MS/MS) κερδίζουν δυναμική στον τομέα της αναλυτικής τοξικολογίας.



Εικόνα 2.2: Ανάλυση διαφόρων ουσιών με υγρή ή αέρια χρωματογραφία βάσει της πτητικότητας και πολικότητας αυτών (Steed, 2007)

2.2.3.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)

Ένας τύπος χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται συνήθως στην κτηνιατρική Τοξικολογία είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Θερμοευαίσθητες και μη πτητικές ενώσεις μπορούν να διαχωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Αμινοξέα, πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες, υδατάνθρακες, εντομοκτόνα, αντιβιοτικά, τροκτικοκτόνα και πολλά άλλα είδη χημικών ενώσεων είναι δυνατό να προσδιοριστούν με τη χρήση αυτής της μεθόδου.. Ανάλογα με την αλληλεπίδραση μεταξύ των 2 φάσεων εφαρμόζονται διαφορετικές χρωματογραφικές τεχνικές. Συγκεκριμένα:

- Ο διαχωρισμός χημικών ουσιών που δεν είναι πολικές απαιτεί τη χρήση χρωματογραφίας προσρόφησης.
- Ο διαχωρισμός πολικών ουσιών που δεν είναι ιόντα είναι δουλειά της χρωματογραφίας κατανομής.
- Για τον διαχωρισμό ιοντικών ουσιών χρησιμοποιείται η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων.
- Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ουσιών με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 10.000, η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Κουπάρης 2011).

2.2.3.1.1. Οργανολογία της HPLC

Τα βασικά τμήματα της HPLC είναι:

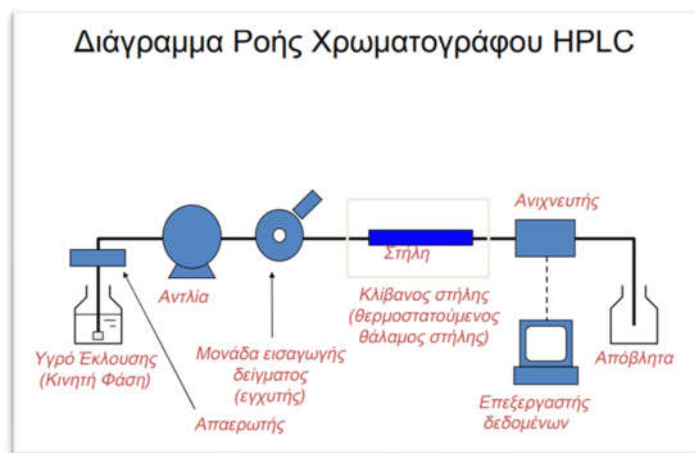
- Γυάλινοι περιέκτες φάσης και συστήματα επεξεργασίας διαλυτών,

- ii. αντλία υψηλής πίεσης,
- iii. συστήματα εισαγωγής δείγματος-δειγματολήπτης ,
- iv. στήλες υγροχρωματογραφίας
- v. απαερωτήρας degasser χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση διαλυμένων αερίων όπως το αζώτου για να διατηρείται σταθερή η πίεση
- vi. ανιχνευτές
- vii. Σύστημα επεξεργασίας / παρουσίασης αποτελεσμάτων

2.2.3.1.2. Υγροχρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης

Χωρίζονται σε υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης και υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed-Phase Liquid Chromatography - RPC), οι δύο κύριοι τύποι υγρής χρωματογραφίας που ορίζονται από τις σχετικές πολικότητες της κινητής και της στατικής φάσης. Το διοξείδιο του πυριτίου συνδεδεμένο με διάφορες ομάδες όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκοκτύλιο), φαινύλια, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.λπ. αποτελεί τη λιγότερο πολική στατική φάση, ενώ μείγματα οργανικών διαλυτών όπως η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο, μαζί με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα και νερό, αποτελούν την κινητή φάση. Είναι η τεχνική επιλογής για την Κτηνιατρική Τοξικολογία όπου το σύστημα δέχεται μη πολικές στήλες C18, C8, C3, phenyl κ.α..

Η RPC είναι, ο πιο διαδεδομένος τύπος υγρής χρωματογραφίας. Πάνω από το 90% των χρωματογράφων χρησιμοποιεί αυτόν τον τρόπο λειτουργίας. Η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μη πολικές, πολικές και ιονικά μόρια. Για δείγματα που περιέχουν μεγάλη ποικιλία ενώσεων, η έκλυση βαθμίδων χρησιμοποιείται συχνά.



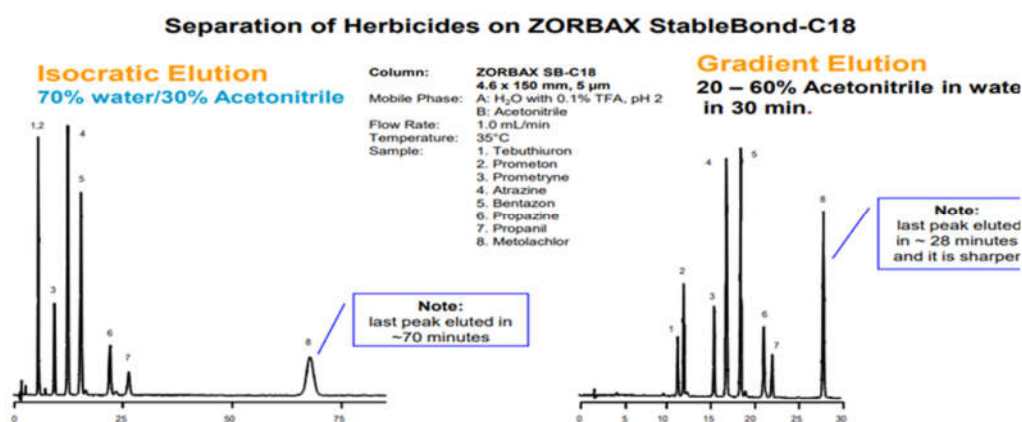
Εικόνα 2.3: Διάγραμμα ροής Χρωματογράφου HPLC (Πηγή: Ηλεκτρονικές σημειώσεις Κουμπάρης 2011)

2.2.3.1.3. Αρχή της μεθόδου

Η πίεση καθορίζει τις σχετικές ταχύτητες της στατικής και της κινητής φάσης, οι οποίες με τη σειρά τους καθορίζουν το βαθμό διαχωρισμού, όπου με πιέσεις κάτω από 1200 psi, επιτυγχάνεται το 80-90% των διαχωρισμών HPLC. Μείγματα νερού ή ρυθμισμένα υδατικά διαλύματα που περιέχουν διάφορους οργανικούς διαλύτες σε συνδυασμό με νερό, όπως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, διμεθυλοφορμαμίδιο, διοξάνιο ή διχλωροοξικό άλας, αποτελούν την κινητή φάση στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Η μελέτη πολύ πολικών ουσιών καθίσταται δυνατή με τη χρήση πολικών κινητών φάσεων, όπως το νερό. Η ισοκρατική έκλουση περιλαμβάνει τη διατήρηση σταθερής σύνθεσης της κινητής φάσης κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, ενώ η βαθμωτή έκλουση (Gradient elution) περιλαμβάνει την αλλαγή της σύνθεσης της κινητής φάσης με την πάροδο του χρόνου (Εικόνα 3.7).

Η υγροχρωματογραφία ενδείκνυται στην ανίχνευση καρβαμιδικών παρασιτοκτόνων και των μεταβολιτών τους, αντιπηκτικών τρωκτικοκτόνων, φαρμάκων, φυτοτοξινών, ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους όπως πρωτεΐνες κ.α..

Η κινητή φάση συχνά περιέχει χαμηλές συγκεντρώσεις τροποποιητών, όπως οξικό ή μυρμηκικό οξύ και άλλα ρυθμιστικά που περιέχουν φωσφορικό ή οξικό, που βελτιώνουν το σχήμα κορυφής και το πλάτος καθώς παρέχουν δυνατότητες καλύτερου διαχωρισμού. Η στατική φάση αποτελείται από λεπτά σωματίδια επικαλυμμένα με προσροφητικό υλικό τα σωματίδια όπως ρητίνες κτλ. προσροφητικά μέσα βρίσκονται σε στήλες πληρωτικού υλικού διαμέτρου 1-4.6 mm και μήκους 50-250 mm (Filigenzi, 2018).



Εικόνα 2.4: Διαφορετική εμφάνιση κορυφών κατά την ισοκρατική και Gradient έκλουση (Πηγή: Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC) Courtesy of Agilent Technologies, Inc).

Σύμφωνα με τον Swartz (2010), η υγρή χρωματογραφία (HPLC) χρησιμοποιεί μια ποικιλία ανιχνευτών, καθένας από τους οποίους χρησιμοποιεί ένα μοναδικό σύνολο χαρακτηριστικών όπως περιγράφεται αμέσως παρακάτω (Swartz, 2010):

- Οποιοδήποτε ιδιότητα της ύλης ή διαφορική μέτρηση
- Μία χαρακτηριστική ιδιότητα της υπό μελέτη ουσίας
- Διαφοροποιήσεις της κινητής φάσης.
- Χειρισμός διαφορετικών τεχνικών

2.2.3.1.4. Ανιχνευτές

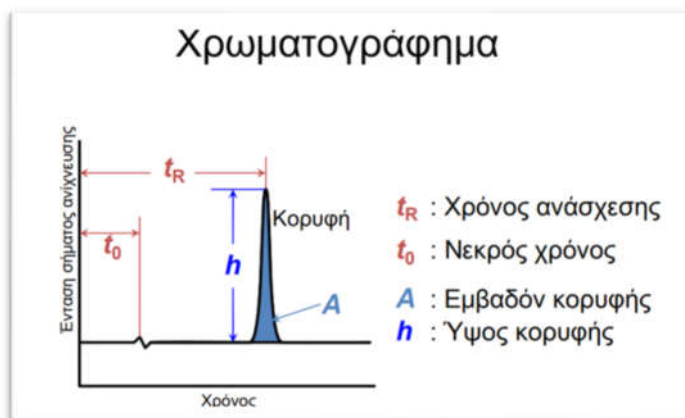
Οι ανιχνευτές είναι: Ανιχνευτής UV/VIS, Ανιχνευτής Light Scattering ή (ELSD), Ανιχνευτής Corona discharge, Ανιχνευτής EC, Ανιχνευτής FL, Ανιχνευτής RI, Ανιχνευτής DAD και σε συνδυασμό όπως HPLC-UV/DAD και φασματογράφος μάζας (MS). Στην Κτηνιατρική Τοξικολογία βρίσκουν εφαρμογή ο UV/VIS, ο ανιχνευτής FLD και ο ανιχνευτής DAD.

Ορισμένες ενώσεις έχουν την ιδιαίτερη ιδιότητα του φθορισμού, η οποία τους επιτρέπει να απελευθερώνουν αυτοβούλως ακτινοβολία όταν εκτίθενται σε υπεριώδες φως. Αυτοί οι ανιχνευτές χρησιμοποιούν φως υψηλής έντασης συγκεκριμένου μήκους κύματος για να διεγείρουν ένα μόριο της ουσίας σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Η αναλυόμενη ουσία κατά την επαναφορά της στη προηγούμενη ενεργειακή κατάσταση, εκπέμπει φως σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Βασικό στοιχείο είναι οι ουσίες να έχουν τη δυνατότητα να φθορίζουν. Οι ανιχνευτές φθορισμού είναι πιο ευαίσθητοι από τους ανιχνευτές UV, αλλά παρουσιάζουν μεγάλη εκλεκτικότητα, αφού οι περισσότερες ουσίες δε φθορίζουν. Σε αυτή τη περίπτωση μετατρέπονται οι ουσίες σε φθορίζουσες (παράγωγα αγωγιμότητας) με τη προσθήκη μιας αρωματικής δομής που τις καθιστά φθορίζουσες πριν την ανίχνευση.

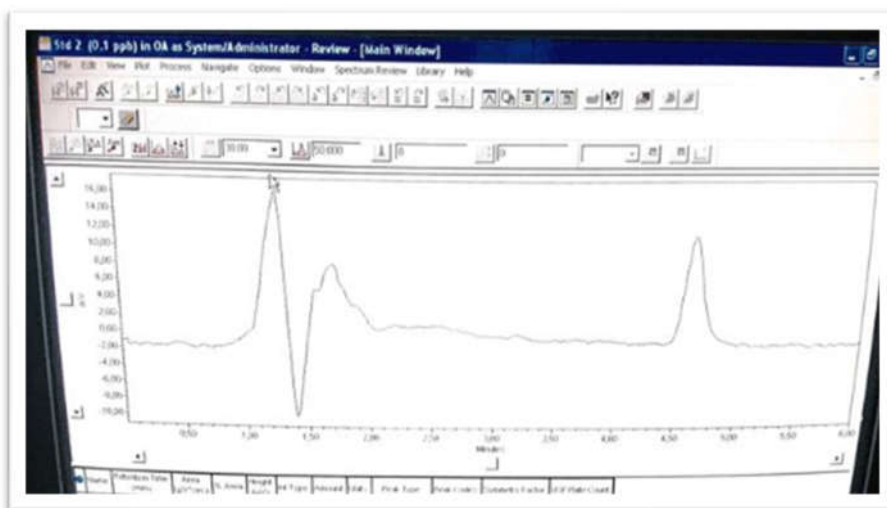
Ο ανιχνευτής DAD διαφέρει από τον ανιχνευτή UV στο ότι μπορεί να ανιχνεύσει την απορρόφηση σε μεγαλύτερο εύρος μηκών κύματος. Πολλές φωτοδίοδοι, η καθεμία με ένα μοναδικό μήκος κύματος, σκεδάζουν το φως από τη λυχνία καθώς πέφτει απευθείας στο δείγμα σε έναν ανιχνευτή DAD. Με κάθε σάρωση 6 δευτερολέπτων, ο ανιχνευτής βελτιώνει την ειδικότητα και την πληροφορία κατά 225-450 nm.

2.2.3.1.5. Χρωματογράφημα

Τα χρωματογραφήματα παρέχουν μια οπτική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης. Τόσο οι ποσοτικές όσο και οι ποιοτικές αναλύσεις μπορούν να αξιοποιηθούν από το χρωματογράφημα. Τα συστατικά του δείγματος αναγνωρίζονται από τις θέσεις των κορυφών σε σχέση με τον άξονα του χρόνου. Εμφανίζεται επίσης η επιφάνεια ή το ύψος κορυφής, το οποίο αποτελεί ποσοτικό μέτρο κάθε συστατικού με βάση τη συγκέντρωση ή τη μάζα..



Εικόνα 2.5: Χρωματογράφημα (Πηγή: ηλεκτρονικές σημειώσεις Κουμπάρης, Κεφ. 20B Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) 2011)



Εικόνα 2.6:Χρωματογράφημα HPLC-FLD Εργαστηρίου

2.2.3.1.6. Σύζευξη της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών (LC-MS)

Όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας, η υγρή χρωματογραφία είναι μια ισχυρή αναλυτική τεχνική. Εκτός από τον προσδιορισμό της δομής άγνωστων χημικών ουσιών, η μέθοδος αυτή είναι δημοφιλής επειδή μπορεί να προσδιορίσει μη πτητικές ενώσεις, θερμοευαίσθητες ενώσεις (τις οποίες η GC-MS δεν μπορεί να ανιχνεύσει) και τη χρωματογραφική καθαρότητα των κορυφών.

Έτσι, συνδυάζοντας τις δύο μεθόδους, μπορεί να επιτευχθεί αυξημένη εκλεκτικότητα σε δείγματα με πολύπλοκη μήτρα. Αυτό επιτυγχάνεται με την εισαγωγή των διαχωρισμένων ουσιών του μείγματος στο φασματόμετρο μάζας, γεγονός που επιτρέπει την αξιόπιστη ταυτοποίηση ακόμη και σε περιπτώσεις όπου ο διαχωρισμός είναι ατελής, καθώς ουσίες με παρόμοιους χρόνους κατακράτησης θα παρουσιάζουν διαφοροποίηση στα φάσματα μάζας. Η υγρή χρωματογραφία και η φασματομετρία μάζας συνεργάζονται για να διαχωρίσουν τις ενώσεις με βάση το χρόνο κατακράτησης και στη συνέχεια να τις ταυτοποιήσουν (m/z) όταν φτάσουν στο φασματόμετρο μάζας (MS) ενώ είναι ακόμη διαχωρισμένες.

2.2.3.1.7. Ιονισμός με ηλεκτροδιάχυση (Electron Spray Ionization)

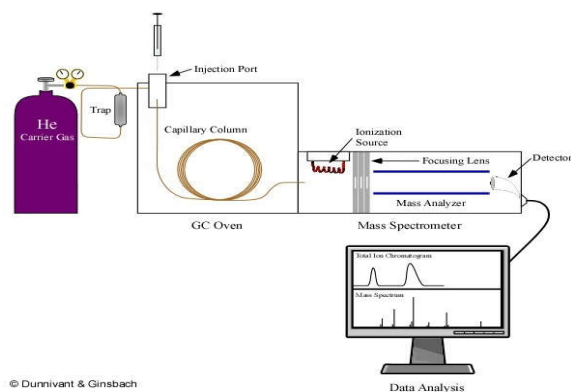
Η ηλεκτροψεκασμός είναι η μέθοδος ιονισμού που χρησιμοποιείται συνήθως στο HPLC-MS. Ο εκλούμενος διαλύτης που εισέρχεται από την υγρή χρωματογραφία στο MS κυμαίνεται από 0,1 και 0,5 mL / λεπτό διαχέεται κατά την εξάχνωση σε ποσότητες που δεν μπορούν να ανταποκριθούν οι αντλίες κενού. Η αρχή του Ηλεκτροψεκασμού (ESI) βασίζεται στην εισαγωγή μιας τριχοειδούς στήλης την “capillary” από ανοξείδωτο χάλυβα ανάμεσα σε LC και MS. Η ηλεκτρική τάση που εφαρμόζεται στη στήλη μετατρέπει το διαλύτη σε φορτισμένα σταγονίδια. Το ηλεκτρικό φορτίο βοηθά στο ιονισμό μορίων εντός των σταγονιδίων ενώ οι διαλύτης από την κινητή φάση HPLC εξατμίζεται μεταξύ της στήλης και του φασματόμετρου μαζών. Ως αποτέλεσμα της αδυναμίας της επιφανειακής τάσης να συγκρατήσει το φορτίο και της λεγόμενης σχάσης Coulomb, τα ιόντα μεταβαίνουν κινητικά και ενεργειακά στην αέρια φάση όταν η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου στη φορτισμένη σταγόνα υπερβαίνει ένα οριακό σημείο, το σημείο Rayleigh (Ho et al. 2003). Κατά αυτό τον τρόπο, μηδενίζονται τα προβλήματα υγρασίας και παρέχονται συγχρόνως άθικτα φορτισμένα ιόντα. Διαφέρει σημαντικά η τεχνική σε σχέση με τον

Ιονισμό ηλεκτρονίων (EI) στο γεγονός ότι έχουμε άθικτα ιοντισμένα μόρια χωρίς κατακερματισμό όπως στον (EI). Έτσι έχουμε ταυτοποίηση μορίου με μόνο ένα m/z . Επειδή τα περισσότερα μόρια με το ίδιο μοριακό βάρος θα δώσουν το ίδιο ιόν, χρησιμοποιείται τριπλό τετράπολο στους αναλυτές μαζών για μεγαλύτερη εκλεκτικότητα.

2.2.3.2. Αέρια Χρωματογραφία (GC)

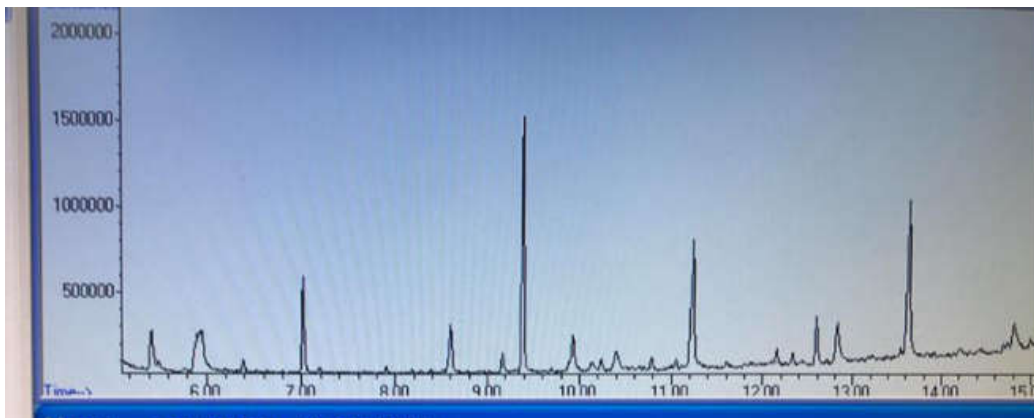
Η πιο γνωστή τεχνική διαχωρισμού είναι η αέρια χρωματογραφία (GC) λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών της, που περιλαμβάνουν μεγάλη εκλεκτικότητα, ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα. Η μέθοδος δημιουργήθηκε το 1952 από τους Martin και James και ο αρχικός αέριος χρωματογράφος έγινε διαθέσιμος προς αγορά το 1959. Οι χημικές ουσίες πρέπει να είναι πτητικές ή να έχουν τη δυνατότητα να γίνουν πτητικές και χρησιμοποιείται κυρίως σε αναλυτική κλίμακα, δηλαδή για ποσότητες δείγματος κάτω από 10^{-6} g ή 1 μ g/συστατικό. Οι εφαρμογές του κυμαίνονται από την ποσοτική (ποσοτική ανάλυση) έως την ποιοτική (ταυτοποίηση) έρευνα. Η αέρια χρωματογραφία βασίζεται στην αρχή του διαχωρισμού των πτητικών συστατικών του δείγματος σε μια κινητή φάση/αέριο-φορέα και έναν μη πτητικό διαλύτη (στατική φάση). Είναι δυνατή τόσο η στερεή όσο και η υγρή μορφή της στατικής φάσης (GLC).

Η τεχνική είναι κατάλληλη για σχετικά πτητικές, θερμικά σταθερές και όχι σημαντικά πολικές ουσίες. Είναι μέθοδος επιλογής για ανίχνευση ουσιών όπως οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα, οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα, PCB, μερικά αλκαλοειδή φυτών, μερικούς διαλύτες, μερικά φάρμακα, βενζίνη, αρωματικούς υδρογονάνθρακες.



Εικόνα 2.7: Σχηματική παράσταση Αέριος χρωματογραφία/ Φασματογραφία/ Βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (GC/MS/EI) (Dunnivant & Ginsbach 2008)

Η απεικόνιση της χρωματογραφικής ανάλυσης στην αέρια χρωματογραφία γίνεται υπό μορφή κορυφών.



Εικόνα 2.8: Χρωματογράφημα GC-MS Εργαστηρίου

2.2.4. Φασματομετρία μαζών (MS)

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια τεχνική που στηρίζεται στο διαχωρισμό των ιόντων του δείγματος κατά την θέρμανση (ιονίζονται). Το δείγμα στη συνέχεια διαχωρίζεται τα ιόντα σύμφωνα με τους δείκτες μάζας-φορτίου. Η αέρια και η υγρή χρωματογραφία κάνουν εκτεταμένη χρήση του φασματομετρικού ανιχνευτή μάζας λόγω της μεγάλης επιλεκτικότητάς του. Η φασματομετρία μάζας λειτουργεί πρώτα με την παραγωγή ιόντων (συνήθως θετικών) μιας ουσίας, στη συνέχεια με το διαχωρισμό τους βάσει του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z) και, τέλος, με την αποθήκευση των αποτελεσμάτων τους. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να διαπιστωθεί ο δεσμός μεταξύ των διαφόρων ομάδων και το μοριακό βάρος (MB) της ένωσης. Επειδή στις περισσότερες κτηνιατρικές τοξικολογικές αναλύσεις το φορτίο είναι 1 έτσι το m/z θα είναι ισοδύναμο με τη μάζα ή το μοριακό βάρος του ιόντος. Αυτή είναι η βάση μιας από τις πιο σημαντικές τεχνικές στην αναλυτική χημεία. Επειδή η μάζα ενός μορίου υπολογίζεται προσθέτοντας το ατομικό βάρος καθενός από τα άτομα στο μόριο, έτσι, το μοριακό βάρος σχετίζεται άμεσα με την ατομική σύνθεση της ένωσης. Επίσης παρέχονται πληροφορίες για τη δομή του μορίου.

Technique	Advantages	Disadvantages	Appropriate Types of Analytes	Typical Analyses
Atomic absorption spectrophotometry	Quick setup. Relatively simple inexpensive instrument	Can only analyze for one element at a time	Most elements in the periodic table	Lead
ICP-OES	Fast multielement detection	Less sensitive than ICP-MS	Most elements in the periodic table	Various multielement tests
ICP-MS	Fast multielement detection, very sensitive	Instrument is more expensive and complex than ICP-OES	Most elements in the periodic table	Various multielement tests
Ion chromatography	Relatively simple, inexpensive instrumentation. Adequate sensitivity for most uses	Low level analysis in complex matrices may be difficult due to lack of selectivity	Small ionic atoms and molecules	Nitrate, halogens such as chloride and bromide
GC with ECD	Relatively simple, inexpensive instruments. Very sensitive for halogenated compounds. Provides accurate quantitation	Not as selective as mass spectrometry. May require second analysis for high confidence in identification	Halogenated organic chemicals which are nonpolar, volatile or semivolatile, and not thermally labile	Organochlorine pesticides, PCBs, some pyrethroids
GC with FPD	Relatively simple, inexpensive instrument. Very sensitive for compounds containing phosphorus or nitrogen. Provides accurate quantitation	Not as selective as mass spectrometry. May require second analysis for high confidence in identification	Organic chemicals containing phosphorus or nitrogen which are nonpolar, volatile or semivolatile, and not thermally labile	Organophosphate pesticides
HPLC with UV and/or fluorescence	Simple, relatively inexpensive equipment. Good sensitivity for some compounds. Provides accurate quantitation	Selectivity is dependant on the structure of the analyte. Sensitivity varies. May require second analysis for confirmation. May require complex sample preparation including cleanup steps	Most organic chemicals	Mycotoxins, anticoagulant rodenticides, vitamins, ionophore antibiotics (with post column derivatization)
GC-MS	Mature technology. Excellent selectivity. Can be quite sensitive depending on the analysis. No confirmation analysis is usually required. Provides accurate quantitation. Nontargeted analysis is possible	Works poorly for polar, nonvolatile, and thermally labile compounds. Fairly expensive instruments. Data interpretation for nontargeted screening can be complex and time consuming	Organic chemicals which are fairly nonpolar, volatile or semivolatile, and not thermally labile	Strychnine, metaldehyde, various types of pesticides, alkaloids, some types of drugs, ethylene glycol (after derivatization), nontargeted GC-MS screens
LC-MS/MS	Extremely sensitive and selective. Useful for a very broad range of compounds. No confirmation analysis is usually required. Can provide accurate quantitation	Complex, very expensive equipment. Requires specialized training to use the instrumentation and to properly interpret data. Analysis must be targeted for specific analytes. Quantitative analysis is often complicated	Organic chemicals which are sufficiently acidic or basic to attract a proton or to lose one	Pesticides, alkaloids, anticoagulant rodenticides, algal toxins, mycotoxins, drugs of abuse, antibiotics, amantins, cardiotoxic glycosides, metabolites of drugs and toxicants

Εικόνα 2.9: Μέθοδοι και τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα στην Κτηνιατρική Τοξικολογία (Filigenzi 2018)

2.2.5. Παρασκευή δείγματος για οργανική ανάλυση

Η περίπλοκη φύση της ανάλυσης οργανικών ουσιών αντικατοπτρίζεται στην ευρεία σειρά τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία του δείγματος. Σε γενικές γραμμές, ο στόχος της προετοιμασίας του δείγματος στην κτηνιατρική τοξικολογία είναι η εκχύλιση των ενώσεων από το δείγμα σε κατάλληλο διαλύτη για τη διεξαγωγή της αναλυτικής τεχνικής. Το πρώτο βήμα αυτής της διαδικασίας περιλαμβάνει την ομογενοποίηση και ρευστοποίηση του δείγματος με ένα διαλύτη, όπως νερό, μεθανόλη, ή κάποιο άλλο οργανικό διαλύτη. Κατά αυτό τον τρόπο μπορεί η προς ανάλυση ουσία να διαχωριστεί από το δείγμα, ενώ το προϊόν της εκχύλισης ενδέχεται να χρειάζεται διαδικασία καθαρισμού ώστε να απομακρύνονται τυχόν προσμίξεις που παρεμποδίζουν την ανίχνευση ή/ και τη διαδικασία συμπύκνωσης ώστε να επιτευχθεί χαμηλότερο όριο ανίχνευσης.

2.2.5.1. Ομογενοποίηση

Τα περισσότερα δείγματα ιστού έχουν ως κύριο συστατικό το νερό. Τα περισσότερα φυτοφάρμακα είναι σε κάποιο βαθμό λιποδιαλυτά σε οργανισμούς-διαλύτες, οπότε το πρόβλημα έγκειται στην απομόνωσή τους από το υδατικό τους περιβάλλον και τη μη

αντίδραση μεταξύ τους. Ο ιστός τεμαχίζεται ώστε να έρθει όσο το δυνατό μεγαλύτερη επιφάνειά του σε επαφή με το διαλύτη. Ο διαλύτης επιλέγεται με βάση τη φύση της ουσίας προς ανίχνευση και της μήτρας (υπόστρωμα). Τυπικοί διαλύτες εκχύλισης είναι το ακετονιτρίλιο, το εξάνιο, ο πετρελαϊκός αιθέρας, ο διεθυλαιθέρας, το τολουένιο, το διχλωρομεθάνιο κ.α.

Σύμφωνα με πλήθος ερευνητικών μελετών, μέθοδοι όπως η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE), η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME), η απορροφητική εκχύλιση με ράβδο ανάδευσης (SBSE), η διασπορά στερεάς φάσης μήτρας (MSPD), η μικροεκχύλιση μονής σταγόνας (SDME), η χρωματομετρία, η υπερκρίσιμη εκχύλιση με υγρό, η εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (MAE), η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων και η διασπορά στερεάς φάσης μήτρας (MSPD) θεωρούνται οι πιο θεμελιώδεις διαδικασίες προετοιμασίας δειγμάτων για τις μεθόδους ενόργανης χημικής ανάλυσης (Xu, et al., 2014- Beyer & Biziuk, 2008- Retamal, et al., 2013). Στην Κτηνιατρική Τοξικολογία βρίσκουν εφαρμογή η Liquid-liquid extraction (LLE), η Solid phase extraction (SPE) και η QuEChERS Extraction.

2.2.5.2. Υγρή εκχύλιση υγρών (Liquid-liquid extraction (LLE))

Οι δύο φάσεις αποτελούνται συνήθως από υδατικούς και οργανικούς διαλύτες. Η μη αναμειξιμότητα των υγρών τα κάνει να διαχωρίζονται σε δύο στρώματα, το χαμηλότερο από τα οποία είναι το πυκνότερο υγρό. Αν και ήταν παρούσα μόνο στη μία φάση κατά την εκχύλιση, η χημική ουσία είναι τώρα παρούσα και στις δύο. Οι ημιυδατικοί διαλύτες π.χ. ακετόνη παραλαμβάνουν σχεδόν όλα τα φυτοπροστατευτικά αλλά ταυτόχρονα και πολλά άλλα συστατικά του υποστρώματος, το εξάνιο δίνει καθαρότερο δείγμα δεν έχει όμως μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα σε αντίθεση με τον διεθυλ-αιθέρα που εκχυλίζει όλα τα φυτοφάρμακα αλλά είναι εύφλεκτο και το τελικό έκλουσμα έχει πολλές προσμίξεις. Στην πράξη χρησιμοποιούνται πολλοί συνδυασμοί διαλυτών στην (LLE).

2.2.5.3. Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

Ένα σημαντικό βήμα στην ανάπτυξη της SPE, μιας μεθόδου που χρησιμοποιείται ευρέως για τον διαχωρισμό οργανικών χημικών ουσιών, ήταν η εισαγωγή το 1991 των μικροσωλήνων άνθρακα, οι οποίοι είναι σύριγγες με διάμετρο έως 2,2 nm. Λόγω της μεγάλης αποδοτικότητας και της μειωμένης χρήσης διαλυτών σε σύγκριση με την παραδοσιακή LLE, η SPE χρησιμοποιείται επίσης για το διαχωρισμό φυτοφαρμάκων από

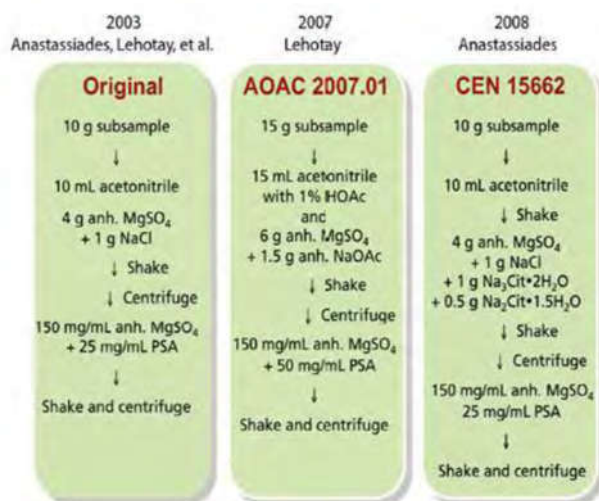
διάφορα υποστρώματα (Ravelo-Pérez et al. 2010). Η SPE είναι μια παραλλαγή της υγρής χρωματογραφίας με πληρωτικό υλικό παρόμοιο με το πληρωτικό υλικό των στηλών της HPLC. Το πληρωτικό υλικό δεσμεύει την προς ανάλυση ουσία η οποία στη συνέχεια εκλύεται με τη διέλευση άλλου διαλύτη. Η χρήση της μειώνει σημαντικά το χρόνο κατεργασίας.

III. Μέθοδοι καθαρισμού δείγματος προς ανάλυση (Clean-up)

Εκχυλισμένα δείγματα κυρίως δηλητηριασμένα δολώματα που έχουν μεγάλη συγκέντρωση δραστικής ουσίας δε χρειάζεται να υποστούν καθαρίσμα κατά την αραιώση πριν την ανάλυση. Εκχυλίσματα του περιεχομένου του στομάχου, αίματος και ούρου απαιτούν διαφορετικές ποσότητες καθαρισμού ανάλογα με τη μέθοδο ανάλυσης. Εκχυλίσματα από νεκρές μέλισσες ενδέχεται να περιέχουν πολύ μικρές συγκεντρώσεις δραστικής ουσίας, οπότε απαιτείται το στάδιο του καθαρισμού. Η χρήση της επέτρεψε στην ανίχνευση μορίων με μοριακό βάρος <500 (Tindle & Stalling 1972, Parris 2000). Η χρήση ταυτόχρονα δυο διαλυτών διαφορετικής πολικότητας επιφέρει διαχωρισμό φυτοφαρμάκων μικρής πολικότητας με ουσίες που παρεμποδίζουν την ανάλυση.

IV. Εκχύλιση QuEChERS

Οι Anastassiades et al. (2003) δημιούργησαν τη μέθοδο QuEChERS, η οποία σημαίνει "Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe" (2003). Εκτός από τον άνθρακα GCB, μια άλλη εναλλακτική λύση είναι η προσθήκη (C-18) για την απομάκρυνση των χρωστικών ουσιών, ιδίως της χλωροφύλλης, και των λιπαρών ενώσεων από το εκχύλισμα.



Εικόνα 2.10: Οι παραλλαγές της μεθόδου QuEChERS. (Lehotay et al 2010)

2.3.Επικύρωση μεθόδων

Η ΕΕ προκειμένου να εξασφαλίσει την αξιοπιστία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων και την διασφάλιση της αντιπροσωπευτικότητας τους, έχει προβεί στη σύνταξη κανονισμών και οδηγιών, των οποίων η εφαρμογή κομμάτι-κομμάτι, εξασφαλίζει, στο μέτρο το δυνατό αυτή. Στην συγκεκριμένη οδηγία περιγράφονται όλες οι απαιτήσεις που εξασφαλίζουν την εγκυρότητα και την ακρίβεια των δεδομένων και των αποτελεσμάτων, έτσι ώστε να μην επιδέχεται αμφισβήτηση ενός εργαστηριακού αποτελέσματος. Το σύνολο αυτών των κανόνων, από τη στιγμή που εφαρμόζεται σε ένα εργαστήριο, είναι γνωστό και ως επικύρωση της μεθόδου ανάλυσης. Οι κύριοι στόχοι περιλαμβάνουν την παροχή ενός οικονομικά αποδοτικού συστήματος διασφάλισης και ελέγχου της ποιότητας, διασφαλίζουν την συγκρισιμότητα και τη ακρίβεια των αναλυτικών αποτελεσμάτων και αποφεύγουν την έκδοση ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων συμμορφούμενοι στο πρότυπο διαπίστευσης (ISO/IEC 17025) και την υποστήριξη της συμμόρφωσης με τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων. Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συμμορφώνονται επίσης με τους σχετικούς κανόνες της ΕΕ ή με διεθνώς αναγνωρισμένα πρωτόκολλα (Reynolds, 2024).

2.3.1. Δειγματοληψία

Όλες κατευθυντήριες γραμμές των οδηγιών ή κανονισμών που ασχολούνται με την αξιοπιστία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων δέχονται το γεγονός ότι η δειγματοληψία, είναι το πρώτο κομμάτι που πρέπει να εξασφαλίζει ότι το εργαστηριακό δείγμα είναι αντιπροσωπευτικό της παρτίδας που ελέγχεται για την παρουσία κάποιων φαρμάκων. Έτσι λοιπόν πρέπει να εφαρμόζονται κατευθυντήριες γραμμές τόσο για τη δειγματοληψία όσο και τη μεταφορά, την ιχνηλασιμότητα και την αποθήκευση των εργαστηριακών δειγμάτων. Σύμφωνα λοιπόν με την οδηγία 2002/63/EK τα δείγματα τροφίμων πρέπει να λαμβάνονται σύμφωνα με συγκεκριμένους κανόνες που στην περίπτωση των ζωοτροφών περιγράφονται από τον βασικό κανονισμό 152/2009/EK ή όποια νομοθεσία τον αντικαθιστά.

Ως μέθοδος δειγματοληψίας, εάν δεν είναι δυνατή η τυχαία λήψη πρωτογενών δειγμάτων εντός μιας παρτίδας καταγράφεται η συλλογή νομίμων επισήμων εργαστηριακών δειγμάτων που αντιπροσωπεύουν ολόκληρη την παρτίδα ή την αποστολή. Βασικός κανόνας είναι ότι τα δείγματα μεταφέρονται μόνο σε καθαρά δοχεία και υπό κατάλληλες

συνθήκες και εντός του απαραίτητου χρονικού διαστήματος που εξασφαλίζει την μη καταστροφή του δείγματος. Επί παραδείγματι, για δειγματοληψία υποκαπνιστικών προϊόντων θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σάκοι χαμηλής διαπερατότητας, ενώ όταν πρόκειται για νωπά προϊόντα θα πρέπει ιδανικά να εξασφαλίζεται η μεταφορά τους στο εργαστήριο εντός μίας ημέρας από τη συλλογή, με σαφή σήμανση, ικανή να διασφαλίζει την ιχνηλασιμότητα. Η διασφάλιση προϋποθέτει και την χρήση, από το εργαστήριο, μοναδικού κωδικού αριθμού που θα αντιστοιχεί στο λαμβανόμενο δείγμα και θα συσχετίζεται με την ανάλυση και τα αποτελέσματα. Κάθε εργαστηριακό δείγμα πρέπει να δίνεται ένας μοναδικός κωδικός. Το εργαστήριο, εξασφαλίζει, πέρα από τη σωστή και έγκυρη ανάλυση και την αποθήκευση κάτω από όρους και προϋποθέσεις που εξασφαλίζουν ότι τα φάρμακα τα οποία πρέπει να ανιχνευθούν, εάν φυσικά υπάρχουν, δεν χάνουν την δραστηκότητά τους, με την πάροδο του χρόνου. Αυτό εξασφαλίζεται με τη σωστή φύλαξη, σε θερμοκρασίες, τις περισσότερες των περιπτώσεων, κατάψυξης (κάτω από -18°C) (Reynolds, 2024).

2.3.2. Ανάλυση δειγμάτων

Η οδηγία SANTE 11312/2021, στην επόμενη ενότητά της περιγράφει συγκεκριμένες κατευθυντήριες γραμμές τόσο για την προετοιμασία, όσο και για την επεξεργασία, την εκχύλιση, τον καθαρισμό και τις τεχνικές συγκέντρωσης/ανασύστασης δειγμάτων που θα εξασφαλίζουν ότι οι αναλύσεις υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, δίνουν αποτελέσματα, αντιπροσωπευτικά της πραγματικής (εάν έχει γίνει) χρήσης.

Το εργαστήριο που είναι επιφορτισμένο με την ανάλυση πρέπει να διασφαλίζει αφενός ότι η επεξεργασία των δειγμάτων πρέπει να γίνεται εντός του συντομότερου δυνατού χρόνου για τη μείωση της αποσύνθεσης των δειγμάτων και των απωλειών φυτοφαρμάκων και αφετέρου ότι οποιαδήποτε επεξεργασία και υποδειγματοληψία πριν από οποιαδήποτε ορατή αλλοίωση, γίνεται υπό το πρίσμα του παραρτήματος I του κανονισμού 396/2005/EK. Το εργαστήριο θα πρέπει να είναι σε θέση να μπορεί να αποδείξει ότι οι διαδικασίες επεξεργασίας και αποθήκευσης των δειγμάτων δεν επηρεάζουν σημαντικά τα υπολείμματα που υπάρχουν στο δείγμα (οδηγία 2002/63/EK). Πολλές φορές όταν υπάρχουν ενδείξεις ότι ο τεμαχισμός (κοπή και ομογενοποίηση) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επηρεάζει σημαντικά την αποικοδόμηση ορισμένων υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, η ομογενοποίηση των δειγμάτων λαμβάνει χώρα σε χαμηλή θερμοκρασία (π.χ. κατεψυγμένα ή/και παρουσία ξηρού πάγου).

Σε σχέση με την εκχύλιση των προϊόντων που έχουν χαμηλά ποσοστά υγρασίας (π.χ. δημητριακά, μπαχαρικά, αποξηραμένα βότανα), απαιτείται ομογενοποίηση του δείγματος σε κόκκους μικρότερης από 1mm διαμέτρου, με την μέθοδο της λειοτρίβησης και χωρίς εκτεταμένη θέρμανση η οποία μπορεί και να συντελεί στην διάσπαση συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων. Ένα εργαστήριο, πρέπει να εξασφαλίζει, ότι τα κλάσματα στο αναλυτικό τμήμα της δοκιμής βρίσκονται στην ίδια αναλογία με το αρχικό εργαστηριακό δείγμα κατά την ομογενοποίηση ή την άλεση (Reynolds, 2024).

2.3.2.1. Καθαρισμός δειγμάτων

Τα υπολείμματα που υπάρχουν στα δείγματα εκχυλίζονται με χαμηλότερη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με την εκχύλιση αναλυτών από δείγματα που έχουν προστεθεί. Για να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, συνιστάται η εισαγωγή νερού σε προϊόντα χαμηλής υγρασίας πριν από την εκχύλιση. Επιπλέον, είναι σκόπιμο να αξιολογηθεί η επίδραση της διάρκειας ανάδευσης στην απώλεια αναλυτών. Για τον διαχωρισμό των αλάτων, παρέχετε νερό είτε πριν είτε κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης και ρυθμίστε το pH εάν η προδιαγραφή υπολειμμάτων περιλαμβάνει εστέρες ή συζεύγματα που δεν μπορούν να αναλυθούν άμεσα. Για την ενίσχυση της εκλεκτικότητας και της ευρωστίας, μπορεί να είναι απαραίτητη η ενσωμάτωση διαδικασιών καθαρισμού ή αραίωσης προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι παρεμβολές μήτρας και η μόλυνση στο σύστημα του οργάνου. Ωστόσο, η συμπερίληψη μιας διαδικασίας καθαρισμού σε μια τεχνική πολλαπλών υπολειμμάτων μπορεί να οδηγήσει στην εξάντληση ορισμένων φυτοφαρμάκων. Για να αποφευχθούν οι απώλειες κατά τα στάδια εξάτμισης, συνιστάται η διατήρηση χαμηλής θερμοκρασίας και η χρήση μιας μικρής ποσότητας διαλύτη με υψηλό σημείο βρασμού ως "φύλακα". Για να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού και ο υπερβολικός βρασμός κατά τη διαδικασία εκχύλισης, συνιστάται η χρήση ξηρού αζώτου ή φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό για εξάτμιση μικρής κλίμακας. Αξιολογήστε τη σταθερότητα του αναλύτη κατά τη διαδικασία επικύρωσης της τεχνικής και διατηρήστε τα εκχυλίσματα σε ψυγείο ή καταψύκτη για να ελαχιστοποιήσετε την αλλοίωση (Reynolds, 2024).

2.3.2.2. Χρωματογραφικός διαχωρισμός

Τα φυτοφάρμακα σε δείγματα τροφίμων και ζωοτροφών προσδιορίζονται και ποσοτικοποιούνται με τη χρήση τριχοειδούς αέριας χρωματογραφίας (GC) ή/και υγρής

χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC ή UPLC) σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (MS). Χρησιμοποιούνται διάφορα συστήματα ανίχνευσης MS, συμπεριλαμβανομένων του ιονισμού με ηλεκτρόνια, του χημικού ιονισμού, του χημικού ιονισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση και του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό. Χρησιμοποιούνται διάφοροι τρόποι απόκτησης. Οι κλασικοί ανιχνευτές για GC και LC προσφέρουν περιορισμένη εξειδίκευση και δεν παρέχουν αναμφίβολη ταυτοποίηση. Αυτοί οι περιορισμοί μπορεί να είναι αποδεκτοί για συχνά απαντώμενα φυτοφάρμακα, αλλά πρέπει να αναγνωρίζονται κατά την αναφορά των αποτελεσμάτων.

2.3.2.3. Απαιτήσεις ποσοτικοποίησης

Το επίπεδο βαθμονόμησης (LCL) για ένα σύστημα προσδιορισμού πρέπει να είναι ίσο ή χαμηλότερο από το όριο αναφοράς (RL), το οποίο δεν πρέπει να είναι χαμηλότερο από το ελάχιστο όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification – LOQ). Τα πρότυπα βαθμονόμησης εγχέονται στην αρχή και στο τέλος μιας ακολουθίας δειγμάτων και εάν η απόκλιση μεταξύ δύο εγχύσεων υπερβαίνει το 30%, τα δείγματα που περιέχουν υπολείμματα φυτοφαρμάκων πρέπει να αναλύονται εκ νέου. Η προετοιμασία του συστήματος GC ή LC πρέπει να πραγματοποιείται αμέσως πριν από την πρώτη σειρά προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης με την απόκριση του ανιχνευτή από τους αναλυτές στο εκχύλισμα του δείγματος να είναι προϋπόθεση να βρίσκεται εντός του εύρους των αποκρίσεων από τα πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης που εγχύθηκαν. Είναι, σύμφωνα με την SANTE 11312/2021 προτιμητέα η βαθμονόμηση πολλαπλών επιπέδων και η απόκλιση των συγκεντρώσεων από τις πραγματικές να μην υπερβαίνει $\pm 20\%$. Σε αντίθεση με τη βαθμονόμηση πολλαπλών σημείων η βαθμονόμηση ενός επιπέδου μπορεί να παρέχει ακριβή αποτελέσματα εάν η απόκριση του ανιχνευτή του αναλύτη στο εκχύλισμα του δείγματος είναι κοντά στην απόκριση του προτύπου βαθμονόμησης ενός επιπέδου (Reynolds, 2024).

Όταν είναι δυνατόν, σύμφωνα πάντα με την SANTE 11312/2021, τα εργαστήρια πρέπει να μετρούν την ανάκτηση όλων των αναλυτών του πεδίου εφαρμογής σε κάθε παρτίδα αναλύσεων. Όταν λόγω της πληθώρας των αναλυτών, κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό, θα πρέπει να περιλαμβάνεται τουλάχιστον το 10% των αναλυτών (με ελάχιστο αριθμό 5) ανά σύστημα ανίχνευσης. Η ανάκτηση ενός αναλύτη προσδιορίζεται με τη μέθοδο της προσθήκης σε εύρος συγκεντρώσεων από το RL έως 2-10 φορές το RL ή στο MRL. Η

ανάκτηση πρέπει να δίνει αποτελέσματα που βρίσκονται μέσα στα αποδεκτά όρια του μέσου όρου της ανάκτησης $\pm 2 \cdot \text{RSD}$.

2.3.2.4. Αποφυγή μόλυνσης - παρεμβολής

Για να αποφευχθεί η μόλυνση των δειγμάτων σύμφωνα με την SANTE 11312/2021, είναι σημαντικό κατά τη μεταφορά και την αποθήκευση στο εργαστήριο, τα ύποπτα δείγματα από τα επιμολυσμένα. Όσο αφορά τα δείγματα με γνωστά ή πιθανά υπολείμματα πρέπει να σφραγίζονται διπλά σε σακούλες από πολυαιθυλένιο ή νάilon και να υποβάλλονται σε χωριστή επεξεργασία. Στην οδηγία επισημαίνεται επίσης ότι τόσο ο ογκομετρικός εξοπλισμός όσο και ότι άλλο χρησιμοποιείται πρέπει να καθαρίζονται προσεκτικά για να αποφεύγονται στο μέτρο το δυνατό τα φαινόμενα του cross-contamination. Πρέπει επίσης να αποφεύγεται η μόλυνση των εκχυλισμάτων ή των διαλυμάτων αναλυτών με εσωτερικά πρότυπα, ενώ σε πολλές των περιπτώσεων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η φυσική εμφάνιση των αναλυτών, καθώς τα χαμηλού επιπέδου υπολείμματα φυτοφαρμάκων δεν μπορούν να διακριθούν από τα επίπεδα υποβάθρου (Reynolds, 2024).

2.3.3. Παράμετροι αξιολόγησης

2.3.3.1. Ακρίβεια

Μια αναλυτική τεχνική θεωρείται ακριβής όταν τα αποτελέσματά της προσεγγίζουν την πραγματική τιμή ή μια ευρέως αναγνωρισμένη πραγματική τιμή και επαληθεύεται με την αξιολόγηση ενός λευκού δείγματος υποστρώματος (χωρίς μόλυνση) που έχει μολυνθεί με προκαθορισμένες αναλογίες. Η ανάκτηση εξαρτάται από τη συγκέντρωση των συστατικών, το υπόστρωμα του δείγματος και την τεχνική προεπεξεργασίας. Η ακρίβεια αξιολογείται με την επανάληψη των μετρήσεων και την πραγματοποίηση τριών έως έξι αναλύσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εντός του εύρους της αναλυτικής τιμής. Η εξίσωση για το σχετικό σφάλμα μέτρησης που ποσοτικοποιεί την ακρίβεια της μεθόδου, είναι η εξής.

$$\text{Standard Error} = \frac{\text{Μετρούμενη τιμή} - \text{Θεωρητικά υπολογιζόμενη τιμή}}{\text{Θεωρητικά υπολογιζόμενη τιμή}} * 100$$

2.3.3.2. Πιστότητα

Η πιστότητα της μεθόδου αναφέρεται στον βαθμό συνέπειας που παρατηρείται στα επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα σε πολλαπλά δείγματα. Υπολογίζεται ως η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων της δοκιμής με τις υψηλότερες τιμές να υποδηλώνουν.

χαμηλότερο επίπεδο ακρίβειας. Η έννοια της πιστότητας, περιλαμβάνει τις έννοιες της επαναληψιμότητας, της ενδιάμεσης πιστότητας και της αναπαραγωγιμότητας. Ως επαναληψιμότητα ορίζεται η έγχυση δειγμάτων με πανομοιότυπα υποστρώματα που περιέχουν τη χημική ουσία προς αξιολόγηση σε ποσότητες 0, 0.5, 1 και 1.5 φορές το επιτρεπόμενο όριο και με τη διενέργεια έξι αναλύσεων για κάθε επίπεδο. Οι τελικές μέσες συγκεντρώσεις και ο συντελεστής διακύμανσης καταγράφονται ως ενδιάμεση πιστότητα, και περιλαμβάνουν τη μακροπρόθεσμη διακύμανση των δεδομένων μέτρησης (Gallocchio et al., 2021).

2.3.3.3. Εύρος και γραμμικότητα

Μια γραμμική αναλυτική προσέγγιση είναι ικανή να υπολογίζει αμέσως τα αποτελέσματα των μετρήσεων ή να προβαίνει σε προκαθορισμένες μαθηματικές τροποποιήσεις ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των συστατικών ενός δείγματος εντός ενός συγκεκριμένου εύρους συγκεντρώσεων. Η γραμμικότητα μίας μεθόδου προσδιορίζεται με τη διενέργεια μιας σειράς από 3 έως 6 αναλύσεις δείγματος χρησιμοποιώντας 5 ή περισσότερες πρότυπες συγκεντρώσεις εντός του προβλεπόμενου εύρους. Ο υπολογισμός γίνεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (εξίσωση της μορφής $y=ax+\beta$) και αντιπροσωπεύεται από τον συντελεστή συσχέτισης (R) που ποσοτικοποιεί την απόκλιση των τιμών από την καμπύλη αναφοράς με αποδεκτές τιμές από 0.980 έως 1.000.

2.3.3.4. Σταθερότητα και ευαισθησία μεθόδου

Η ευαισθησία μιας μεθόδου καθορίζεται από την αξιοπιστία της στην ανίχνευση χαμηλότερων ποσοτήτων του συστατικού. Τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται είναι τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ). Ο όρος "όριο ανίχνευσης" αναφέρεται στην κατάσταση κατά την οποία η συγκέντρωση ενός συστατικού είναι πολύ χαμηλή ώστε να διακρίνεται πάνω από το θόρυβο υποβάθρου του ανιχνευτή. Στις πρακτικές εφαρμογές, η εγχύμενη ποσότητα δημιουργεί μια κορυφή που είναι δύο έως τρεις φορές υψηλότερη από το θόρυβο της βασικής γραμμής και μαθηματικά περιγράφεται από την εξίσωση $LOD = 3 \times S/N$, όπου ο όρος S/N είναι ο λόγος σήματος προς θόρυβο. Το όριο ποσοτικής αξιολόγησης αναφέρεται στην ελάχιστη ποσότητα του εισαγόμενου συστατικού που απαιτείται για την παραγωγή μετρήσιμων και σταθερών περιοχών κορυφής πάνω από τον θόρυβο της γραμμής βάσης, ενώ το ύψος της κορυφής

πρέπει να υπερβαίνει το θόρυβο της γραμμής βάσης από 10 έως 20. Ο όρος "LOQ" ορίζεται μαθηματικά ως το γινόμενο του 10 και του λόγου σήματος προς θόρυβο (S/N), ενώ το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μπορεί να παρασταθεί μαθηματικά ως το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) που ισούται με το τριπλάσιο του ορίου ανίχνευσης (LOD) (Gallocchio et al., 2021).

3. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΟΞΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Οι τοξικές ουσίες κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

- Φάρμακα
- Χημικές ουσίες στη βιομηχανία
- Περιβαλλοντικοί ρυπαντές
- Γεωργικά φάρμακα
- Φυσικά δηλητήρια
- Οικιακά δηλητήρια

Στα εγχειρίδια τοξικολογίας κατατάσσονται σύμφωνα με:

τη χρήση τους (διαλύτες, εντομοκτόνα, συντηρητικά τροφίμων)
την πηγή προέλευσης (ζώα, φυτά, συνθετικές χημικές ουσίες)
το περιβάλλον που υπάρχουν ή χρησιμοποιούνται (δηλητήρια στο οικιακό, εργασιακό, γεωργικό περιβάλλον στην ατμόσφαιρα κ.α.)
την τοξικότητα στα όργανα - στόχο (ηπατοτοξικά, νεφροτοξικά)
τη χημική τους δομή (οργανοφωσφορικά, οργανοχλωριωμένα κ.α.)
τη δράση τους (καυστικά, διαβρωτικά, καρκινογόνα κ.α.)
συνδυασμός των παραπάνω.

Στην αναλυτική Τοξικολογία οι τοξικές ουσίες κατατάσσονται στα (Αττά-Πολίτου, 2013):

- Οργανικά δηλητήρια (φυτοπροστατευτικά κ.α.)
- Μεταλλικά δηλητήρια (χαλκός, μόλυβδος κ.α.)
- Καυστικά και διαβρωτικά δηλητήρια
- Αέρια δηλητήρια (μονοξείδιο του άνθρακα CO, κυανιούχα, αμμωνία κ.α.)
- Πτητικά δηλητήρια (νέφτι, βενζίνη κ.α.) (Αττά-Πολίτου 2013).

Στη παρούσα εργασία γίνεται αναφορά στις πιο κοινές τοξικές ουσίες που προκαλούν δηλητηριάσεις στα ζώα συντροφιάς. Ανάλογα με τα είδη ζώων η απόκριση στις τοξικές ουσίες είναι διαφορετική. Τα ζώα συντροφιάς (σκύλοι και γάτες) αντιδρούν σε χημικές ουσίες με παρόμοιο τρόπο όπως και οι άνθρωποι επειδή είναι μονογαστρικά.

Οι διαφορές στη φυσιοπαθολογία των ζώων επηρεάζει την απόκριση στις τοξικώσεις. Τα πτηνά είναι πιο ευαίσθητα στα αέρια δηλητήρια. Λόγω βιοχημικών διαφορών στα είδη διαφέρει και η ευαισθησία στις ουσίες. Η σχετική έλλειψη γλυκουρονικής μεταφοράς

στη γάτα έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία στην τοξίκωση από παρακεταμόλη, όπως και η αυξημένη οξείδωση της αιμογλοβίνης και ο θάνατος, επέρχεται από τη μεθαιμοσφαιριναιμία., η μετάλλαξη του γονιδίου που συνθέτει τη γλυκοπρωτεΐνη-P (P-gr) και είναι υπεύθυνη για την τοξίκωση από ιβερμεκτίνη σε σκύλους της φυλής Collie. Οι περισσότερες βιοχημικές διαφορές έχουν γενετική προέλευση.

Έκτος από τις ανατομικές, φυσιοπαθολογικές, και βιοχημικές διαφορές πρέπει να λαμβάνονται υπόψη το φύλο, η ηλικία, η κατάσταση υγείας, το περιβάλλον διαβίωσης και οι διατροφικές συνήθειες.

Οι πιο συχνές δηλητηριάσεις ανά είδος ζώου είναι οι εξής:

- Σκύλοι, γάτες: παρασιτοκτόνα, απορρίμματα, αιθυλενογλυκόλη, βαρέα μέταλλα, βιοτοξίνες (βάτραχοι, φύκια, τσιμπούρια), φυτοτοξίνες, μυκοτοξίνες, αντιδράσεις σε φάρμακα
- Πτηνά: παρασιτοκτόνα (είναι πολύ ευαίσθητα στα εντομοκτόνα), προσθετικά τροφίμων και νερού, μύκητες, βακτηριακές τοξίνες, αέρια και απολυμαντικά, βαρέα μέταλλα
- Κουνέλια: γαλακτοκομικά, τικά φυτά
- Βοοειδή: βαρέα μέταλλα, μολυσματικοί παράγοντες στα τρόφιμα και στο περιβάλλον (πχ ουρία, νιτρώδη, κυάνιο, μυκοτοξίνες), τοξικά φυτά, παρασιτοκτόνα, δάγκωμα από φίδια και έντομα, ανεπιθύμητες ενέργειες από φάρμακα.
- Πρόβατα-Αίγες: δηλητηριώδη φυτά, κυάνιο, παρασιτοκτόνα, παρενέργειες φαρμάκων, βαρέα μέταλλα, ανθελμινθικά, νιτρώδη, θειώδη.
- Χοίροι: δηλητηρίαση από το αλάτι, από οργανικό αρσενικό, μυκοτοξίνες και τοξικά αέρια που παράγονται στον εγκλεισμό των χοίρων.

3.1.Παρασιτοκτόνα – Κατηγορίες ανάλογα με τη χρήση τους

Τα παρασιτοκτόνα κατατάσσονται ανάλογα με τη χρήση τους στα:

- Εντομοκτόνα
- Μυκητοκτόνα
- Ζιζανιοκτόνα
- Τρωκτικοκτόνα
- Κοχλιοκτόνα
- Νηματοκτόνα
- Ακαρεοκτόνα

3.2.Παρασιτοκτόνα – Κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό τοξικότητας

Τα προϊόντα αυτά διακρίνονται με βάση τη σχετική οξεία τοξικότητά τους (LD50 ή LC50). Τα παρασιτοκτόνα που σύμφωνα με αυτούς τους δείκτες είναι πολύ τοξικά πρέπει να αναφέρουν τις προειδοποιητικές λέξεις ΚΙΝΔΥΝΟΣ και ΔΗΛΗΤΗΡΙΟ με κόκκινα γράμματα και με την ένδειξη της νεκροκεφαλής με δύο οστά χιαστί από κάτω στο πρόσθιο μέρος των συσκευασιών τους. Τα υψηλής τοξικότητας αυτά είναι κατηγορίας I και η κατάποση μόνο μερικών σταγόνων συγκέντρωσης από ίχνη μέχρι 50 mg/kg μπορεί να είναι θανατηφόρος σε ένα άτομο με βάρος περίπου 70 κιλών. Μερικά παρασιτοκτόνα έχουν την ένδειξη ΚΙΝΔΥΝΟΣ χωρίς το σήμα της νεκροκεφαλής. Αυτό σημαίνει ότι οι πιθανές επιδράσεις στο δέρμα και στα μάτια είναι πιο σοβαρά από αυτά που προτείνονται από τα επίπεδα οξείας τοξικότητας του προϊόντος.

Η κατηγορία II είναι μεσαίου βαθμού τοξικά και πρέπει να αναγράφεται σε αυτά η λέξη ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ στη συσκευασία. Τα σκευάσματα αυτήν της κατηγορίας έχουν θανατηφόρο δόση από 50 μέχρι και 500 mg/kg. Ένα κουταλάκι του γλυκού θα ήταν πιθανώς θανατηφόρο σε ένα άτομο 70 κιλών.

Οι υπόλοιπες κατηγορίες III και IV είναι ή χαμηλής τοξικότητας ή σχετικά μη τοξικά και απλά γράφεται η ένδειξη ΠΡΟΣΟΧΗ σε αυτά. Η θανατηφόρος δόση είναι μεγαλύτερη των 500 mg/kg και για να προκαλέσει θάνατο σε ένα άτομο 70 κιλών πρέπει να καταναλωθούν περίπου 30 γρ. προϊόντος. Ο πίνακας 4.1 απεικονίζει τις κατηγορίες και τις ανάλογες θανατηφόρες δόσεις σε κάθε κατηγορία παρασιτοκτόνου.

Πίνακας 3.1: Κατηγορίες παρασιτοκτόνων ανάλογα με το βαθμό τοξικότητας που καθορίζεται από τη θανατηφόρα δόση της ουσίας (LD50), καθώς και ο τρόπος που εκτίθεται το σώμα στην ουσία αυτή (Hock 2016).

Routes of Exposure	Toxicity Cat. I	Toxicity Cat. II	Toxicity Cat. III	Toxicity Cat. IV
Oral LD50	Up to and including 50 mg/kg	50-500 mg/kg	500-5,000 mg/kg	>5,000 mg/kg
Inhalation LC50	Up to and including 0.2 mg/l	0.2-2 mg/l	2-20 mg/l	>20 mg/l
Dermal LD50	Up to and including 200 mg/kg	200-2,000 mg/kg	2,000-20,000 mg/kg	>20,000 mg/kg
Eye Effects	Corrosive corneal opacity not reversible within 7 days	Corneal opacity reversible within 7 days; irritation persisting for 7 days	No corneal opacity; irritation reversible within 7 days	No irritation
Skin Effects	Corrosive	Severe irritation at 72 hours	Moderate irritation at 72 hours	Mild or slight irritation at 72 hours
Signal Word	DANGER POISON	WARNING	CAUTION	CAUTION

Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται οι κυριότερες κατηγορίες παρασιτοκτόνων και οι ονομασίες των χημικών ενώσεων που τις αποτελούν.

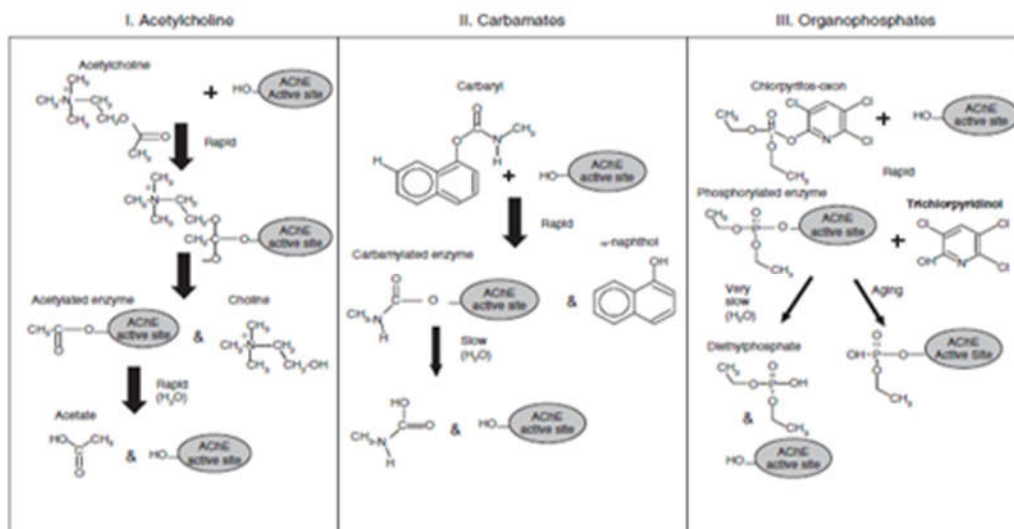
Πίνακας 3.2: Κατηγορίες φυτοπροστατευτικών σύμφωνα με τη χημική δομή (Jarayaj et al. 2016).

Χημικός τύπος	Χημικά Ονόματα
1 Organochlorines	DDT, DDD, Dicolfol, Eldrin, Dieldrin, Chlorobenzilate, Lindane, BHC, Methoxychloro Aldrin, Chlordane, Heptaclor, Endosulfan, Isodrin, Isobenzan, Toxaphene, Chloropropylate
2 Organophosphates	Dimefox, Mipafos, Methyl Parathion, Ronnel, enitrothion, Bidrin, Phorate, Fenthion, caumphos, Abate, Dichlorovas, Diptrex, Phosphomidon, Demetox, Oxydemeton-methyl, Malathion, Dimethoate, Trichlorofan
3 Carbamates	Methyl Carbaryl, Carbanolate, Prupoxur, Dimethan, Dimetilan, Isolan, Carbofuran, Pyrolan, Aminocarb, Aldicarb Thio Vernolate, Pebulate, Diallate, Monilate, Butylate, Cycloate, Trillate, Thiourea Dithio Methan, Thiram, Ferban, Amoban, Naban, Zineb, Maneb, Ziram Polyran, Dithane M- 45
4 Pyrethroids	Allethrin, Bonthrin, Dimethrin, Tetramethrin, Ptrethrin, Cyclethrin, Furethrin, Fenevelerate, Alphamethrin, Decamethrin, Cypermethrin
5 Phenyl amides	Carbanilates Barban, Carbetamide, Chlororprofan, Prophan, Phenyl Urea, Fenuron, Monuron, Diuron, Flumeturon, Chloroxuron, Neburon, Bromuron Acylnalide Propanil, Solan, Dicryl, Karsil, Propachlor, Alachlor, Butachlor Toluidines Trifluralin, Dipropanil, Benefin, Oryzalin, Isopropanil, Nitratin Acetamide Diphenamid
6 Phenoxy alkonates	2,4-D (2,4 Dichloro phenoxy acetic acid), 2,4 5 T (2,4 5 Trichloro Phenoxy acetic acid), Dichloroprop, Mecoprop, Erbin, Sesone
7 Trazines	Atrazine, Simazine, Ametryn, Atratone, Chlorazine, Cynazine, Cyprazine, Metribuzin, Propazine, Turbutryn, Simetryn
8 Benzoic acid	Dicamba, Dichlorobenil, Chloroambin, Tricamba, Neptalan, Bromoxynil
9 Phtalimides	Captan, Diflotan, Folpet
10 Dipyrids	Paraquat, Diaquat
11 Others	Pentachlorophenol, Floroacetate, Phenyl mercuric acetate, Ethyl mercuric Phosphate, Methyl mercuric chloride, Sodium arsenate, Calcium arsenate, Lead arsenate, Cacodylic acid, Aluminium phosphide, Zinc phosphide

3.3.Οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα

3.3.1. Τρόπος δράσης

Τα οργανοφωσφορικά (OPs) και τα καρβαμιδικά (CMs) είναι ευρέως διαδεδομένα και χρησιμοποιούνται σαν παρασιτοκτόνα στη γεωργική παραγωγή, όπως στους κήπους γύρω από τις οικίες. Εκτός αυτού, τα παρασιτοκτόνα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην κτηνιατρική για αποπαρασίτωση. Και τα δύο αυτά είδη προκαλούν τοξικότητα λόγω της δράσης τους στο να παρεμποδίζουν τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) ένζυμο που τερματίζει τη δράση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη στις συνάψεις των νεύρων στις νευρομυϊκές συνδέσεις. Αυτά τα χημικά αναφέρονται και ως “αντιχολινεστεράσες”. Μερικά από τα OPs με ισχυρή αντί AChE δράση είναι πολύ τοξικά και δε δρουν επιλεκτικά σε συγκεκριμένα είδη, και ακριβώς γι’ αυτό αποτελούν κίνδυνο για το περιβάλλον, τα ζώα και τον άνθρωπο, όπως και για την υδρόβια ζωή. Αν και οι δραστικές ουσίες αυτών των σκευασμάτων είναι νευροτοξίνες, παρουσιάζουν και μια ποικιλία χολινεργικών και αντιχολινεργικών επιδράσεων. Τελευταία στοιχεία δείχνουν ότι ενώ οι χολινεργικοί μηχανισμοί παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην έναρξη της τοξικότητας, ο θάνατος των νευρώνων έρχεται μέσω μη χολινεργικών μηχανισμών.



Εικόνα 3.1: Επίδραση της ακετυλοχολίνης από καρβαμιδικά και οργανοφωσφορικά στις νευρομυϊκές συνάψεις. (Timchalk 2006)

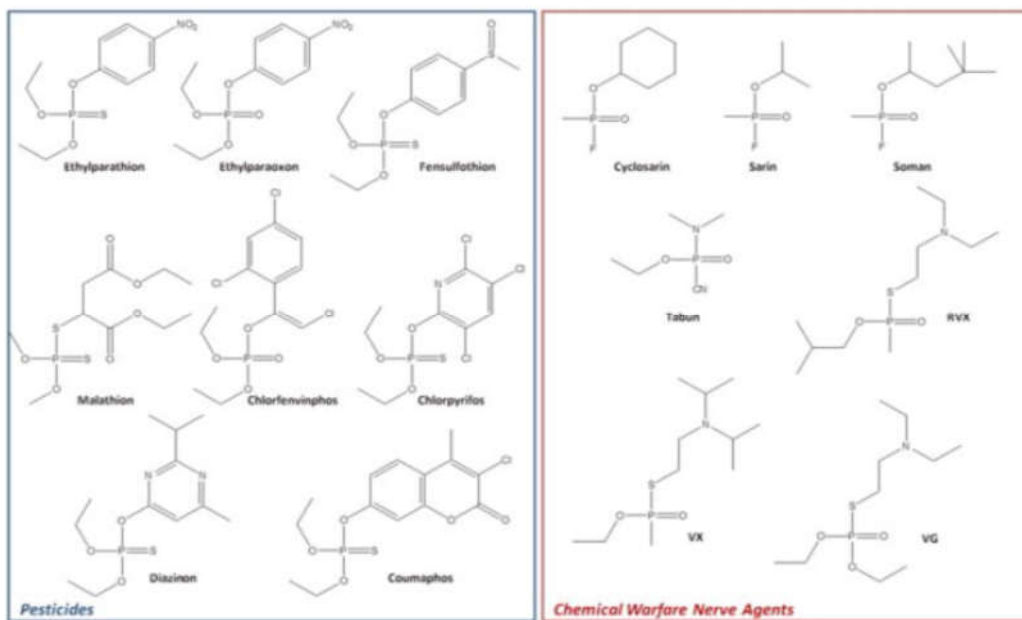
Τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά επιδρούν στα ζώα και προκαλούν παρόμοιες τοξικές παρενέργειες, γι' αυτό και αναλύονται μαζί.

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων. Αν και παρουσιάζονται διαφορές στο μοριακό τύπο τους, ωστόσο όλα τα είδη περιέχουν ένα πενταδύναμο άτομο φωσφόρου το οποίο σχηματίζει είτε ένα χαρακτηριστικό δεσμό με άτομο οξυγόνου, είτε με άτομα θείου. Στην ουσία, τα παρασιτοκτόνα αυτά είναι εστέρες φωσφορικού οξέος οι οποίοι μπορούν να συνδεθούν είτε με άτομα άνθρακα, είτε οξυγόνου, θείου και αζώτου. Επίσης, περιέχονται σε αυτά δύο υποομάδες αλκυλίων και υποκαταστάτες που είναι πιο υδρόφιλοι από τις αλκυλομάδες.

Τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα, ανάλογα με τη χημική τους συγγένεια, ταξινομούνται στις παρακάτω κατηγορίες:

- i) Μη θειούχες ενώσεις του φωσφορικού ή φωσφονικού οξέος π.χ. dichlorvos (DDVP), phosphamidon, tetrachlorvinphos.
- ii) Θειολο- και θειο- ενώσεις του φωσφορικού ή φωσφονικού οξέος π.χ. parathion & parathion methyl, bromophos, diazinon, chlorpyrifos.
- iii) Εστέρες του διθειοφωσφορικού ή διθειοφωσφονικού οξέος π.χ. thiometon, trithion, disulfoton κ.α..
- iv) Αμίδια του φωσφορικού ή φωσφονικού οξέος π.χ. dimethoate, formothion, vamidothion, monocrotophos.
- v) Ανυδρίτες του φωσφορικού οξέος ή εστέρες του πυροφωσφορικού οξέος π.χ. eithion (Καπετανάκης 2002).

Η πλειοψηφία των οργανοφωσφορικών χρησιμοποιούνται ως παρασιτοκτόνα. Όμως, έχουν παραχθεί στο παρελθόν και αέρια όπως το σαρίν (GB), κυκλοσαρίν (GF), tabun (GA), soman (GD), VX και VR, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν για χημικό πόλεμο ως όπλα μαζικής καταστροφής. Αυτές οι ουσίες είναι πολύ τοξικές και αποτελούν απειλή τόσο για τα ζώα όσο και για τον άνθρωπο σε δόση μικρότερα από 1 mg.



Εικόνα 3.2: Χημική δομή οργανοφωσφορικών ουσιών. Αριστερά: παρασιτοκτόνα, δεξιά: νευρικοί παράγοντες. (Jacquet et al. 2016)

3.3.2. Τοξικότητα-Κλινική εικόνα-Διάγνωση-Θεραπεία

Η τοξικότητα που εμφανίζεται στα ζώα από οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα είναι συνήθως οξεία στη φύση, και τα πρώτα συμπτώματα παρατηρούνται μετά από 15 λεπτά έως και μια ώρα, ενώ επέρχονται και τα σοβαρά συμπτώματα. Η κλινική εικόνα εμφανίζει διαφορές ανάλογα το παρασιτοκτόνο στο οποίο εκτέθηκε το ζώο. Οι συστηματικές επιδράσεις είναι κυρίως στον εγκέφαλο, στους σκελετικούς μύες, πνεύμονες, καρδιά κλπ. Οι τοπικές αντιδράσεις εμφανίζονται κυρίως στα μάτια και στους πνεύμονες. Τα συμπτώματα επίσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε μουσκαρινικά, νικοτινικά και κεντρικά. Τα πρώτα είναι εμετός, κοιλιακός πόνος και πόνος στο στήθος, σιελόρροια, ούρηση, διάρροια, πνευμονικό οίδημα και κυάνωση. Τα συμπτώματα που συνδέονται με την επίδραση στους νικοτινικούς υποδοχείς εμφανίζονται στα αυτόνομα γάγγλια και στους σκελετικούς μύες και το ζώο παρουσιάζει σπασμούς, τρέμουλο, και κρίσεις, ενώ τελικά μπορεί να οδηγηθεί σε παράλυση. Τα κεντρικά συμπτώματα μπορεί να είναι διέγερση και επακόλουθη κατάπτωση. Τα ασθενή ζώα επίσης εμφανίζουν ανησυχία, αταξία, δυσκαμψία και κώμα. Ο θάνατος επέρχεται λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας και ανακοπή καρδιάς.

Για την αντιμετώπιση της δηλητηρίασης μπορεί να χορηγηθεί ενεργός άνθρακας για να σταματήσει η περαιτέρω απορρόφηση του παρασιτοκτόνου από το γαστρεντερικό

σωλήνα. Τα ζώα θα πρέπει να πλυθούν με πολύ νερό αν έχουν εκτεθεί μέσω δέρματος. Η ενδοφλέβια θεραπεία μπορεί να αποβεί αποτελεσματική. Μπορεί να χορηγηθεί θερμική ατροπίνη και 2-PAM.

3.4.Καρβαμιδικά παρασιτοκτόνα

3.4.1. Γενικά

Τα καρβαμιδικά παρασιτοκτόνα προέρχονται από εστεροποίηση του καρβαμιδικού οξέος. Χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα σε σχέση με τα οργανοφωσφορικά επειδή θεωρούνται λιγότερο επικίνδυνα από αυτά. Η εφαρμογή τους περιλαμβάνει την αγροτική παραγωγή και σε κήπους, καθώς και στην κτηνιατρική ως παρασιτοκτόνα. (Daunorag, 2012). Τα περισσότερα καρβαμιδικά είναι ιδιαίτερα τοξικά ενάντια των Υμενόπτερων, γι' αυτό η εφαρμογή τους πρέπει να γίνεται με πολλή προσοχή για να μην εκτεθούν μέλισσες σε αυτά. Κάποια από τα παρασιτοκτόνα αυτά μεταφέρονται και από το ένα φυτό στο άλλο, κάνοντας τη δράση τους πιο αποτελεσματική (Fishel 2005).

3.4.2. Τρόπος δράσης

Ο τρόπος δράσης των καρβαμιδικών ενώσεων είναι παρόμοιος με αυτόν των ΟΡ στην αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης. Η δράση τους όμως είναι πιο ήπια καθώς η παρεμπόδιση του ενζύμου δεν είναι μόνιμη, λύνεται εντός 48 ωρών επιστρέφοντας στη λειτουργική του μορφή (Honda et al., 2016)

Στον πίνακα 3. εμφανίζεται η τοξικότητα μερικών χαρακτηριστικών καρβαμιδικών ενώσεων σε διάφορες κατηγορίες ζώων, τόσο θηλαστικών, όσο και πτηνών, ιχθύων και μελισσών.

3.4.3. Τοξικότητα-Κλινική εικόνα-Διάγνωση-Θεραπεία

Η τοξικότητα που εμφανίζεται στα ζώα από καρβαμιδικά παρασιτοκτόνα είναι συνήθως πιο ήπια από τα οργανοφωσφορικά. Όταν όμως η δηλητηρίαση έχει επέλθει από πολύ τοξικά καρβαμιδικά όπως Aldicarb, Carbofuran παρατηρούνται μετά από μικρό χρονικό διάστημα τα συμπτώματα είναι έντονα όπως στα ΟΡ. Συνεπώς η κλινική εικόνα εμφανίζει διαφορές ανάλογα το καρβαμιδικό στο οποίο εκτέθηκε το ζώο. Οι συστηματικές επιδράσεις είναι κυρίως στον εγκέφαλο, στους σκελετικούς μύες, πνεύμονες, καρδιά κλπ. Τα συμπτώματα επίσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε μουσκαρινικά, νικοτινικά και κεντρικά. Αυτά είναι σπασμοί, μυϊκός τρόμος, και επιληπτικές κρίσεις, κατάπνωση,

δύσπνοια, κυάνωση ενώ τελικά μπορεί να οδηγηθεί σε θάνατο αποτελέσματα των χολινεργικών υποδοχέων (Κωτσάκη-Κοβάτση, 2004)

Για την αντιμετώπιση της δηλητηρίασης μπορεί να χορηγηθεί ενεργός άνθρακας για να σταματήσει η περαιτέρω απορρόφηση του παρασιτοκτόνου από το γαστρεντερικό σωλήνα. με τη χορήγηση ατροπίνης ως ειδικό αντίδοτο και την εφαρμογή υποστηρικτικής θεραπείας. Η ενδοφλέβια θεραπεία μπορεί να αποβεί αποτελεσματική με επανάληψη κάθε 3-5 ώρες το πρώτο 24ωρο (Κωτσάκη-Κοβάτση, 2004).

Πίνακας 3.3: Τοξικότητα καρβαμιδικών παρασιτοκτόνων σε ομάδες ζώων (Fishel 2005)

Common name	Bird acute oral LD ₅₀ (mg/kg)*	Fish LC ₅₀ (ppm)**	Bee [†]
Carbaryl	PNT	HT	HT
Methiocarb	HT	HT	Not available
Methomyl	HT	MT	HT
Oxamyl	VHT	MT	HT
Thiodicarb	HT	HT	MT

*Bird LD₅₀: PNT = >2,000; ST = 501–2,000; MT = 51–500; HT = 10–50; VHT = <10.
 **Fish LC₅₀: PNT = >100; ST = 10–100; MT = 1–10; HT = 0.1–1; VHT = <0.1.
 †Bee: HT = highly toxic (kills upon contact as well as residues); MT = moderately toxic (kills if applied over bees); PNT = relatively nontoxic (relatively few precautions necessary).

Common name	Rat oral LD ₅₀	Rabbit dermal LD ₅₀
Carbaryl	500–850	>2,000
Methiocarb	60–1,000 depending on product	>2,000 (rat)
Methomyl	30–34	>2,000
Oxamyl	5.4	2,960
Thiodicarb	66	>2,000

3.5.Οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα

3.5.1. Γενικά

Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις είναι υδρογονάνθρακες οι οποίοι αποτελούνται από άτομα άνθρακα συνδεδεμένα με άτομα χλωρίου με ομοιοπολικό δεσμό. Το πιο γνωστό ανα τα χρόνια θεωρείται το DDT, το οποίο έκανε θραύση μόλις ανακαλύφθηκαν οι ιδιότητές του και χρησιμοποιούταν σε τεράστιες συγκεντρώσεις στις καλλιέργειες, μέχρι που έγιναν γνωστές οι βλαβερές συνέπειες από τη χρήση του, όπου και απαγορεύθηκε η χρήση του.

3.5.2. Κατηγορίες οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων

Οι κατηγορίες που διακρίνονται εδώ είναι:

α. DDT και συγγενή: εδώ τα πιο κύρια εντομοκτόνα είναι τέσσερα: το DDT, DDD, methoxychlor και perthane.

β. Παράγωγα του βενζολίου: τα παρασιτοκτόνα έχουν ως κοινό ένα δακτύλιο βενζολίου, ο οποίος στις περισσότερες περιπτώσεις είναι το εξαχλωροκυκλοεξάνιο. Χρησιμοποιούταν, κυρίως για την απολύμανση σπόρων πριν τοποθετηθεί στο έδαφος.

γ. Κυκλοδιένια: χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν επειδή είχαν πολύ αποτελεσματική δράση ως εντομοκτόνο, όμως έχουν πλέον απαγορευθεί λόγω του ότι αποτελούν μη βιοδιασπώμενες ουσίες.

3.5.3. Τρόπος δράσης οργανοχλωριωμένων

Οι ουσίες αυτές είναι γνωστές για την υψηλή τοξικότητα που παρουσιάζουν, ενώ επίσης εμφανίζουν αργή αποικοδόμηση. Τα μόρια αυτά, δε διαλύονται στο νερό, αλλά είναι λιπόφιλα και αυτό παίζει ρόλο στην αργή αποικοδόμησή τους. Επειδή οι ουσίες που ανήκουν εδώ εμφανίζουν πολλές ομοιότητες στη δομή τους, εμφανίζουν και παρόμοιες χημικές ιδιότητες. Το DDT που αναφέρθηκε ήδη, θεωρείται μέτριας τοξικότητας, ενώ ο χρόνος ημιζωής υπολογίζεται στα 2-15 χρόνια.

Η τοξικότητα των οργανοχλωριωμένων ουσιών οφείλεται κυρίως στη διέγερση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Τα κυκλοδιένια, όπως το endosulfan και lindane, που αποτελούν ανταγωνιστές της GABA, παρεμποδίζουν τη ροή ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου που προκαλούν την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ανάπτυξης Πάρκινσον και

οργανοχλωριωμένων ουσιών. Επίσης, έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη υψηλής αρτηριακής πίεσης, καρδιαγγειακά νοσήματα και διαταράσσουν την ομαλή λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος (Jayaraj et al. 2016).

3.5.4. Κλινικές ενδείξεις

Τα οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα προκαλούν συμπτώματα σχετικά με το ΚΝΣ, όπως νευρομυϊκό τρόμο και σπασμούς και τέλος θάνατο. Τα ζώα παρουσιάζουν αύξηση θερμοκρασίας και υπερδιέγερση. Τα ζώα γίνονται επιθετικά έναντι άλλων ζώων και ανθρώπων, ενώ κάποια άλλα γίνονται υποτονικά και ανορεξία.

Η διάγνωση έρχεται μετά από χημική ανάλυση διαφόρων ιστών και ταυτόχρονα αναλύεται και δείγμα από την πηγή που υποψιαζόμαστε ότι ήρθε η μόλυνση. Τα ζώα που πέθαναν παρουσιάζουν αιμορραγίες σε πολλά σημεία του σώματος και πιθανώς πνευμονία και πνευμονικό οίδημα.

Δεν υπάρχουν ειδικά αντίδοτα. Αν η έκθεση ήρθε από τον αέρα ή με σκόνη κ.λ.π. τότε συστήνεται καλό πλύσιμο με κρύο νερό. Αν η επαφή ήρθε μέσω πεπτικής οδού, κάποιοι συστήνουν ειδικά λάδια, καθώς η κατανάλωσή τους μαζί με κάποιο καθαρτικό (αλατώδη καθαρτικά) επιταχύνει την απομάκρυνση της ουσίας από το έντερο. Άλλες ενδείξεις αποτελεί ο ενεργός άνθρακας ο οποίος φαίνεται να παρεμποδίζει την απορρόφηση των παρασιτοκτόνων από το γαστρεντερικό σωλήνα.

Όλα τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα είναι απαγορευμένα στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

3.6.Πυρεθροειδή

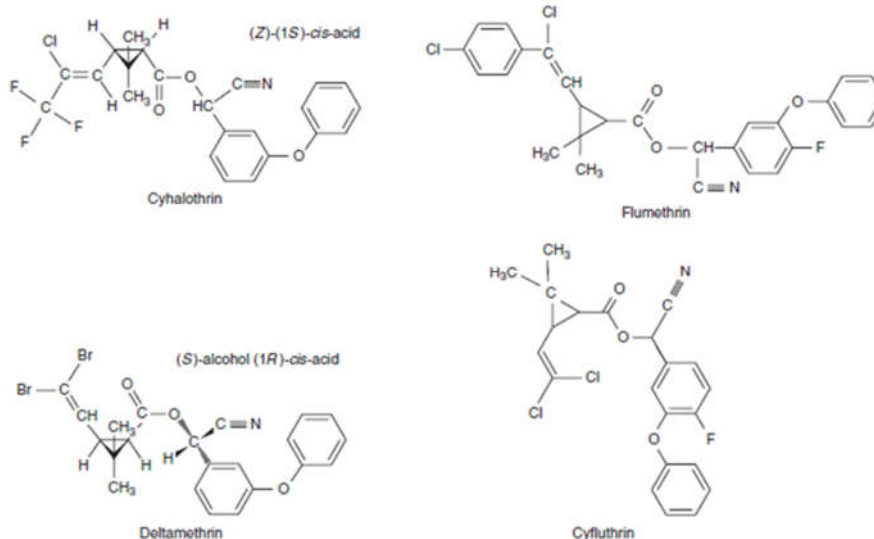
Τα πυρεθροειδή και οι πυρεθρίνες είναι παρόμοιες χημικές ουσίες που απομονώθηκαν από τα είδη χρυσανθέμων *Chrysanthemum coccineum* και *Crysanthemum cinerariaefolium*. Οι συνθετικές πυρεθρίνες είναι ανθεκτικές στον αέρα, φως, θερμότητα σε σχέση με τις φυσικές. Υδρολύονται ταχέως στον γαστρεντερικού σωλήνα. Οι πυρεθρίνες δεύτερης γενιάς προσθήκη της άλφα-κυανό ομάδας στο 3-φαινοξυβενυλ αλκοόλης έχουν αυξημένη εντομοκτόνο δράση. Τα θηλαστικά, συγκριτικά με τα έντομα είναι λιγότερο ευαίσθητα, λόγω γρήγορου μεταβολισμού τους, υψηλότερη θερμοκρασία σώματος και χαμηλότερη συγγένεια για τις πυρεθρίνες /πυρεθροειδών (Song & Narahashi 1996).

Σε σκύλους, γάτες και παραγωγικά, τα κλινικά συμπτώματα είναι παρόμοια για αμφότερες τις ενώσεις τύπου I και II. Στα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνονται,

σιαλόρροια, έμετος, μυϊκός τρόμος, επιληπτικές κρίσεις, δύσπνοια, αδυναμία, θάνατος (Murphy 1996). Φάρμακα της κατηγορίας: pyrethrin, allethrin, permethrin, cypermethrin (Coats 1990). Παρόλο που στα περισσότερα θηλαστικά δεν είναι τοξικές ενώσεις, οι γάτες παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία ειδικά αν συνδυάζονται και με άλλα εντομοκτόνα

Πίνακας 3.4: Τοξικότητα πυρεθροειδών (Ensley 2007).

Type 1 compound*	Oral LD50 (mg/kg body weight) in rat
Pyrethrin 1	900
Allethrin	680
Tetramethrin	4640
Resmethrin	100
Permethrin	2000
Type II compound*	Oral LD50 (mg/kg body weight) in rat
Cypermethrin	500
Deltamethrin	31
Fenvalerate	450
Fluvalinate	1000



Εικόνα 3.3: Χημική δομή πυρεθροειδών (Ensley 2007)

3.6.1. Κλινικές ενδείξεις-θεραπεία

Σιαλόρροια, συμπτώματα του ΚΝΣ όπως μυδρίαση, αταξία, μυϊκός τρόμος, επιληπτικές κρίσεις, κώμα και θάνατος.

Θεραπεία: Πρόκληση εμέτου τις πρώτες 2 ώρες μετά τη λήψη. Ενεργός άνθρακας και αλατούχο ή καθαρκτικό σορβιτόλης θα μειώσει την από του στόματος απορρόφηση.

Υποστηρικτική θεραπεία με τη χρήση διαζεπάμης ή βαρβιτουρικών για τον έλεγχο των κρίσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Τα ηρεμιστικά φαινοθειαζίνης αντενδείκνυνται.

Η ατροπίνη χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της σιαλόρροιας. Η πρόγνωση είναι συνήθως καλή λόγω της χαμηλής τοξικότητας.

3.7. Ζιζανιοκτόνα

Ως ζιζανιοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν αρκετές ανόργανες ενώσεις όπως αρσενικούχο νάτριο, χλωριούχο νάτριο και θειικός χαλκός – κυρίως στις ελαιοκαλλιέργειες – μέχρι την ανακάλυψη των οργανικών ζιζανιοκτόνων τη δεκαετία του 1950. Τα οργανικά αρσενικούχα ζιζανιοκτόνα χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά σήμερα, καθώς έχουν μεγάλη εκλεκτικότητα, μικρή τοξικότητα για τα θηλαστικά και χαμηλή υπολειμματικότητα σε αντίθεση με τα ανόργανα ζιζανιοκτόνα.

Οι βασικές ομάδες ζιζανιοκτόνων σκευασμάτων, είναι:

1. Τριαζινικά Ζιζανιοκτόνα: Είναι από τις μεγαλύτερες ομάδες ζιζανιοκτόνων και αρκετά παλαιά, καθώς η πρώτη ουσία της ομάδας, η σιμαζίνη, εφαρμόστηκε το 1855. Αργότερα ανακαλύφθηκε η ατραζίνη (atrazine), ένα από τα πιο δραστικά και ευρέως χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα. Είναι σταθερές ενώσεις, μεταβολίζονται μικροβιακά και χημικά και δεν έχουν μακρά υπολειμματική δράση.

Είναι πολύ τοξικά και σε μικρές δόσεις. Προκαλούν δερματική ευαισθησία και φωτοευαισθησία σε ανθρώπους και ζώα. Έχουν συσχετιστεί με καρκινογένεση σε ανθρώπους μετά χρόνια επαγγελματική έκθεση. Στην ομάδα ανήκουν επίσης τα φυτοφάρμακα Ametryne και Cynatrine.

2. Διαζινικά Ζιζανιοκτόνα: Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα φυτοφάρμακα Bentazon, Bromacyl, Brompyrazon, Dazomet, Lenacil, Maleichydrazide και Terbacil.

3. Διπυριδυλικά Ζιζανιοκτόνα: Τυπικός εκπρόσωπος της κατηγορίας είναι το paraquat.

Το Paraquat εκδηλώνει την ισχυρή τοξική του δράση στους πνεύμονες και έχει ως βάση κατά 20% το ισχυρό ζιζανιοκτόνο Gramoxone με ισχυρή δερματοτοξική δράση. Τα Διπυριδία είναι ιδιαίτερα τοξικά για τον άνθρωπο. Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα φυτοφάρμακα Paraquat, Diquat, morfamquat.

4. Φαινοξυ-ζιζανιοκτόνα: Αντιπροσωπευτικά της κατηγορίας είναι το 2,4 -D που χρησιμοποιείται για την εξόντωση των πλατύφυλλων ζιζανίων και το 2,4,5 -T που εφαρμόζεται για τον καθαρισμό θάμνων.

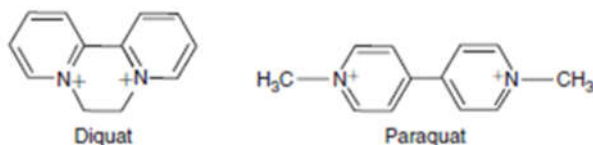
Είναι ουσίες υδατοδιαλυτές, κατανέμονται γρήγορα σε όλους τους ιστούς, αποβάλλονται γρήγορα από τον οργανισμό μέσω διούρησης και η αποσύνθεσή τους στο έδαφος γίνεται σε 2 με 12 μήνες.

Είναι από τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που έχουν κυρίως ενοχοποιηθεί για καρκινογένεση και τερατογόνα συμβάντα. Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα 2,4D, 2-4DB, Dichlorprop, Fenoprop, MCPA, MCPB, Macoprob.

5. Καρβαμιδικά ζιζανιοκτόνα: Όπως Asulan, Barbane, Chlorbufam, Chloroprofam, Methiocarb, Pebulate, Phenmedipham, Terbutol, Protham.

Υπάρχουν πολλές ακόμα είδη ζιζανιοκτόνων ανάλογα με τη χημική τους δομή όπως νιτρικά, ουρίας κ.α.

Τα ζιζανιοκτόνα κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη σύσταση, τρόπο δράσης, τοξικότητας στα φυτά και άλλους οργανισμούς. Ο ΠΟΥ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας) τα έχει κατατάξει ανάλογα με τη τοξικότητά τους.



Εικόνα 3.4: Χημική δομή Diquat, Paraquat (Gupta 2007)

Πίνακας 3.5: : Κατηγορίες ζιζανιοκτόνων ανάλογα με τη τοξικότητα τους σύμφωνα με τον ΠΟΥ (Πηγή: Gupta 2007).

Chemical class	Hazardous class	LD ₅₀ (mg/kg b.w.)
Phenoxy acid derivatives		
2,4-D	II	375
2,4,5-T	O	–
Dichlorprop or 2,4-DP	III	800
2,4-DB	III	700
Dalapon	U	9330
MCPB	III	680
MCPA	III	700
Mecoprop	III	930
Mecoprop-P	III	1050
Silvex or fenprop	O	–
Bipyridyl derivatives		
Paraquat	II	150
Diquat	II	231
Ureas and thioureas (phenyl or substituted ureas)		
Chlorbromuron	U	>5000
Chlorotoluron	U	–
Diuron	U	3400
Fenuron	U	6400
Fenuron-TCA	U	4000
Fluometuron	U	>8000
Flupyrsulfuron	U	>5000
Isoproturon	III	1800
Linuron	U	4000
Metobromuron	U	2500
Metoxuron	U	>3200
Monolinuron	U	2250
Monuron	O	–

Σε κατάποση παρατηρείται έμετος, ναυτία,, κοιλιακό άλγος, διάρροιες, εξελκώσεις στο γαστρεντερικό. Τα εντομοκτόνα της κατηγορίας αυτής είναι πολύ επικίνδυνα και θανατηφόρα ακόμα και σε μικρές δόσεις. Συνέπειες οξείας και υποξείας τοξικότητας είναι η ηπατική προσβολή με τρανσαμινασαιμία και ίκτερο, η νεφρική προσβολή με νεφρική σωληνιακή νέκρωση, ολιγουρία και αιματουρία και η χρόνια τοξική δερματίτιδα. Το paraquat αναπτύσσει φλεγμονή των επιφανειακών στοιβάδων του δέρματος και φυσσαλιδοποίηση ενώ σε οξεία προσβολή των πνευμόνων μπορεί να προκληθεί πνευμονικό οίδημα. Προσλαμβάνεται ενεργητικά από τον πνεύμονα, όπου αθροίζεται και παρεμβαίνει στο μεταβολισμό της λεκιθίνης του αναπνευστικού επιθηλίου διαταράσσοντας τον επιφανειοδραστικό παράγοντα. Κλινικά υπάρχει εμφύσημα, δύσπνοια, υποξαιμία και ακτινογραφική εικόνα ατελεκτασίας. Επιπλοκή είναι η καρδιοαναπνευστική ανεπάρκεια λόγω της αναπτυσσόμενης διάμεσης και ενδοκυψελιδικής ίνωσης, της ανάπτυξης υαλώδους μεμβράνης και του πολλαπλασιασμού του κυψελιδικού ενδοθηλίου (Lorgue et al. 1996).

Πίνακας 3.6: Τοξικότητα διπυρολικών ζιζανιοκτόνων σε διάφορα είδη ζώων (Πηγή: Lorgue et al. 1996).

	Species	mg/kg b.w.
<i>Paraquat</i> LD50	Dogs	25-50
	Cats	35
	Monkeys	50-70
	Cattle	35-50
	Chickens	110-360
	Sheep	8 10
	Rgs	75
<i>Diquat</i> LD50	Dogs	100-200
	Cats	35-50
	Cattle	20-40
	Chickens	200400

3.8. Τρωκτικοκτόνα

3.8.1. Αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα

Περίπου 90% των χρησιμοποιούμενων τρωκτικοκτόνων είναι αντιπηκτικά και διακρίνονται στα υδροξυκουμαρινικά, με κύριο εκπρόσωπο το Warfarin ή 4- υδρόξυ -3-κουμαρίνη, και τις ινανδιόλες. Τα κουμαρινικά αντιπηκτικά ενεργούν ως αντιμεταβολίτες, αναστέλλοντας τους υποδοχείς της βιταμίνης K1 στο ήπαρ, που είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση των παραγόντων πήξης II, VII, IX και X. Τα αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τις δόσεις που χρειάζονται για να δράσουν. Συνήθη κουμαρινικά αντιπηκτικά πρώτης γενιάς είναι τα Warfarin, chlorophacinone, και diphacinone.

Τα πιο γνωστά αντιπηκτικά 2ης γενιάς είναι τα Brodifacoum, Bromadiolone, difenacoum, Flocoumafen, difethialone. .

Τα συμπτώματα εμφανίζονται 24-72 ώρες μετά τη λήψη των αντιπηκτικών με αιμορραγίες πεπτικού και αναπνευστικού, ουλορραγίες, επίσταξη, πετέχιες, αιματοουρία αναιμικούς βλεννογόνους και μπορεί να διαρκέσουν από 45 ημέρες έως 6 μήνες (Honda et al., 2016). Η εμφάνιση των συμπτωμάτων εξαρτάται από το είδος του ζώου, τη κλινική του κατάσταση και το είδος της δραστικής ουσίας. Αντιμετωπίζονται με πρόκληση εμετού και ενεργό άνθρακα, καθώς και πλύση στομάχου και χορήγηση βιταμίνης K, στην δόση των 0,25- 2,5 mg/kg ΣΒ για μια εβδομάδα, για τα αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα πρώτης γενιάς και στη δόση των 2,5-5 mg/kg ΣΒ για διάστημα 4-6 εβδομάδων για τα

δεύτερης γενιάς (Brent, 2017; Sherding, n.d.; Wingfield, 2001). Οξεία δηλητηρίαση από κουμαρινικά είναι σπάνια αλλά συνήθως θανατηφόρα, ειδικά αν συμβεί σε άτομα με ηπατικές παθήσεις, έλκη στομάχου ή ανεπάρκεια βιταμίνης Κ. Χρόνια διαταραχή πήκτικότητας του αίματος είναι δυνατό να εκδηλωθεί μετά χρόνια έκθεση, με παράταση του χρόνου προθρομβίνης και εμφάνιση πετεχιών και πορφύρας (Ζιώγας & Μαρκόγλου 2010, Lipton & Klass 1984).

3.8.2. Μη αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα

Στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί ως μυοκτόνα, πολλές ανόργανες ενώσεις, όπως θειικό θάλλιο, άλατα του αρσενικού, φωσφορούχος ψευδάργυρος (zinc phosphide), επίσης συχνή χρήση είχαν ορισμένες κυανιούχες ενώσεις, Α-ναφθυλοθριουρία (ANTU), οι εστέρες του φθοροξεικού οξέος καθώς και στρυχνίνη (Κοβάτση, 2004). Παρόλο που οι ουσίες αυτές είναι απαγορευμένες στην Ευρωπαϊκή Ένωση, έχουν καταγραφεί περιστατικά δηλητηρίασης και στην Ευρώπη και στην Αμερική (De Roma et al., 2018) κυρίως από φωσφορούχο ψευδαργυρο ή αλουμινίου και στρυχνίνη.

Φωσφορούχος ψευδάργυρος

Ουσία ιδιαίτερα τοξική, γκρί χρώματος που μετατρέπεται σε φωσφίνη όταν αναμειχθεί με νερό και οξύ. Διατίθεται ακόμα στην Αμερική. Με τη κατάποση των δολωμάτων στο όξινο στομαχικό υγρό η ουσία υδρολύεται στο αέριο φωσφίνης. διαβρωτικό προκαλεί άμεσα εμετό με ή χωρίς αιματέμεση. LD50 στους σκύλους είναι 20–40 mg/kg, Απορροφάται άμεσα από τον γαστρεντερικό και αναπνευστικό βλεννογόνο αναδύοντας μια χαρακτηριστική οσμή ψαριού σε σήψη ή σκόρδου. Τα κλινικά συμπτώματα είναι λυθαργικότητα, αταξία, αιμορραγική διάθεση, επιληπτικές κρίσεις πνευμονικό οίδημα, ηπατική και νεφρική ανεπάρκεια και θάνατος. Ο θάνατος μπορεί να επέρθει άμεσα η μέσα σε 5 ώρες μετά την έκθεση. Υποστηρικτική θεραπεία με αντιόξινα για 3-5 μέρες, N-acetylcysteine ενδοφλέβιους ορούς γαστροπροστατευτικά και ηπατοπροστατευτικά και συμπτωματική θεραπεία ανάλογα της κλινικής εικόνας. Η πρόγνωση είναι καλή, ιδιαίτερα στους σκύλους που έχουν σταθερή κλινική εικόνα το πρώτο 24ωρο (Holly Hommerding, 2022)

Στρυχνίνη

Ανήκει στα αλκαλοειδή της ινδόλης που βρίσκεται στους σπόρους του ινδικού δέντρου *strychnos nux vomica*. Έχει κρυσταλλική μορφή είναι άοσμή με πικρή γεύση και είναι αδιάλυτη στο νερό. Απορροφάται από το βλεννογόνο του στομάχου και του εντέρου ταχύτατα και με τον ίδιο ρυθμό αποδομείται από τον οργανισμό. Έτσι αν δοθούν 2 δόσεις σε ένα σκύλο σε μικρότερη συγκέντρωση της LD50 σε ένα 24ωρο, δε θα παρατηρηθούν κλινικά συμπτώματα δηλητηρίασης (Αντωνίου, 1993).

Η στρυχνίνη δρα στο νωτιαίο μυελό, στον νευροδιαβιβαστή γλυκίνη του Κεντρικού νεκρικού συστήματος. Αποτέλεσμα είναι η ανεξέλεγκτη διέγερση των κινητικών νευρώνων με εκτεταμένες συσπάσεις των μυών.

Η θανατηφόρος δόση είναι 0.5–1 mg/kg για σκύλους βοοειδή άλογα και άνθρωπο ενώ 2 mg/kg για γάτες και πτηνά. Τα πρώτα κλινικά συμπτώματα μετά από κατάποση της στρυχνίνης που εκδηλώνονται μετά από 10 λεπτά έως 2 ώρες είναι νευρική δυσκαμψία. Λόγω της ακαμψίας το ζώο παίρνει στάση πριονιού ή τόξου με σπαστική έκταση των άκρων, ο τράχηλος φέρεται προς τα πάνω και πίσω διότι οι εκτίνοντες μύες είναι ισχυρότεροι των καμπτήρων. Τετανικές κρίσεις προκαλούνται αυθόρμητα σε έκθεση ήχων ή φωτός. Σύνοδα κλινικά συμπτώματα είναι κυάνωση των βλεννογόνων, διαστολή της κόρης, υπερθερμία. Ραβδομυόλυση και δευτερογενής νεφρική ανεπάρκεια μπορεί να εμφανιστούν λόγω παρατεταμένης μυϊκής δραστηριότητας. Ο θάνατος επέρχεται από ασφυξία λόγω παρατεταμένης σπαστικής παράλυσης των αναπνευστικών μυών. (Αντωνίου, 1993, Katherine L. Peterson, 2022),

Η θεραπεία είναι υποστηρικτική καθώς δεν υπάρχει αντίδοτο. Η υποδόρια έγχυση υδροχλωρικής απομορφίνης σε σκύλους ή δεξμεντομιδίνη (7 mcg/kg, IM ή 3,5 mcg/kg, IV). για πρόκληση εμέτου και χορήγηση ενεργού άνθρακα μειώνουν σημαντικά την απορρόφιση της στρυχνίνης σε πρώιμο στάδιο. Έλεγχος των τετανικών σπασμών με βαρβιτουρικά και αντιεπιληπτικά φάρμακα Phenobarbital (4 mg/kg, IV), diazepam (0.5–2 mg/kg, IV), levetiracetam (30–60 mg/kg, IV), μυοχαλαρωτικά όπως methocarbamol (55–220 mg/kg, IV), οξυγόνωση αερισμό ή και διασωλήνωση, χορήγηση ενδοφλεβίου ορού και διουρητικών, προ απαιτούνται ώστε να σταθεροποιηθεί η κλινική κατάσταση του ζώο για να ακολουθήσει η διαδικασία της αποβολής της ουσίας με πλύση στομάχου (EPA & United States: Environmental Protection Agency, 1998)

Πίνακας 3.7: Τύποι και χημικές ομάδες Rodenticide (Rodenticides, n.d.)

Rodenticide	Type	Chemical Class	Days of feeding needed
Warfarin	Anticoagulant	Hydroxycoumarin	multiple
Chlorphacinone	Anticoagulant	Indandione	multiple
Diphacinone	Anticoagulant	Indandione	multiple
Bromadiolone	Anticoagulant	Hydroxycoumarin	single
Difethialone	Anticoagulant	Hydroxycoumarin	single
Brodifacoum	Anticoagulant	Hydroxycoumarin	single
Bromethalin	Non-anticoagulant	other	single
Cholecalciferol	Non-anticoagulant	Vitamin D3	multiple
Zinc phosphide	Non-anticoagulant	other	single
Strychnine	Non-anticoagulant	other	single

*Anticoagulants (see Type) are sometimes classified as "first generation" if they require multiple feedings and "second generation" if they require only a single feeding in order to kill."

Πίνακας 3.8: Κατάταξη Οξείας Τοξικότητας – Τρωκτικοκτόνα (Rodenticides, n.d.)

ACUTE TOXICITY CLASSIFICATION - RODENTICIDES						
	Oral	Inhalation	Dermal	Primary Irritation	Eye Primary Irritation	Skin
Warfarin^{3,6}	Moderate - High toxicity	Not significant	Not significant	No data	No data	
Chlorphacinone⁴	High toxicity	High toxicity	High toxicity	Non-irritating	Non-irritating	
Diphacinone⁴	High toxicity	High toxicity	High toxicity	Moderate irritation	Slight irritation	
Bromadiolone⁴	High toxicity	High toxicity	High toxicity	Low irritation	Minimally irritating	
Difethialone³	High toxicity	High toxicity	High toxicity	Mild irritant	Non-irritating	
Brodifacoum⁴	High toxicity	High toxicity	High toxicity	Minor irritation	Mild irritant	
Bromethalin⁴	High toxicity	High toxicity	Moderate toxicity	Slight irritation	Non-irritating	
Cholecalciferol³	High toxicity	Very low toxicity	Low toxicity	No data	No data	
Zinc phosphide⁵	High toxicity	High toxicity	Low toxicity	Slight irritation	Non-irritating	
Strychnine²	High toxicity	High toxicity	Low toxicity	Highly irritating	Non-irritating	

Classification categories were modeled after the U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Label Review Manual, Chapter 7: Precautionary Labeling. <https://www.epa.gov/>

3.9.Βαρέα μέταλλα

Τα μέταλλα σπάνια δρουν με τη στοιχειακή τους μορφή στα βιολογικά συστήματα, δρουν κυρίως, σαν ενώσεις, που περνούν τις βιολογικές μεμβράνες και από τοξικολογικής άποψης, έχει σημασία η σύνδεση τους με τους ιστούς και την αργή απόκριση του. Σημαντικά είναι ο χαλκός, το αρσενικό, το Κάδμιο, το Μαγγάνιο, ο Μόλυβδος, το Σελήνιο, ο Σίδηρος, ο Υδράργυρος, το Χρώμιο και ο Ψευδάργυρος.

3.9.1. Χαλκός

Περιστατικά οξείας ή χρόνιας τοξικότητας από χαλκό καταγράφεται στις περισσότερες περιοχές στον κόσμο. Τα πρόβατα είναι αυτά που επηρεάζονται περισσότερο, όμως επηρεάζονται και άλλα είδη, όπως για παράδειγμα κάποιες ράτσες σκύλων (Bedlington terriers) που εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην έκθεση σε χαλκό, μια αντίστοιχη ασθένεια με την ασθένεια του Wilson στους ανθρώπους. Οξεία τοξικότητα μπορεί να εμφανιστεί μετά από τυχαία έκθεση σε μεγάλες ποσότητες αλάτων χαλκού, που μπορεί να περιέχεται σε ανθελμινθικά σκευάσματα, μεταλλικά μίγματα κ.λ.π..

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δηλητηρίαση από χαλκό, με το να εμπλέκονται στο χρόνο απορρόφησης ή απέκκρισης. Η τοξικότητα μπορεί να μην εκδηλώνει συμπτώματα μέχρι να απελευθερωθούν μεγάλες ποσότητες από το ήπαρ στην κυκλοφορία. Τότε, η συγκέντρωση στο αίμα αυξάνεται ραγδαία, εμφανίζεται οξείδωση λιπιδίων και ενδοαγγειακή αιμόλυση.

Η θεραπεία συνήθως δεν είναι αποτελεσματική. Αυτό που μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμο είναι η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων του γαστρεντερικού και του σοκ. Μπορούν να χορηγηθούν ουσίες στα πρώιμα στάδια όπως η penicillamine (Daunoras 2012).

3.9.2. Μόλυβδος

Στην κτηνιατρική, η δηλητηρίαση από μόλυβδο είναι η πιο συχνή σε βοοειδή και σκύλους. Σε άλλα είδη είναι πιο σπάνια λόγω περιορισμένης πρόσβασης. Στους σκύλους σε πολλές περιπτώσεις, η δηλητηρίαση έρχεται από χρησιμοποιημένα λάδια και μπαταρίες που διοχετεύονται με λανθασμένο τρόπο στο περιβάλλον, ενώ άλλες πηγές μόλυνσης μπορεί να είναι μπογιά, γράσο, κ.λ.π..

Ο μόλυβδος που απορροφάται από το σώμα διοχετεύεται στην κυκλοφορία του αίματος και στους μαλακούς ιστούς και τελικά καταλήγει στα οστά. Ο βαθμός απορρόφησης

εξαρτάται από διατροφικούς παράγοντες, όπως τα επίπεδα σιδήρου και ασβεστίου στο αίμα.

Η οξεία τοξικότητα του μολύβδου είναι πιο συχνή σε νεαρά ζώα. Τα πρώιμα σημάδια σχετίζονται με το γαστρεντερικό και το νευρικό σύστημα.

Η χρόνια τοξικότητα με μεγαλύτερη συχνότητα στις αγελάδες, μπορεί να προκαλέσει παρόμοια συμπτώματα με την οξεία. Τα γαστρεντερικά συμπτώματα μπορούν να εμφανιστούν και σε σκύλους, μαζί με άγχος, υστερικά γαυγίσματα, σιελόρροια, τύφλωση, οπισθοτόνος, ενώ σε κάποιους σκύλους μπορεί να έχουμε καταστολή του ΚΝΣ και υποτονία.

Τα ζώα που πεθαίνουν από δηλητηρίαση μολύβδου μπορεί, αφού εξεταστούν, να παρατηρηθεί ότι έχουν κηλίδες λαδιού ή μπογιάς στο γαστρεντερικό σωλήνα, ενώ μπορούν να υπάρξουν κι άλλα αποτελέσματα, όπως, νέκρωση και αναστολή αναγέννησης ιστών στους νεφρούς, στο νευρικό σύστημα παρατηρείται οίδημα στη λευκή ουσία και στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων.

Η διάγνωση έρχεται από μέτρηση συγκέντρωσης μολύβδου σε διαφόρους ιστούς. Συγκέντρωση μολύβδου στο αίμα σε 0,35 ppm, στο ήπαρ σε 10 ppm και στο νεφρικό ιστό σε 10 ppm δείχνουν δηλητηρίαση από μολύβδο στις περισσότερες περιπτώσεις.

Η θεραπεία δε θα είναι αποτελεσματική αν η βλάβη στους ιστούς είναι εκτεταμένη. Σε ζωντανά ζώα μπορεί αν επιτευχθεί θεραπεία με χορήγηση Ca-EDTA, ή θειαμίνης. Επίσης μπορούν να χορηγηθούν καθαρτικά όπως θειικό μαγνήσιο προκειμένου να απομακρυνθεί η ουσία από το γαστρεντερικό σωλήνα (Daunoras 2012).

3.9.3. Αρσενικό

Η δηλητηρίαση από αρσενικό μπορεί να προκληθεί από επαφή είτε με οργανική είτε με ανόργανη μορφή ουσιών του. Ο βαθμός τοξικότητας εξαρτάται από παράγοντες όπως η οξείδωση του αρσενικού, η διαλυτότητα της ουσίας, το είδος του οργανισμού που εκτίθεται και η διάρκεια έκθεσης σε αυτό.

3.9.3.1. ανόργανες μορφές αρσενικού

Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται το τριοξείδιο και το πεντοξείδιο του αρσενικού, όπως και ενώσεις του με νάτριο, κάλιο, μολύβδο και ασβέστιο. Τα τρισθενή άτομα αρσενικού που λέγονται και αρσενίτες, εμφανίζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα και άρα είναι και πιο

τοξικοί από τους πεντασθενείς, ενώ φαίνεται ότι οι γάτες είναι πιο ευαίσθητες στη δηλητηρίαση αυτήν.

Οι διαλυτές μορφές του ανόργανου αρσενικού μπορούν να απορροφηθούν με μεγάλη ευκολία όταν καταναλώνονται από το στόμα. Μετά, μέσω του αίματος, εναποτίθεται σε πολλούς ιστούς, ενώ οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται στο ήπαρ, νεφρούς, καρδιά και πνεύμονες. Σε περίπτωση χρόνιας έκθεσης, μπορεί να βρεθεί και στα νύχια, μαλλιά, δέρμα, ιδρωτοποιούς αδένες κ.λ.π.. Το μεγαλύτερο μέρος από το ανόργανο αρσενικό αποβάλλεται από τον οργανισμό μέσα από τα ούρα σε μεθυλιωμένη μορφή.

Συνήθως η δηλητηρίαση είναι οξείας μορφής με μεγάλες επιπτώσεις στο γαστρεντερικό σωλήνα και στο καρδιαγγειακό σύστημα, αφού το αρσενικό συσσωρεύεται στις αρτηρίες.

3.10. Κυανιούχα

Τα Κυανιούχα ανάλογα με τις χημικές ιδιότητες τους χωρίζονται σε πολλές κατηγορίες όπου οι πιο διαδεδομένες στη φύση είναι τα ελεύθερα κυανιούχα, τα κυανιούχα σύμπλοκα των μετάλλων και τα συνθετικά ντρίλια.

Το κυάνιο βρίσκεται στη φύση είτε ελεύθερο είτε ενωμένο με τη μορφή κυανιούχων γλυκοζιτών όπως η αμυγδαλίνη που είναι συστατικό των πικρών πυρήνων (κουκούτσια φρούτων όπως βερίκοκα, ροδάκινα, δαμάσκηνα, μήλα και αμύγδαλων) και η δουρρήνη που βρίσκεται στα φύλλα του σόργου. Κατά την υδρόλυση των γλυκοζιτών παράγεται υδροκυάνιο. Παράγεται επίσης από φύκια, φυτά, μύκητες, από ρίζες όπως πατάτες ,ραπανάκια. Παράγεται κατά την ατελή καύση στις πυρκαγιές, ατελή καύση συνθετικών ινών και ακρυλικών πλαστικών, από τα καυσαέρια και το τσιγάρο προκαλώντας περιβαλλοντική ρύπανση. Το ελεύθερο κυάνιο συναντάται σε δύο μορφές: τα ανιόντα κυανίου (CN^-) και το υδροκυάνιο (HCN) όπου η αναλογία τους εξαρτάται άμεσα από το pH του.

Οι ενώσεις του κυανίου χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για τη παρασκευή νιτριλίου νάιλον, πλαστικού, για τη παρασκευή καλλυντικών ,εντομοκτόνων, απολυμαντικών βαφών μετάλλων, παρασκευή φαρμάκων όπως σημαντικός ο ρόλος στην μεταλλουργία για την εξόρυξη και ανάκτηση του χρυσού.

Το υδροκυάνιο (HCN), όπως και τα κυανιούχα άλατα ή κυανίδια (cyanides) όπως το KCN και το NaCN είναι από τα πιο ισχυρά δηλητήρια. Παρεμποδίζουν τα οξειδωτικά φαινόμενα στα κύτταρα και επιφέρουν το θάνατο σε ελάχιστο χρόνο και σε πολύ μικρή συγκέντρωση. Αυτό οφείλεται στη μεγάλη χημική συγγένεια του υδροκυανίου με το

ενζυμο οξειδάση του κυτοχρώματος του οποίου αναστέλλει τη λειτουργία και προκαλεί ιστοτοξική ανοξία Η θανατηφόρα δόση στον άνθρωπο (LD50) είναι 0,05 g με MAC 10 ppm. Συγκεντρώσεις 20-75 ppm μπορεί να είναι θανατηφόρες για πολλά είδη, ενώ η συγκέντρωση πάνω από 200 ppm είναι άμεσα τοξική για τα περισσότερα ψάρια και ασπόνδυλα. Για τα πουλιά και για τα θηλαστικά, η δόση (LD50) κυμαίνεται από 1-10 mg ανά κιλό σωματικού βάρους, ενώ σε υψηλές δόσεις ο θάνατος μπορεί να επέλθει σε 10-30 λεπτά Η εκτιμωμένη LD50 δόση για τη μόλυνση του δέρματος από την έκθεση σε υδροκυάνιο είναι περίπου 100 mg / kg. (International Cyanide Management Code 2018). Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται οι θανατηφόρες δόσεις που εισέρχονται στον οργανισμό μέσω αναπνευστικής οδού.

Πίνακας 3.9: Τοξικότητα κυανίου σε διαφορετικές δόσεις και χρονικό διάστημα μεταξύ έκθεσης και θανάτου

Συγκέντρωση (mg/m ³)	Αποτέλεσμα
300	Θανατηφόρα μέσα σε δευτερόλεπτα
200	Θανατηφόρα μετά από 10 min
150	Θανατηφόρα μετά από 30 min
120- 150	Υψηλά επικίνδυνη μετά από 30 - 60 min
50-60	Υποφερτή για 20 min με 1 h χωρίς επιπτώσεις
20-40	Ελάχιστα συμπτώματα μετά από μερικές ώρες

3.11. Κοχλιοκτόνα- μαλακιοκτόνα

Η πιο συχνή δραστική ουσία που χρησιμοποιείται ως κοχλιοκτόνο είναι η Μεταλδεύδη. Άλλες δραστικές ουσίες που έχουν μαλακιοκτόνο δράση όπως τα μεταλλικά άλατα π.χ. φωσφορικός σίδηρος (iron phosphate), νικλοσαμίδη (αντιελμινθικό φάρμακο) δεν είναι διαδεδομένες στην Ελλάδα. Η μεταλδεύδη είναι γεωργικό φάρμακο για τον έλεγχο των γαστερόποδων παρασίτων όπως σαλιγκαριών και γυμνοσαλιάγκων χωρίς να προκαλεί φυτοτοξικότητα. Μπορεί να προκαλέσει τοξίκωση σε πολλά είδη ζώων όμως σημαντικές καταγραφές υπάρχουν σε σκύλους και γάτες λόγω απρόσκοπτης τοποθέτησης των δολωμάτων αλλά και λόγω εσκεμμένης δηλητηρίασης. Η μεταλδεύδη μπορεί να συνδυαστεί σε σκευάσματα με καρβαμιδικούς εστέρες για ενίσχυση της δραστικότητας. (Barry R. Blakley, 2021)

Η θανατηφόρος δόση είναι 100–600 mg/kg ανάλογα με το είδος ζώου.

Η μεταλδεύδη είναι ένα κυκλικό τετραμερές της ακεταλδεύδης. Μετά την κατάποση, η Μεταλδεύδη υδρολύεται μερικώς στο όξινο PH του στομάχου για την παραγωγή ακεταλδεύδης. Τόσο η μεταλδεύδη όσο και η ακεταλδεύδη απορροφούνται ταχύτατα από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Ο τύπος του περιεχομένου του στομάχου και ο ρυθμός γαστρικής κένωσης επηρεάζουν τον ρυθμό απορρόφησης και την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων. Μετά την απορρόφηση, η μεταλδεύδη μεταβολίζεται ταχέως. Η εντεροηπατική κυκλοφορία μπορεί να παρατείνει την κατακράτηση της μεταλδεύδης, αλλά τελικά τόσο η μεταλδεύδη όσο και η ακεταλδεύδη απεκκρίνονται στα ούρα. Οι κλινικές εκδηλώσεις αποδίδονται κυρίως στη μεταλδεύδη, αν και η ακεταλδεύδη παίζει ρόλο. Η κατάποση μεταλδεύδης επηρεάζει ποικίλες συγκεντρώσεις νευροδιαβιβαστών και ενζυμικές δραστηριότητες. Η μεταλδεύδη μειώνει τη συγκέντρωση του γάμμα-αμινοβουτυρικού οξέος, ενός ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή που προκαλεί διέγερση του ΚΝΣ. Οι μειωμένες συγκεντρώσεις σεροτονίνης (5-υδροξυτρυπταμίνη) και νορεπινεφρίνης στο ΚΝΣ μειώνουν τον ουδό για επιληπτικές κρίσεις. Στη συνέχεια επέρχεται καταστολή του νευρικού συστήματος με κύριο σύμπτωμα τον μυϊκό τρόμο και η παραγωγή όξινων μεταβολιτών μεταλδεύδης προκαλούν σοβαρές ηλεκτρολυτικές διαταραχές και μεταβολική οξέωση. Άλλα κλινικά συμπτώματα είναι το άγχος, υπεραισθησία, αταξία, ταχυκαρδία και υπερθερμία οπισθότονος τονικοκλωνικοί σπασμοί. Επίσης χέουν αναφερθεί εκχυμώσεις και αιμορραγίες στον εντερικό βλεννογόνο.

Υποστηρικτική θεραπεία με ορούς και διουρητικά για την αντιμετώπιση των ηλεκτρολυτικών και μεταβολικών διαταραχών, συμπτωματική θεραπεία όπως αναφέρθηκε στη στρυχνίνη για αντιμετώπιση επιληπτικών κρίσεων και υπερδιέγερσης καθώς δεν υπάρχει αντίδοτο (Yas-Natan et al., 2007).

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Γνωρίζοντας από επιδημιολογικά δεδομένα στην Ευρώπη και εστιάζοντας στις Βαλκανικές χώρες και κυρίως από δεδομένα στην χώρα μας, η μη ορθή χρήση γεωργικών φαρμάκων – φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι η μία από τις βασικές αιτίες αιφνίδιων θανάτων σε ζώα συντροφιάς αλλά και σε ζώα άγριας πανίδας (Caloni et al., 2016; Gallochio et al., 2021; Grilo et al., 2021).

Πολλές μέθοδοι έχουν δημοσιευτεί για ανίχνευση γεωργικών φαρμάκων ανάλογα με τον αναλυτικό εξοπλισμό των εργαστηρίων, οικονομική δυνατότητα για αγορά αντιδραστηρίων προσωπικού και εργατοωρών.

Με δεδομένο το πρωτόκολλο διαχείρισης ύποπτων δειγμάτων για δηλητηρίαση ζώων και των υφιστάμενων μεθόδων του Εργαστηρίου Τοξικολογίας της Δ/σης του Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών και στο πλαίσιο εξέλιξης του Εργαστηρίου νέες μέθοδοι προτείνονται και εφαρμόζονται ανάλογα των συνθηκών.

Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός της εργασίας είναι η ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας–φασματομετρίας μάζας με ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού LC-ESI/MS στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των πιο συχνών ομάδων γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη δηλητηρίαση ζώων συντροφιάς στη χώρα μας, βάση δεδομένων προηγούμενων ετών. Απώτερος περαιτέρω στόχος είναι η ανάπτυξη-ενσωμάτωση τέτοιας μεθόδου στο Εργαστήριο Τοξικολογίας της Δ/σης του Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών.

Στους κυριότερους στόχους της μελέτης συμπεριλαμβάνονται:

1. Η ανάλυση πραγματικών δειγμάτων που έχουν προσκομισθεί στο Εργαστήριο Τοξικολογίας κατά το έτος 2023 ως ύποπτα για δηλητηρίαση.
2. Η περιγραφή και ανάδειξη της σημαντικότητας, όλων των διαδικασιών που περιλαμβάνονται για τη έκβαση αξιόπιστων Τοξικολογικών αναλύσεων, με απώτερο

στόχο τη συμμόρφωση των άμεσα εμπλεκομένων, στην σωστή δειγματοληψία και αποστολή δειγμάτων.

3. Την ανάδειξη του σοβαρού προβλήματος, της μη ορθής και ανεξέλεγκτης διαχείρισης φυτοπροστατευτικών προϊόντων από επαγγελματίες αλλά και το ευρύ κοινό και της κυκλοφορίας πολύ τοξικών ουσιών σε αστικές περιοχές θέτοντας σε κίνδυνο τη Δημόσια Υγεία.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Αντιδραστήρια

2.1.1. Πρότυπες ουσίες

Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες πιστοποιημένες ουσίες:

Πίνακας 2.1: Δραστικές ουσίες και προμηθευτής (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ)

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	ΠΡΟΜΗΘΕΥΤΗΣ
Brodifacoum, Bromadiolone, Flocoumafen, Difenacoum	Dr. Ehrenstofer GmbH (Augsburg, Germany)
Warfarin, Strychnine, Methimidazole, Phorate, Carbofuran, Aldicarb, Methiocarb, Carbendazim, 3 Phenoxybenzoic acid (3-PBA), Imidacloprid, Deltamethrin, Cypermethrin, Methomyl, Bendiocarb, Metaldehyde, Phosmet, Chlorophacinone	Merck - Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany)
Chlorpyrifos-D10 (Εσωτερικό Πρότυπο)	Merck - Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany)

2.1.2. Διαλύτες και Χημικά

1. Υπερκάθαρο νερό (ddH₂O), Ultra Clear®
2. Μεθανόλη (MeOH) LC-MS Grade (99.9%), Fisher
3. Οξικός Αιθυλεστέρας (Ethyl Acetate), Sigma Aldrich
4. Οξικό Αμμώνιο, Scharlau
5. Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, Potassium Dihydrogen Phosphate, Lachner
6. Ορθοφωσφορικό οξύ, Orthophosphoric acid, Sigma Aldrich

2.1.3. Διαλύματα

2.1.3.1. Πρότυπα Διαλύματα

Από κάθε πρότυπη ουσία ζυγίστηκε η αντίστοιχη ποσότητα και διαλύθηκε στον κατάλληλο διαλύτη ώστε να κατασκευαστεί διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution)

συγκέντρωσης 1000 µg/mL περίπου, το οποίο αποθηκεύτηκε στους -20° C. Από τα παραπάνω διαλύματα έγιναν περαιτέρω αραιώσεις ώστε να κατασκευαστούν διαλύματα εργασίας των 10 µg/mL (working solutions), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των τυφλών δειγμάτων (blank) και των διαλυμάτων βαθμονόμησης.

2.1.3.2. Διάλυμα Υγρής Χρωματογραφίας

Το οξικό αμμώνιο 10 mM παρασκευάστηκε με τη ζύγιση 770.8 mg οξικού αμμωνίου και την διαλυτοποίησή του σε 950 mL H₂O και 50 mL MeOH.

2.1.3.3. Διαλύματα – Buffer

Ζυγίστηκαν 34g δισόξινου φωσφορικού καλίου σε 250 mL υπερκάθαρου νερού και έγινε προσαρμογή αυτού με ορθοφωσφορικό οξύ σε pH=3.

2.2.Εργαστηριακά σκεύη & Αναλώσιμα

1. Γυάλινα φιαλίδια αυτόματους δειγματολήπτη των 1.5-2.0 mL με βιδωτό πώμα κατάλληλα για υγρή χρωματογραφία.
2. Πλαστικά σωληνάρια φυγοκέντρισης (PP, τύπου Falcon) όγκου 15 mL με βιδωτό πώμα.
3. Γυάλινες πιπέτες Pasteur των 150 mm.
4. Σπάτουλες και σκαφίδια ζύγισης.
5. Πλαστικά και γυάλινα ποτήρια ζέσεως των 25 mL, 50 mL και 100 mL.
6. Πλαστικοί και γυάλινοι ογκομετρικοί κύλινδροι των 10 mL, 25 mL και 50 mL.
7. Μέσα ατομικής προστασίας (εργαστηριακή ποδιά, γάντια νιτριλίου, προστατευτικά γυαλιά).
8. Φίλτρα σύριγγας 0,22 µm nylon
9. Σύριγγες μίας χρήσης του 1 mL

2.3.Όργανα & Διατάξεις

1. Αναλυτικός ζυγός ακριβείας (5 δεκαδικών ψηφίων) AB 135-S/FACT, Mettler Toledo.
2. Αυτόματες πιπέττες Gilson μεταβλητού όγκου 1-10 µL (M10), 10-100 µL (M100) και 100-1000 µL (M1000).

3. Συσκευή υπερκάθαρου νερού Ultra Clear® TWF UV with 30 liter permeate tank, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation Gmb.
4. Ψυχόμενη φυγόκεντρος Thermo Scientific™ Heraeus Labofuge™ 400R.
5. Αυτόματος αναδευτήρας περιδίνησης Vortex MS1 Minishaker IKA®Agytax.
6. Ψηφιακό εργαστηριακό pH-μετρο πάγκου CG 842, Schott Geräte GmbH.
7. Σύστημα συμπύκνωσης διαλυμάτων με ρεύμα αζώτου Techne®, Bibby Scientific.
8. Ανακινούμενη αυτόματη συσκευή εκχύλισης μαγνητικής μετεώρισης Agytax
9. Ομογενοποιητής (Ultra-turrax) IKA

2.4.Αναλυτικές μέθοδοι

Τα δείγματα αρχικά αναλύθηκαν στο εργαστήριο Τοξικολογίας τμήματος Τοξικολογίας Καταλοίπων και Περιβαλλοντικών Ρυπαντών με αέρια χρωματογραφία (GC) συζευγμένη με φασματογράφο μάζας (MS) GC-MS σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (full scan και χρήση της βάσης δεδομένων-βιβλιοθήκης NIST, για την ανίχνευση οργανοφωσφορικών, καρβαμιδικών, οργανοχλωριωμένων φυτοπροστατευτικών, μερικών ζιζανιοκτόνων, μυκητοκτόνων, κοχλιοκτόνων και βαρβιτουρικών εσωτερική αναλυτική διαδικασία). Από το σύνολο των δειγμάτων για κάθε ύποπτο ζώο προπαρασκευάστηκε και αναλύθηκε μόνο το στομαχικό περιεχόμενο.

Στη συνέχεια τα δείγματα αναλύθηκαν σε μέθοδο που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρίας μάζας με ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού LC-ESI/MS (σε σειρά με ανιχνευτή διάταξης φωτοδιόδων, PDA) για την ανίχνευση οργανοφωσφορικών, καρβαμιδικών φυτοπροστατευτικών, κοχλιοκτόνων, πυρεθρινοειδών και τρωκτικοκτόνων.

Πίνακας 2.2: Αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση ομάδων τοξικών ουσιών (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ)

Ομάδα τοξικών ουσιών	Μέθοδος	LOQ (μg/mL)*
Οργανοφωσφορικά	GC-MS/LC-ESI/MS	0,5
Καρβαμιδικά	GC-MS/LC-ESI/MS	0,5
Οργανοχλωριωμένα	GC-MS	

Κυανιούχα	χρωμομετρική	-
Κοχλιοκτόνα	GC-MS/LC-ESI/MS	0,5
Τρωκτικοκτόνα	LC-ESI/MS	0,5

*Τιμές LOQ αναφέρονται στη μέθοδο LC-ESI/MS

2.4.1. Παραλαβή δείγματος

Κάθε δείγμα που παραλαμβάνεται από το εργαστήριο Τοξικολογίας αντιμετωπίζεται και διαχειρίζεται ατομικά, δηλαδή θεωρείται μοναδικό (case study). Γίνεται μια επιγραμματική αναφορά στη διαδικασία τοξικολογικής διερεύνησης όλων των υπόπτων δειγμάτων η οποία ακολουθήθηκε και στη συγκεκριμένη μελέτη.

2.4.2. Διαδικασίες τοξικολογικής εργαστηριακής διερεύνησης

Όλα τα βιολογικά δείγματα ζώου/ζώων και τα δολώματα που αφορούν την ίδια υποψία δηλητηρίασης, προπαρασκευάζονται την ίδια μέρα. Η διαδικασία είναι κοινή για όλα τα δείγματα και περιλαμβάνει, τον οργανοληπτικό έλεγχο, ομογενοποίηση/άλεση, διαδοχικές εκχυλίσσεις, συμπυκνώσεις έως το τελικό δείγμα έτοιμο προς ανάλυση. Όλα τα στάδια προκατεργασίας γίνονται σχολαστικά, ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση ή αλλαγή της σύστασης του δείγματος.

2.4.2.1. Επιλογή κατάλληλου υποστρώματος – ιστού και μεθόδων προπαρασκευής και οργανολογίας

Δεν είναι εύκολη η επιλογή κατάλληλου ιστού προς εξέταση αν δε γνωρίζουμε καλά το ιστορικό. Ενδεικτικά παραδείγματα: Στην περίπτωση ζώντων ζώων η εξέταση αίματος και ούρων μαζί με τροφή και νερό καλύπτει μεγάλο εύρος δραστικών ουσιών. Σε περίπτωση νεκρού ζώου αν ο θάνατος έχει επέλθει μέσα σε λίγες ώρες η εξέταση του στομάχου είναι το όργανο επιλογής. Σημαντικό ποσοστό των δειγμάτων που προσκομίζονται στο εργαστήριο αφορά ζώα αδέσποτα ή ζώα της άγριας πανίδας που έχουν ανευρεθεί νεκρά κάτω από αδιευκρίνιστες συνθήκες μετά από αρκετές μέρες θανάτου όπου δε μπορούν να αξιολογηθούν νεκροτομικά ευρήματα. Σε αυτές τις περιπτώσεις σε αρκετά καθαρά δείγματα χωρίς προσμίξεις, το δείγμα στομάχου/ ήπατος,

παρασκευάζεται με υγρή υγρή εκχύλιση (liquid liquid extraction, LLE) για να γίνει ανάλυση με GC-MS σε λειτουργία full scan. Σε ιδιαίτερα επιμολυσμένα δείγματα ή σε ερχόμενη σήψη ακολουθείται διαδικασία πολλαπλών εκχυλίσεων με τη χρήση εκχύλισης σε στερεά φάση (solid phase extraction, SPE) και επιπρόσθετες μεθόδους καθαρισμού (clean up). Στην περίπτωση δολώματος που η ύποπτη ουσία έχει επιπαστεί στην επιφάνεια η επεξεργασία γίνεται με LLE. Σε όλες τις ανωτέρω περιπτώσεις αναφερόμαστε σε ανίχνευση ομάδων τοξικών ουσιών. Αν ο οργανοληπτικός έλεγχος δίνει υποψία κυανιούχων πραγματοποιείται άμεσα χρωματομετρική – φυσικοχημική μέθοδος και στη συνέχεια επιβεβαίωση με UV-VIS.

2.4.3. Οργανοληπτικός έλεγχος

Ελέγχονται φυσικά χαρακτηριστικά όπως χρώμα, υφή, οσμή, και έλεγχος pH. Τα δείγματα ζωοτροφών, δολωμάτων και στομαχικού περιεχομένου μεταφέρονται σε σκεύη διαμέτρου 30 εκατοστών όπου επισκοπούνται επισταμένα πριν την άλεση/ομογενοποίηση τους, με τη βοήθεια μεγεθυντικού φακού και καλού φωτισμού για την εύρεση ξένων σωμάτων, τοξικών φυτών, παρασίτων και άλλων προσμίξεων. Στους ιστούς και στο βλεννογόνο του στομάχου εντοπίζονται αιμορραγικές διηθήσεις, νεκρωτικές εστίες, αποχρωματισμός κ.α..

2.4.3.1. Χρωμομετρικές Ταινίες

Στο στάδιο αυτό χρησιμοποιούνται οι χρωμομετρικές ταινίες για νιτρώδη-νιτρικά άλατα MQuant® Nitrate Test και για κυανιούχα άλατα MQuant™ Cyanide Test στο περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας στα παραγωγικά ζώα κα στο στομαχικό περιεχόμενο στους σκύλους, σε ζώα άγριας πανίδας και στις ζωοτροφές/δολώματα αντίστοιχα. Έλεγχος των νιτρικών αλάτων στα ούρα γίνεται με τις ταινίες Griess (Ποιοτική μέθοδος Αρνητικό 0, ++ 0,74 mg/dL).

2.4.3.2. Ομογενοποίηση

Ο ιστός τεμαχίζεται ώστε να έρθει όσο το δυνατό μεγαλύτερη επιφάνεια σε επαφή με τον διαλύτη για την επίτευξη της εκχύλισης. Η ομογενοποίηση γίνεται σε Ομογενοποιητή (Ultra-turrax- IKA) με έναν ή συνδυασμό οργανικών διαλυτών.

Για τη συγκεκριμένη μελέτη η διαδικασία της ομογενοποίησης έγινε χωρίς διαλύτες και το κάθε δείγμα διαχωρίστηκε σε δύο ισόποσες ποσότητες για προπαρασκευή και ανάλυση με τις δύο μεθόδους.

2.4.3.3. Ανάλυση των δειγμάτων με GC-MS

Τα προπαρασκευασμένα δείγματα φέρονται στον αυτόματο δειγματολήπτη του Αέριου χρωματογράφου και αναλύθηκαν στις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες.

Χρωματογραφικός εξοπλισμός

- Σύστημα αέριας χρωματογραφίας Agilent 6890 N.
- Agilent 5973 N mass spectrometer Detector.
- H/Y επεξεργασίας αποτελεσμάτων.

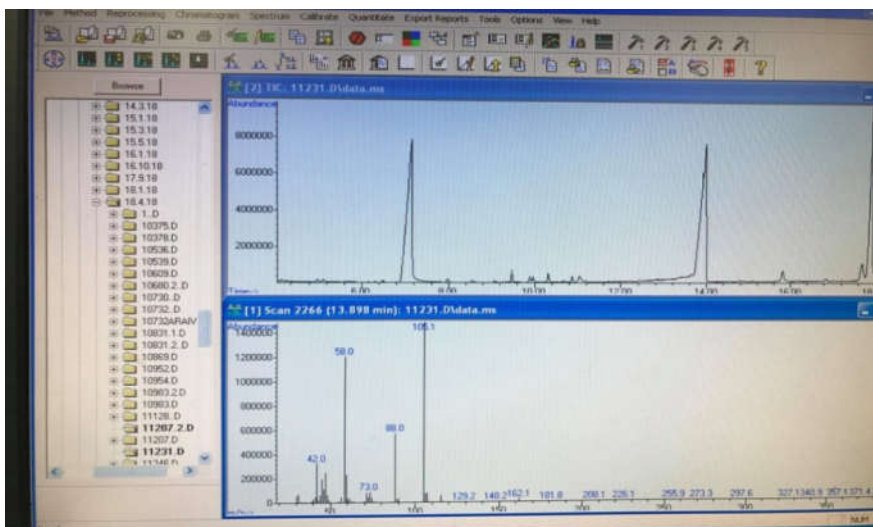
Χρωματογραφικές συνθήκες διαχωρισμού:

Στήλη: DB-5 MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm

Φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο (99,999%) που είχε ρυθμιστεί σε σταθερά ροή (1.0 mL/min). Θερμοκρασία ανιχνευτή 250°C. Αρχική θερμοκρασία φούρνου 60°C και αρχικός χρόνος 2 min. Το MSD λειτουργούσε στο (EI, 70 eV) και το εύρος μάζας ήταν 40.00-500.00. Όλες οι ενέσεις (1 μL) έγιναν σε κατάσταση splitless.

Πρόγραμμα θερμοκρασίας: Αρχική θερμοκρασία φούρνου: 60°C κρατήθηκε για 5 λεπτά, ακολουθούμενη από μια αύξηση στους 170°C (κράτημα για 5 λεπτά) με ρυθμό 15°C /λεπτό, 220°C (κράτημα 2 λεπτών) με ρυθμό 5°C/λεπτό και 300°C (κράτημα για 3 λεπτά) σε ρυθμό 25°C/λεπτό.

Η απεικόνιση της χρωματογραφικής ανάλυσης στην αέρια χρωματογραφία γίνεται υπό μορφή κορυφών



Εικόνα 2.1:Χρωματογραφική κορυφή και τα χαρακτηριστικά ιόντα του καρβαμιδικού φυτοπροστατευτικού Methomyl.

Το ύψος και η περιοχή της κορυφής σχετίζονται με η συγκέντρωση της ένωσης στο δείγμα και χρησιμοποιείται για να ποσοτικοποιήσει τη συγκέντρωσή της. Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων (κυρίως θετικών) μιας ένωσης, το διαχωρισμό τους με βάση το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z) και την καταγραφή τους. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος (MB) της ένωσης και ο τρόπος σύνδεσης των διαφόρων ομάδων μεταξύ τους.

Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται οι πιο συχνές τοξικές ουσίες που ανιχνεύτηκαν με GC – MS στο Εργαστήριο Τοξικολογίας τα προηγούμενα έτη.

Πίνακας 2.3: Συχνότερα απαντημένες τοξικές ουσίες, χαρακτηριστικά ιόντα, που ανιχνεύτηκαν στο εργαστήριο Τοξικολογίας στο GC-MS (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ)

Τοξικές Ουσίες	Ιόντα	Τοξικές Ουσίες	Ιόντα
Methomyl	58, 105, 88	Endosulfan	195,237,241,339
Carbofuran	164, 149, 221	Metalddehyde	45, 89, 87
Chlorpyrifos	197, 314, 258	Endosulfan	195,237,241,339
Terbufos	231, 153, 288	Pentobarbitale	156,141,197
Phorate	75,21,260.231		

2.4.4. Ανίχνευση φυτοπροστατευτικών και τρωκτικοκτόνων με LC-ESI/MS

Παρακάτω παρουσιάζεται το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην εν λόγω διπλωματική εργασία.

2.4.4.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

- Ζυγίστηκαν $2 \text{ g} \pm 0.05$ ομογενοποιημένου δείγματος (ήπαρ/στομάχι).
- Προστέθηκε I.S. τελικός όγκος $1 \text{ } \mu\text{g/mL}$
- 1 mL phosphate buffer $\text{pH} = 3$
- Ανακίνηση έντονη και vortex για 30 sec
- Προστέθηκε 5 mL Ethyl Acetate
- Ανακίνηση έντονη και vortex για 30 sec .
- Ανακίνηση με μαγνητική μετεώριση για 15 min
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 4500 στροφές $7-10^\circ\text{C}$ για 12 min .
- Εξάτμιση υπερκείμενης στοιβάδας μέχρι ξηρού
- Προσθήκη 100 mL MeOH
- vortex για 30 sec .
- μεταφορά στον δειγματολήπτη

2.4.4.2. Ανάλυση των δειγμάτων με LC-ESI/MS

Τα προπαρασκευασμένα δείγματα φέρονται στον αυτόματο δειγματολήπτη του υγρού χρωματογράφου και αναλύθηκαν στις παρακάτω χρωματογραφικές συνθήκες.

Χρωματογραφικός εξοπλισμός

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας Shimadzu LC-ESI MS-2010 EV
- H/Y επεξεργασίας αποτελεσμάτων.

Χρωματογραφικές συνθήκες διαχωρισμού:

- Χρωματογραφική Στήλη: Fortis HPLC C18 $2.1 \text{ mm} \times 150 \text{ mm} \times 3 \mu\text{m}$
- Θερμοκρασία στήλης: 30°C .

- Θερμοκρασία δείγματος: 4°C.
- Κινητή Φάση B: μεθανόλη.
- Κινητή Φάση A: 95% H₂O, 5% MeOH, 10mM ammonium acetate
- Όγκος εισαγωγής δείγματος: 10 µL.
- Ταχύτητα ροής: 0.4 mL/min.
- Ανιχνευτής: Φασματόμετρο μάζας (σε σειρά χρησιμοποιήθηκε και ο ανιχνευτής διάταξης φωτοδιόδων, καλύπτοντας το εύρος μήκος κύματος: 190-800 nm)
- Χρόνος κατακράτησης Rt (Πίνακας 2.3).

Πίνακας 2.4: Βαθμωτό Πρόγραμμα έκλουσης διαλυτών LC- ESI-MS (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ)

Χρόνος (min)	Ροή διαλύτη (mL/min)	Κινητή Φάση A (%)	Κινητή Φάση B (%)
0.00	0.4	50	50
2.00		50	50
4.00		85	15
7.50		85	15
8.50		50	50
20.0		50	50

Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται οι δραστικές ουσίες που έχουν ενταχθεί στην αναλυτική μέθοδο του LC-ESI/MS, το ιόν ποσοτικοποίησης, ο χρόνος κατακράτησης και το όριο ανίχνευσης τους (Πίνακας 2.4).

Πίνακας 2.5: Δραστικές ουσίες που αναλύθηκαν, R/T και LOQ (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ)

ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ	ΙΟΝΙΣΜΟΣ	ΙΟΝΤΑ	ΙΟΝ ΠΟΣΟΤ/ΣΗΣ	R/T	LOQ (µg/mL)
Bromadiolone	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	αρνητικός	525,527	527	7.6	0,5
Brodifacoum	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	αρνητικός	521, 523, 524, 443	443, 523	8.4	0,5
Warfarin	ΝΕΡΟ	αρνητικός	308,10,307,10,250,10, 161,10,311.00	307	2.9	0,5
Difenacoum	ΝΕΡΟ	αρνητικός	444.10, 443.10, 293,10, 161,10	443	8	0,5
chlorophacinone	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	αρνητικός	373, 374, 375	375	6.9	0,5
Flocoumafen	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	αρνητικός	544.4, 161.1, 117,1	497	8.4	0,5
Strychnine	ΝΕΡΟ	θετικός	335, 334, 184.1	335	8.3	0,5
Phorate	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	θετικός	260.4, 199, 75, 261	260.4	8.4	0,5
Phosmet	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	θετικός	318, 159.9, 133.1, 77	318	8.4	0,5
Carbofuran	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	θετικός	222, 123, 221, 165	222	4.8	0,5
Aldicarb	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	θετικός	208, 116, 89	116	5	0,5

Methiocarb	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	θετικός	226, 121, 107	226	9.4	0,5
Methomyl	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	θετικός	163, 88, 106	106	1.4	0,5
Bendiocarb	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	θετικός	224, 107.4, 109.3, 81,3	224	4.3	0,5
delta methrin	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	θετικός	522.9, 181.3, 281	522.9	8.8	0,5
Cypermethrin	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	θετικός	433.1, 191, 127	433	10.3	0,5
PBA	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	αρνητικός	213, 93	213	5.6	0,5
Imidacloprid	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	θετικός	256, 209, 175	256	1.8	0,5
Metaldeyde	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	Αρνητικός	176.2, 76.1	176.2	9,0	0,5
carbendazime D3	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	θετικός	195, 157, 79	195	3.2	0,5
Methimidazole	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	θετικός	115.10, 114.20	115.2	2,6	0,5
chloropyrifos D10	ΜΕΘΑΝΟΛΗ	αρνητικός	364, 362, 360	364	9.1	0,5

Στον φασματογράφο μάζας απλού τετραπόλου, χρησιμοποιείται ηλεκτροψεκασμός ESI για τον αρνητικό ιονισμό του δείγματος. Οι παράμετροι που εφαρμόστηκαν κατά την ανάλυση των δειγμάτων εμφανίζονται στον ακόλουθο πίνακα

Πίνακας 2.6: Παράμετροι Φασματογράφου Μάζας (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ)

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΤΙΜΗ
Ionisation mode	ESI
Nebulizing Gas Flow (Ρόη αέριου εκνέφωσης)	0.18 L/min
Heat Block	200°C
Interface Temperature	250°C

2.4.5. Ανάπτυξη και Βελτιστοποίηση Αναλυτικής Μεθόδου

Στο πλαίσιο ανάπτυξης της αναλυτικής μεθόδου αναπτύχθηκαν και ακολουθήθηκαν αρκετά πειραματικά πρωτόκολλα, πέρα από το τελικό που χρησιμοποιήθηκε.

Διαπιστώθηκε ότι τα πειραματικά πρωτόκολλα 1 και 4 δεν είχαν τις επιθυμητές ανακτήσεις σε οργανοφωσφορικά και μερικά τρωκτικοκτόνα 2^{ης} γενιάς, και το πρωτόκολλο 3 δεν είχε τις επιθυμητές ανακτήσεις στα ποντικοφάρμακα και συγκεκριμένα στα δείγματα ήπατος. Το πρωτόκολλο 2 είχε αντίστοιχες ανακτήσεις με το πρωτόκολλο που εν τέλει ακολουθήθηκε, πάραυτα απορρίφθηκε λόγω της

πολυπλοκότητας και του αυξημένου κόστους των αναλωσίμων και αντιδραστηρίων του. Ωστόσο, μπορεί να ακολουθηθεί στις περιπτώσεις αρκετά «βρώμικων» δειγμάτων ή δειγμάτων σε προχωρημένη σήψη (Peres et al., 2019).

2.4.5.1. Επιπρόσθετα Πειραματικά Πρωτόκολλα

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 1

Στόμαχος/Ήπαρ

- Ζυγίστηκε $0,5 \text{ g} \pm 0.05$ ομογενοποιημένου δείγματος.
- Προστέθηκε I.S. τελικός στόχος 2 ppm.
- Προστέθηκε 1,5 ml μεθανόλη με 1% ammonium formate
- vortex για 30 sec.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 4500 στροφές για 5 λεπτά.
- Υπερκείμενο χρήση σκυλάκι
- 1 ml μεθανόλη με 1% ammonium formate
- vortex για 30 sec.
- Φίλτρα

(Honda et al., 2018)

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 2

- Ζυγίστηκε $5 \text{ g} \pm 0.05$ ομογενοποιημένου δείγματος.
- Προστέθηκε IS τελικός όγκος 10ml.
- Προστέθηκαν 5 ml νερό
- vortex για 30 sec
- Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 4500 στροφές για 5 λεπτά
- Μεταφορά σωληνάριο των 50 ml
- Προστέθηκαν 10 ml ACN με 1%οξικό οξύ
- Ανακίνηση έντονη για 1min
- Προστέθηκε 5 g $\text{MgSO}_4/\text{NaOAc}$ (4/1)
- Ανακίνηση έντονη και vortex για 30 sec
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 4500 στροφές για 5 λεπτά.
- Κατάψυξη στους -80 για 1 ώρα
- Μεταφορά υπερκείμενου στρώματος με σωληνάριο μικροφυγοκέντρου

- Προσθήκη μείγμα dSPE 150:+25/20/5
- vortex για 30 sec
- Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 4500 στροφές για 5 λεπτά
- Φιλτράρισμα υπερκείμενου μεταφορά στον δειγματολήπτη (Schanzer et al., 2021)

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 3

- Ζυγίστηκε 5 ± 0.05 ομογενοποιημένου δείγματος (στόμαχος η ήπαρ).
- Προστέθηκε IS τελικός ογκος 1ppm
- Προστέθηκαν 10 ml νερό (falcon 50ml)
- Προστέθηκαν 15 ml (1%acetic acid σε ACN) + AOAC
- Ανακίνηση έντονη για 1min
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500 στροφές για 12 λεπτά
- Μεταφορά υπερκείμενη στοιβάδα (5 ml)
- Προστέθηκαν 5 ml H₂O
- Προστέθηκε EMR
- Ανακίνηση έντονη και vortex για 1min
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500 στροφές για 12 λεπτά.
- CLEAN UP 5ml υπερκείμενη στοιβάδα.
- Προστέθηκε 5 g MgSO₄/NaCl (4/1)
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500 στροφές για 12 λεπτά.
- Ανακίνηση έντονη και vortex για 1min
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500 στροφές για 12 λεπτά
- Μεταφορά υπερκείμενου στρώματος 2,5ml
- Προστέθηκε 500 MgSO₄
- Ανακίνηση έντονη και vortex για 1min
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500 στροφές για 12 λεπτά
- Φιλτράρισμα υπερκείμενου και μεταφορά στον δειγματολήπτη
- Φιλτράρισμα υπερκείμενου και μεταφορά στον δειγματολήπτη (Peres et al., 2019)

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ 4

- Ζυγίστηκε 2 ± 0.05 ομογενοποιημένου δείγματος (στόμαχος ή ήπαρ).
- Προστέθηκε IS τελικός όγκος 1ppm
- Προστέθηκαν 5 ml ακετόνης (falcon 15ml)
- Υδατόλουτρο υπερήχων για 5 min
- Επανάληψη διαδικασίας
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 4000 στροφές για 4 λεπτά
- Φιλτράρισμα με φίλτρο χαρτιού και anhydrous sodium sulfate (MgSO_4)
- CLEAN UP με SPE Floresil στυλάκι με ακετόνη
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού
- Προστέθηκαν 5 ml ακετόνης
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού
- Προσθήκη $\delta/\mu\text{ammonium acetate}$ και μεθανόλη (50/50)
- 5 g $\text{MgSO}_4/\text{NaCl}$ (4/1)
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500 στροφές για 12 λεπτά.
- Ανακίνηση έντονη και vortex για 1min
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500 στροφές για 12 λεπτά
- Μεταφορά υπερκείμενου στρώματος 2,5ml
- Προστέθηκε 500 MgSO_4
- Ανακίνηση έντονη και vortex για 1min
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500 στροφές για 12 λεπτά
- Φιλτράρισμα υπερκείμενου και μεταφορά στον δειγματολήπτη (Gallocchio et al., 2014)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1.Αποτελέσματα Επικύρωσης

3.1.1. Εκλεκτικότητα

Ως τυφλά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικές πηγές βιολογικών δειγμάτων σκύλου και 3 διαφορετικές πηγές γάτας τόσο ήπατος όσο και στομάχου από περιστατικά νεκρών ζώων που δεν είχε προέλθει ο θάνατος τους από τις ουσίες που έχουν ενταχθεί στη μέθοδο και δεν έχουν νοσηλευτεί ώστε να τους έχουν χορηγηθεί φαρμακευτικές ουσίες (π.χ. πρόκληση άμεσου θανάτου από ατύχημα). Παρόλαυτα, ακόμη και σε αυτές τις περιπτώσεις εντοπίστηκαν μόνο σε ήπαρ χαμηλές συγκεντρώσεις κυρίως τροφτικοκτόνων (μικρές συγκεντρώσεις λόγω μεγάλης ευαισθησίας του αναλυτικού οργάνου χωρίς να είναι η αιτία θανάτου). Για αυτόν τον λόγο, χρησιμοποιήθηκαν επιπρόσθετα τυφλά δείγματα ήπατος τριών διαφορετικών πηγών ελεγχμένων βοοειδών και πουλερικών. Στη δεύτερη περίπτωση η απόκριση τους σε σχέση με εκείνη του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ) είναι μικρότερη του 30% για όλους τους αναλύτες, όπως ορίζεται από την οδηγία.

Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε δείγματα ελέγχου δύο επιπέδων (10μg/mL, 100μg/mL) και 3 επαναλήψεων και προέκυψε εύρος ανακτήσεων 50-125% για τα ποντικοφάρμακα και για όλες τις υπόλοιπες δραστικές ουσίες και RSD% 5-20 (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1: Δραστικές και ανακτήσεις τους σε διάφορες συγκεντρώσεις (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ)

ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	10μg/mL	100μg/mL
Bromadiolone	120	105
Brodifacoum	125	110
Warfarin	65	71
Difenacoum	78	85
chlorophacinone	69	85
Flocoumafen	88	92
Strychnine	76	80
Phorate	50	61
Phosmet	67	75
Carbofuran	91	98
Aldicarb	70	72
Methiocarb	85	91
Methomyl	78	87

Bendiocarb	72	75
Deltamethrin	74	80
Cypermethrin	60	65
3-PBA	51	55
Imidacloprid	66	70
Metaldehyde	70	72
Methimidazole	60	61

3.1.2. Προσδιορισμός ορίων

Ο κύριος στόχος της ανάπτυξης της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθόδου είναι η ανίχνευση πληθώρας δραστικών ουσιών και η ποσοτικοποίηση τους σε όσο γίνεται κατώτερα επίπεδα ορίων. Καθώς όμως οι συγκεντρώσεις των περισσότερων δραστικών ουσιών στα θετικά βιολογικά δείγματα ήταν πολύ υψηλές τόσο στο στομάχι όσο και στο ήπαρ, και λαμβάνοντας υπόψη τις μέσες θανατηφόρες δόσεις των ουσιών αυτών στα θηλαστικά, δεν κρίθηκε αναγκαίο να επιδιωχθεί περαιτέρω μείωση των LOQ (μικρότερα των 0.5 µg/mL, τα LOQ βρίσκονται στον πίνακα 2.4)

3.1.3. Γραμμικότητα & Καμπύλη Βαθμονόμησης

Δημιουργήθηκαν καμπύλες βαθμονόμησης σε πρότυπα διαλύματα με εύρος 0.5 – 100 µg/mL και 6 σημείων. Για όλες τις δραστικές ουσίες ελέγχθηκε τόσο η γραμμικότητα, με τον συντελεστή R² να είναι για όλες πάνω από 0,977.

3.2.Είδη δειγμάτων και Περιοχή μελέτης

Η μελέτη περιλαμβάνει την ανάλυση 70 ύποπτων για δηλητηρίαση βιολογικών δειγμάτων ζώων συντροφιάς και δολωμάτων προς τοξικολογική διερεύνηση.

Από τα ύποπτα περιστατικά που προσκομίστηκαν, επιλέχθηκαν τυχαία αυτά που συμπεριελάμβαναν και στομαχικό περιεχόμενο και ήπαρ στη προσπάθεια να επιτευχθεί ένα κοινό πρωτόκολλο προπαρασκευής αξιόπιστο για όλες τις συχνές ομάδες δραστικών ουσιών. Πολλά ύποπτα περιστατικά συνοδεύονταν από δολώματα.

Στα δολώματα συμπεριλαμβάνονταν οποιαδήποτε μη βιολογικά υλικά που προσκομίστηκαν στο εργαστήριο όπως ιστοί ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό, τροφές, ζωοτροφές, δείγματα νερού, δείγματα χύματος, σκόνες, χάρπια.

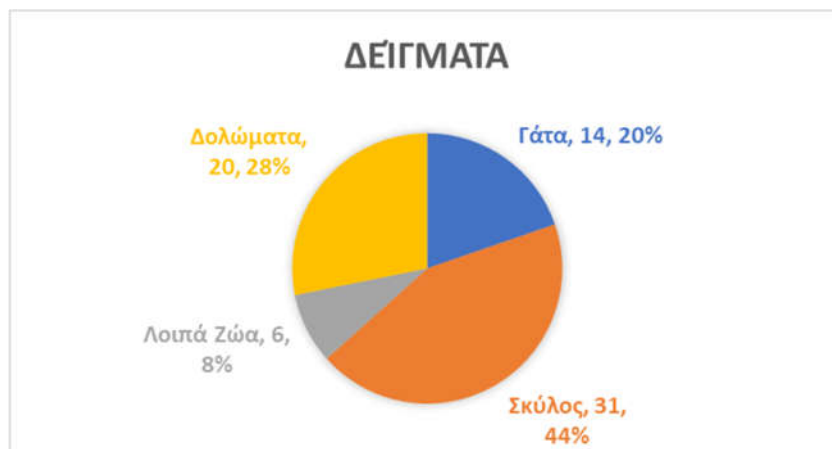
Στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων κάθε ζώο προσμετρήθηκε ως ένα δείγμα ανεξαρτήτου αριθμού βιολογικών υλικών και εξετάσεων που διενεργήθηκαν, Δολώματα ή τροφές που συνόδευαν δείγματα βιολογικών υλικών ζώων, καταχωρήθηκαν χωριστά.

Η μελέτη περιλαμβάνει δείγματα από όλες τις Περιφέρειες της Ελλάδας. Αποστέλλουσες Αρχές είναι οι Δ/νσεις Κτηνιατρικής των Περιφερειακών Ενοτήτων, τα Αγροτικά Κτηνιατρεία, οι Δήμοι και οι Αστυνομικές Αρχές.

Δολώματα στην ίδια συσκευασία θεωρήθηκαν ως ένα δείγμα λόγω πιθανής επιμόλυνσης των δειγμάτων.

3.2.1. Κατηγορίες δραστικών ουσιών

Στο Συγκεντρωτικό Πίνακα 3.2 καταγράφονται η κατηγορία, ο αριθμός των δραστικών ουσιών που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα ζώων και στα δολώματα, και το ελάχιστο και μέγιστο επίπεδο των συγκεντρώσεων. Από το σύνολο των 20 δραστικών ουσιών που είχαν ενταχθεί στην αναλυτική μέθοδο ανιχνεύτηκαν 9 ουσίες, τρωκτικοκτόνα 2^{ης} γενιάς, καρβαμικά, πυρεθροειδές και νικοτινοειδές. Στα βιολογικά δείγματα το μεγαλύτερο ποσοστό προέρχονταν από σκύλους. Στα λοιπά ζώα αναφερόμαστε σε 2 δείγματα μικρών μηρυκαστικών και 4 δείγματα τρωκτικών. (Γράφημα 3.1.).

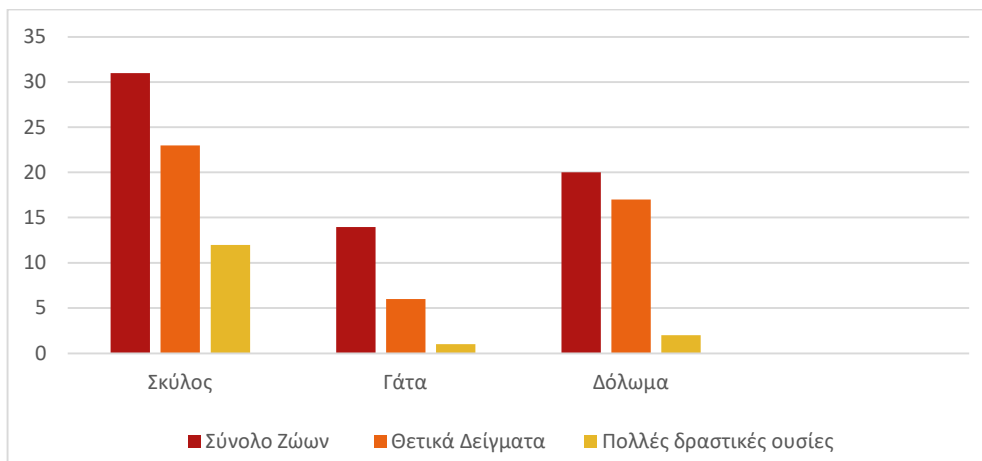


Γράφημα 3.1: Σύνολο ύποπτων βιολογικών δειγμάτων ανά είδος ζώου που αναλύθηκαν

Πίνακας 3.2: Τοξικές Ουσίες που ανιχνεύτηκαν στα ύποπτα δείγματα (ΙΔΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ)

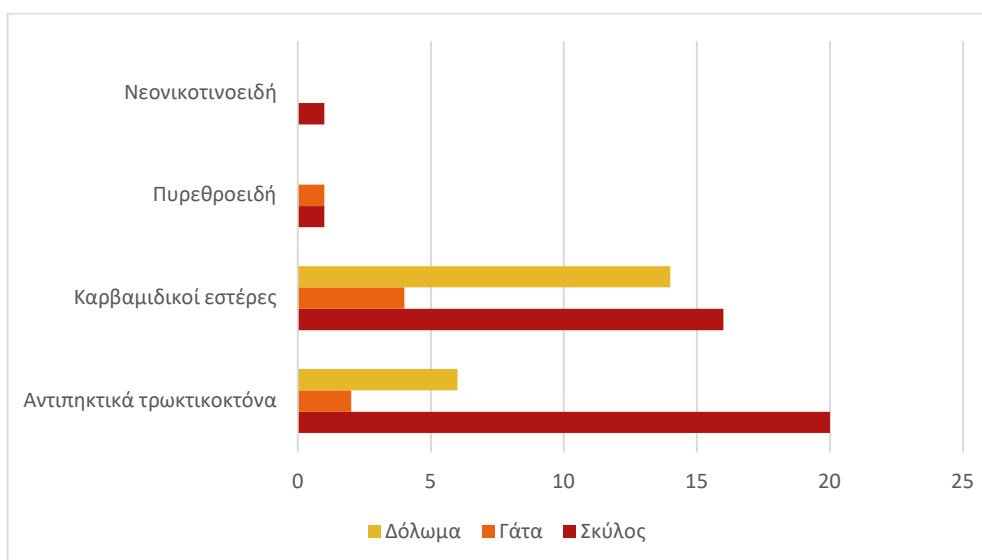
Δραστική Ουσία	Κατηγορία	Αριθμός Δειγμάτων/ Περιστατικού	Συγκέντρωση (μg/g)	
			(Ελάχιστη	Μέγιστη)
Bromadiolone	Αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα	15	LOQ	4,32
Brodifacoum	Αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα	5	0,185	3,205
Flocoumafen	Αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα	1	3,762	
chlorophacinone	Αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα	3	LOQ	0,164
Carbofuran	Καρβαμιδικοί εστέρες	7	LOQ	63,647
Methomyl	Καρβαμιδικοί εστέρες	14	0,667	17.039
Bendiocarb	Καρβαμιδικοί εστέρες	2	LOQ	2,026
Cypermethrin	πυρεθροειδή	2	0,369	0,471
Imidacloprid	νεονικοτινοειδή	1	0,282	

Στα δείγματα σκύλων ανιχνεύτηκε δραστική ουσία σε ποσοστό 74,2% με εύρεση περισσότερων της μίας δραστικής ουσίας σε ποσοστό 52%. Αντίστοιχα στις γάτες το ποσοστό των θετικών είναι 43% με ανίχνευση μιας δραστικής ουσίας, Από τα δολώματα το ποσοστό των θετικών είναι 95% και με άνω της μιας δραστικής ουσίας σε 2 δείγματα-10%. Μόνο σε ένα δείγμα ανιχνευτήκαν 3 δραστικές ουσίες. (Γράφημα 3.2.).

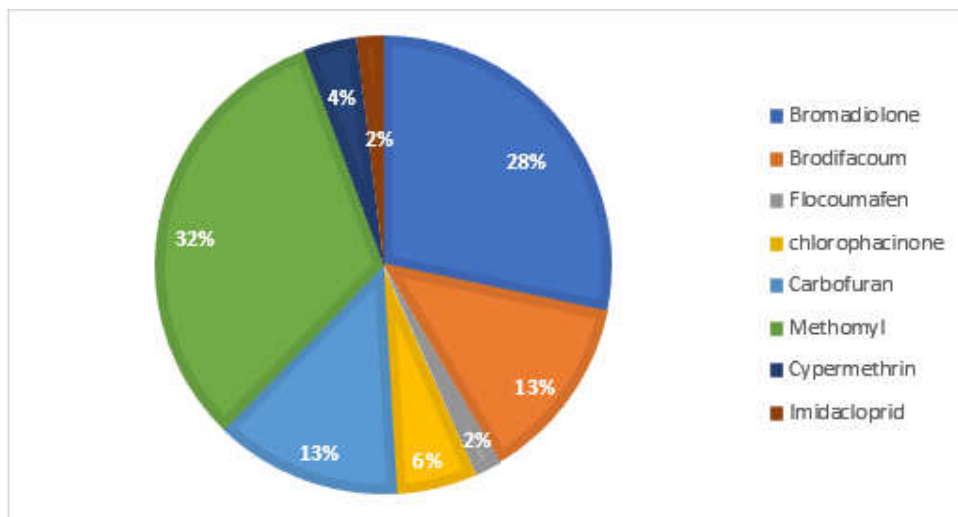


Γράφημα 3.2: Αναλογία θετικών δειγμάτων και ύπαρξη 2 δραστικών ουσιών

Τα ποσοστά καρβαμιδικών σε θετικά δείγματα ανά ζώο είναι 51,6% για δείγματα σκύλων, 28,58% για δείγματα γατών, ενώ στα δολώματα το ποσοστό είναι 70%. Από τα καρβαμιδικά φυτοπροστατευτικά τα πιο συχνά ανιχνεύσιμα είναι το methomyl και το carbofuran. Ανιχνεύτηκαν κουμαρινικά παράγωγα 2ης γενιάς σε ποσοστό 64% σε σκύλους 14,2% σε γάτες και 30% σε δολώματα με το Bromadiolone και Brodifacoum LD50 11–15 mg/kg (σε σκύλους) οι πιο ανιχνεύσιμες. Δεν ανιχνεύτηκαν οργανοφωσφορικά και μικρό ποσοστό πυρεθροειδή και νικοτινοειδή. (Γράφημα 3.3 και 3.4.).



Γράφημα 3.3: Αναλογία θετικών δειγμάτων και ύπαρξη 2 δραστικών ουσιών



Γράφημα 3.4: Ποσοστό δραστικών ουσιών που ανιχνεύθηκαν

Στο 70% των θετικών δειγμάτων ανιχνεύτηκε η δραστική ουσία τόσο στο ήπαρ όσο και στο στομάχι κυρίως για τα καρβαμιδικά. Στις περιπτώσεις εύρεσης καρβαμιδικών η συγκέντρωση στο στομάχι ήταν πολύ υψηλότερη. Αντίθετα, στα αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα, στο 50% των θετικών περιστατικών υπήρχε εύρημα μόνο στο ήπαρ, εκτός από ένα δείγμα όπου βρέθηκε υψηλή συγκέντρωση bromadiolone στο στομάχι και μηδενική στο ήπαρ. Ωστόσο, μόνο στο 12 % των θετικών αυτών δειγμάτων η συγκέντρωση ήταν υψηλή. Τα δολώματα που συνόδευαν τα βιολογικά δείγματα είχαν όλα την ίδια δραστική ουσία και δη καρβαμιδικά. Οι ανιχνεύσιμες ουσίες ταυτοποιήθηκαν και με τον αέριο χρωματογράφο εκτός των αντιπηκτικών τρωκτικοκτόνων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα των υποστρωμάτων-δειγμάτων παθολογικού υλικού, και τις σημαντικές παρεμποδίσεις που μπορούν να έχουν τα συστατικά τους στη χημική ανάλυση, η ενδεδειγμένη μελέτη των πειραματικών πρωτοκόλλων που αναφέρονται παραπάνω οδήγησε με επιτυχία στην επιλογή του βέλτιστου πρωτοκόλλου κατεργασίας. Στο ίδιο πλαίσιο, οι ανακτήσεις των δραστικών ουσιών κρίνονται ικανοποιητικές, ειδικά για το σκοπό της μελέτης, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη ανίχνευση και δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού 20 ουσιών (συμπεριλαμβανομένου του μεταβολίτη 3-PBA του πυρεθροειδούς cypermethrin), με δυνατότητα επέκτασης και σε άλλες ομάδες δραστικών ουσιών.

Το σύνολο των 70 δειγμάτων δεν είναι αντιπροσωπευτικό όμως συνηγορεί με τη τάση που υπάρχει εδώ και δεκαετίες για τη χρήση συγκεκριμένων δραστικών ουσιών για δηλητηρίαση ζώων συντροφιάς στην Ελλάδα.

Τα γεωργικά φάρμακα- φυτοπροστατευτικές ουσίες, αποτελούν τη βασικότερη αιτία δηλητηρίασης ζώων στην Ελλάδα, όπως και στις μεσογειακές χώρες (Ntemir et al. 2018, Caloni et al. 2016, Caloni, et al. 2012, Nikolaou et al. 2015), τόσο στις εξ αμελείας όσο και στις εσκεμμένες. Για την παρασκευή δολωμάτων χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο τα φυτοπροστατευτικά, το οποίο ισχύει και για άλλες χώρες της Ευρώπης (Gallocchio et al. 2015).

Τα καρβαμιδικά Φυτοπροστατευτικά είναι τα πιο διαδεδομένα με το methomyl με LD50 17-24mg/kg και το carbofuran με LD50 8-14mg/kg να αποτελούν την κύρια αιτία δηλητηριάσεων. Τα καρβαμιδικά ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό 70% στο σύνολο των θετικών σκύλων ενώ 67% στις γάτες. Το carbofuran συγκαταλέγεται στα πιο δραστικά δηλητήρια, με πολλές περιπτώσεις δηλητηριάσεων γατών και στο κέντρο της Αθήνας παρόλο που έχει απαγορευτεί η κυκλοφορία του στην Ευρώπη από το 2007 (European Commission, 2007).

Τα ποσοστά των ανιχνεύσιμων καρβαμιδικών φυτοφαρμάκων στα δολώματα 70% δείχνουν ότι στην Ελλάδα, συνεχίζει η χρήση τους να είναι πολύ διαδεδομένη και ουσία επιλογής για τα δολώματα, σε αντίθεση με άλλες χώρες που υπάρχει αλλαγή τάσης,

δηλαδή αύξηση της χρήσης της μεταλλιδεΐδης και των αντιπηκτικών τρωκτικοκτόνων (Chiari et al. 2017).

Όσο αναφορά τα αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό (N17) 74% σε σκύλους και 2 από τα 6 θετικά περιστατικά σε γάτες 33% με το Brodifacoum και Bromadiolone να αποτελούν τις πιο συχνές δραστικές ουσίες της κατηγορίας.. Στους θετικούς σκύλους το μεγαλύτερο ποσοστό τρωκτικοκτόνων ανιχνεύτηκε σε συνδυασμό με καρβαμιδικά φυτοπροστατευτικά, ενώ δε ίσχυσε το ίδιο για τις γάτες. Και στα 4 δείγματα τρωκτικών και σε 6 δολώματα ανιχνεύτηκε ποντικοφάρμακο.

Σύμφωνα με τα συνολικά αποτελέσματα, σε 35% των θετικών δειγμάτων βρέθηκε πάνω από μια δραστική ουσία. Οι περιπτώσεις αυτές είναι πολύ πιο επιβλαβείς για τα ζώα λόγω, συνέργειας των τοξικών ουσιών ή αλλοιώνοντας τη κλινική εικόνα με επακόλουθο τη δυσκολία στη διάγνωση, καθώς η δεύτερη ουσία μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα μετά από μερικές μέρες (παράγωγα δικουμαρόλης), όταν το ζώο δε νοσηλεύεται πλέον. Ο συνδυασμός οργανοφωσφορικών, καρβαμιδικών και αντιπηκτικών τρωκτικοκτόνων είναι η συχνότερη αιτία για αιφνίδια θανατηφόρα περιστατικά δηλητηριάσεων.

Στα δείγματα που αναλύθηκαν δεν ανιχνεύθηκαν οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα. Από τα δημοσιευμένα επιδημιολογικά δεδομένα υπάρχει τάση μείωσης της χρήσης οργανοφωσφορικών. (Caloni et al., 2016; Gallochio et al., 2021; Grilo et al., 2021).

Το παράδοξο είναι ότι οι δηλητηριάσεις από αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα ανιχνεύθηκαν σε χαμηλά ποσοστά στα δολώματα παρόλη την ευρεία χρήση τους στις αγροτικές περιοχές και παρόλο που ανιχνεύθηκαν στα βιολογικά όργανα. Αυτό μπορεί να οφείλεται, τουλάχιστον για τις κακόβουλες δηλητηριάσεις ζώων συντροφιάς, όπως προαναφέρθηκε, στο ότι οι δράστες θέλουν σίγουρο και άμεσο αποτέλεσμα ενώ υπάρχει ακόμα η εντύπωση ότι δεν επιφέρουν σίγουρο και άμεσο θάνατο και στο γεγονός ότι η εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων μπορεί να είναι αρκετές ώρες μετά τη λήψη της δραστικής ουσίας.

Η ανάπτυξη αντοχής των τρωκτικών σε αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα πρώτης γενιάς (FGAR) οδήγησε στην εισαγωγή αντιπηκτικών τρωκτικοκτόνων δεύτερης γενιάς (SGAR), όπως το Brodifacoum με LD50 0.2–4 mg/kg (σε σκύλους), Bromadiolone με LD50 11–15 mg/kg (στους σκύλους), Difenacoum με LD50 1.8 mg/kg (στους σκύλους)

(Sánchez-Barbudo et al. 2012). Αυτές οι ενώσεις είναι πολύ πιο τοξικές και έχουν μεγαλύτερη ημιπερίοδο ζωής σε ιστούς, όπως το ήπαρ. Και τα δύο αυτά χαρακτηριστικά, αυξάνουν τη πιθανότητα πρωτογενούς δηλητηρίασης μη στοχευμένων ειδών και το κίνδυνο δευτερογενούς δηλητηρίασης στα αρπακτικά (Walker et al. Thomas et al. 2011, Sánchez-Barbudo et al. 2012, Langford et al. 2013, Ruiz-Suarez et al. 2015).

Πιθανότατα ο μικρός αριθμός ανιχνευμένων τροφτικοκτόνων τα προηγούμενα χρόνια, να οφείλεται και στη μη ανάλυση τους, για εύρεση δεύτερης δραστικής ουσίας, μετά την ανίχνευση καρβαμιδικών ή οργανοφωσφορικών στο δείγμα. Η ανάπτυξη νέων μεθόδων με την εισαγωγή εξειδικευμένων ανιχνευτών δίνει την δυνατότητα να ανιχνεύονται ταυτόχρονα πολλές ομάδες δραστικών ουσιών.

Στα δολώματα που συνόδευαν τα δηλητηριασμένα ζώα ανιχνεύτηκαν καρβαμιδικά φυτοπροστατευτικά, ίδια δραστική ουσία που ανιχνεύτηκε και στο στόμαχο/ήπαρ των ζώων. Δικαιολογείται λόγω της άμεσης δράσης τους ώστε τα ζώα να μην έχουν τη δυνατότητα να απομακρυνθούν από το σημείο λήψης των αλλά και της ανικανότητας να προκληθεί έμετος. Η ύπαρξη άρτιου δολώματος ή εμφανής δραστική ουσία αναμειγμένη με τροφή στο στομαχικό περιεχόμενο ή ύπαρξη δολώματος σε κοντινή απόσταση από το δηλητηριασμένο ζώο, υποδηλώνει χρήση δραστικών ουσιών μεγάλης τοξικότητας.

Στη περίπτωση υποψίας δηλητηρίασης σε νεκρά ζώα σκοπός είναι η ανίχνευση της τοξικής ουσίας για επιβεβαίωση της αιτίας θανάτου και πιθανόν προάσπιση άλλων ζώων που βρίσκονται στον ίδιο χώρο ή περιοχή. Πολλές φορές η πιστοποίηση της αιτίας θανάτου και ταυτοποίηση της δραστικής ουσίας είναι απαίτηση δικαστικών εντολών και μηνυτήριων αναφορών (ΦΕΚ, 2021)

Η σωστά τεκμηριωμένη τοξικολογική διάγνωση, στηρίζεται σε ένα σύνολο διαδικασιών και παραμέτρων όπως το ιστορικό, το περιβάλλον που διαβιεί ή διαβιούσε το ζώο, τα κλινικά συμπτώματα πριν τον θάνατο και την υποψία σύμφωνα με την οποία το ζώο εκτέθηκε σε τοξική ουσία (Galey 1995). Η έκβαση μιας τοξικολογικής ανάλυσης είναι συνιστώσα πολλών παραγόντων και περιλαμβάνει όλες τις διαδικασίες από την έναρξη των συμπτωμάτων σε ζωντανό ζώο ή ανεύρεση του πτώματος. Όλα τα σημεία της διαδικασίας είναι κρίσιμα για τη διεκπεραίωση της τοξικολογικής ανάλυσης από τη συλλογή στοιχείων που θα εμπλουτίσουν το ιστορικό με πολύτιμες πληροφορίες, τα

νεκροτομικά ευρήματα και το σύνολο των βιοχημικών εξετάσεων που έχουν πραγματοποιηθεί, τη δειγματοληψία καθώς και την συντήρηση και αποστολή των δειγμάτων.

Η αποστολή στομάχου ή/και στομαχικού περιεχομένου σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των αναλύσεων, δηλώνει ότι ο στόμαχος αποτελεί όργανο επιλογής για το μεγαλύτερο ποσοστό των ύποπτων δηλητηριάσεων στην Ελλάδα. Όμως η αποστολή τμήματος ήπατος, κρίνεται επιβεβλημένη για ανίχνευση και άλλων ομάδων τοξικών ουσιών όπως βαρέα μέταλλα και τρωκτικοκτόνα, αλλά και άλλων οργάνων, ώστε να υπάρχει πάντα περίσσεια βιολογικού υλικού για ανάλυση.

Η έρευνα είναι εστιασμένη στα ζώα συντροφιάς. Συγκρίνοντας στατιστικά δεδομένα άλλων χωρών, επιβεβαιώνεται ότι τα ζώα συντροφιάς παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό δηλητηριάσεων. Για τα ζώα συντροφιάς, ένα μικρό ποσοστό των δηλητηριάσεων ζώων οφείλεται σε ατύχημα, όμως από το ιστορικό και τα κλινικά συμπτώματα προκύπτει, ότι το μεγαλύτερο ποσοστό, οφείλεται σε κακόβουλη πράξη, χωρίς απαραίτητα να είναι στοχευμένη. Σε αυτό το συμπέρασμα συνηγορούν οι μαρτυρίες ιδιοκτητών και η ανεύρεση δολωμάτων τοποθετημένων και κρυμμένων με μεθοδευμένους τρόπους. Οι διαφορετικοί τύποι δολωμάτων, η χρήση μεγάλων συγκεντρώσεων δραστικής ουσίας μεγάλης τοξικότητας, ο τόπος και τρόπος εναπόθεσης των καθώς και το ελκυστικό τρόφιμο που χρησιμοποιήθηκε ως βάση (συμπεράσματα που προήλθαν από το διαβιβαστικό των δειγμάτων), δείχνει ότι έχουν προετοιμαστεί με εγκληματική πρόθεση, με στόχο κατοικίδια ζώα στις αστικές και αγροτικές περιοχές και όλα τα ζώα στις δασικές περιοχές. Η τοποθέτηση τους σε δημόσιους ή /και ιδιωτικούς χώρους, εγκυμονεί κινδύνους στη δημόσια υγεία. Την τελευταία δεκαετία, πολλές δημοσιεύσεις ιδιαιτέρως από μεσογειακές χώρες, όπως η Ιταλία, η Ισπανία και η Γαλλία καταγράφουν την κακόβουλη δηλητηρίαση ζώων, μέσω των δεδομένων των αντίστοιχων τοξικολογικών αναλύσεων (Chiari et al. 2017, Bille et al. 2016, Berny et al. 2010, De Roma et al. 2018).

Όσον αφορά τις περιπτώσεις τυχαίων δηλητηριάσεων, γίνονται προσπάθειες από τις φαρμακευτικές βιομηχανίες, από ηθικής πλευράς, για την παρασκευή δολωμάτων και σκευασμάτων ώστε να αποφεύγεται η τυχαία λήψη από ζώα μη στόχων (συμπεριλαμβανομένου του τύπου και της ποσότητας της τοξικής ουσίας που χρησιμοποιείται, του τύπου του δολώματος, της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας και

του τρόπου με τον οποίο παρουσιάζεται το δόλωμα (Glen et al. 2007). Καθημερινά, εμφανίζονται στη αγορά, νέα εμπορικά σκευάσματα με μεγαλύτερη ειδικότητα είτε, με αύξηση της ελκυστικότητάς στα είδη στόχου ή μειώνοντας την ελκυστικότητα σε μη στοχευόμενα ζώα. Συνήθως χρησιμοποιούνται απωθητικά ή μικρότερες συγκεντρώσεις δραστικής ουσίας (Martinez-Haro et al. 2008).

Ενδεχομένως κίνητρα για τη χρήση δολωμάτων στις δασικές και στις αγροτικές περιοχές είναι οι ζημιές που προκαλούν στη φυτική και ζωική παραγωγή τα επιβλαβή ζώα (αλεπούδες, ασβοί, λύκοι, αγριοκούνελα, κ.ά.). Επιπρόσθετα, τα δηλητηριασμένα δολώματα στοχεύουν πολύ συχνά στην εξόντωση σκύλων, κυρίως αδέσποτων αλλά και ποιμενικών ή κυνηγετικών σε περιπτώσεις προσωπικών αντιδικιών μεταξύ χρηστών γης ή μεταξύ κτηνοτρόφων και κυνηγών (Skartsi, et al., 2014; Xirouchakis, et al., 2000). Η χρήση δηλητηριασμένων δολωμάτων, επειδή δεν είναι επιλεκτική μέθοδος, επηρεάζει περισσότερα είδη από εκείνα κατά των οποίων απευθύνονται, συνεπώς μπορεί να αποτελέσει σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία και του οικοσυστήματος (Ruiz-Suárez et al. 2015). Τα δολώματα, έχουν επιζήμιες επιπτώσεις σε πληθυσμούς απειλούμενων και προστατευόμενων ειδών. Στο σημείο αυτό πρέπει να γίνει αναφορά και στη δευτερογενή δηλητηρίαση όπου τα ζώα συντροφιάς, τα άγρια πτηνά αλλά και ο άνθρωπος είναι επιρρεπή καταναλώνοντας δηλητηριασμένα θηράματα.

Όσο αφορά τις αστικές περιοχές, τα δηλητηριασμένα δολώματα είναι η πιο σημαντική αιτία δηλητηρίασης για σκύλους και γάτες (Bille et al. 2016). Χρησιμοποιούνται, ως τρόπος εκδίκεσης για την επίλυση διαφορών μεταξύ ιδιοκτητών ή έχουν στόχο τα αδέσποτα ζώα. Τα δείγματα σκύλων προέρχονται τόσο από αστικές όσο και από αγροτικές περιοχές, σε αντίθεση οι δηλητηριασμένες γάτες προέρχονταν κυρίως από τις αστικές περιοχές. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην αύξηση του αριθμού των σπιτιών που φιλοξενούν γάτες με πρόσβαση στους εξωτερικούς χώρους και στο ότι τα ενεργά σωματεία για γάτες, τα οποία συνήθως προβαίνουν σε καταγγελία, εδρεύουν σε μεγάλες αστικές περιοχές. Πιθανολογείται επίσης, ότι καθώς ο αριθμός των γατών σε κοινόχρηστους χώρους και ο μέσος όρος ζωής τους έχει αυξηθεί πολύ, αυτό να προκαλεί έντονη δυσαρέσκεια σε άλλους κατοίκους. Ειδικά για τις γάτες σπάνια καταγγέλλονταν περιστατικά δηλητηριάσεων παρόλο που ο συνολικός αριθμός τους σύμφωνα με την έκθεση του FEDIAF, του Συνδέσμου της ευρωπαϊκής βιομηχανίας ζωοτροφών για

κατοικίδια, το 2016 στην Ελλάδα ήταν 590χιλ.έναντι 660 χιλ που ήταν οι σκύλοι. Από την άλλη πλευρά, παρόλο που ο πληθυσμός των γατών στις αγροτικές περιοχές είναι μεγάλος. δεν καταγράφονται πολλές δηλητηριάσεις πιθανότατα λόγω του ότι δε καταγγέλλονται.

Η χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι απαραίτητη στη γεωργία και η χρήση των σκευασμάτων μπορεί να θεωρηθεί αρκετά ασφαλή όταν ακολουθούνται κανόνες σωστής διαχείρισης και ορθολογικής χρήσης, όμως χαρακτηρίζονται ιδιαίτερα επιβλαβή, σε περίπτωση λανθασμένων χειρισμών, τόσο για τον άνθρωπο, για τα ζώα και για το περιβάλλον.

Το Μάρτιο του 2018 αναρτήθηκαν στο διαδίκτυο μέσω της επίσημης ιστοσελίδας του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, τα στατιστικά στοιχεία, για δηλητηριάσεις ανθρώπων και λίγων ζώων ανά Περιφέρεια για τα έτη 2015, 2016 και 2017 από το Κέντρο Δηλητηριάσεων (ΥΠΑΑΤ, 2018). Σύμφωνα με αυτά, καταγράφηκαν 498 περιστατικά οξείας δηλητηρίασης στον άνθρωπο, με 3 θανάτους για το 2017. Διαπιστώθηκε, μεγάλος αριθμός επαγγελματικής έκθεσης σε φυτοπροστατευτικά σκευάσματα, που αποδίδεται σε πλημμελή μέτρα ασφάλειας και ελλιπή εκπαίδευση των αγροτών. Είναι λοιπόν σαφές, ότι η συνεχής ενημέρωση και εκπαίδευση των αγροτών στην ορθολογική χρήση των φυτοπροστατευτικών, θα μπορούσε να αποτρέψει μεγάλο αριθμό δηλητηριάσεων τόσο των ανθρώπων όσο και των παραγωγικών ζώων και ζώων συντροφιάς που βρίσκονται στις αγροτικές περιοχές.

Σύμφωνα με τη μελέτη, η ανίχνευση απαγορευμένων δραστικών ουσιών σε βιολογικά δείγματα και δολώματα του έτους 2023 φαίνεται, ότι ακόμα χρησιμοποιούνται ευρέως, για σκόπιμες δηλητηριάσεις ζώων. Θεωρητικά είναι ποσότητες που έχουν απομείνει στον αγροτικό πληθυσμό πριν την απόσυρση των προϊόντων αλλά και λόγω του μεγάλου κυκλώματος παράνομης διακίνησης απαγορευμένων και μη φυτοπροστατευτικών ουσιών, στη χώρα μας. Συγκεκριμένα, σε εφαρμογή του νόμου περί παράνομης κυκλοφορίας φυτοπροστατευτικών (4036/2012), το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων έχει χειριστεί περισσότερες από 51 περιπτώσεις εμπορίας παράνομων σκευασμάτων μόνο για το 2017. Σύμφωνα με έγγραφο της Δ/νσης Προστασίας Φυτικής Παραγωγής, η παραβατικότητα των παράνομων φυτοπροστατευτικών προϊόντων παρουσιάζει έξαρση και για την αντιμετώπιση του φαινομένου απαιτείται η

εντατικοποίηση των διενεργούμενων ελέγχων. Οι Ελεγκτικές Αρχές και Φορείς δηλαδή οι Διευθύνσεις Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής των κατά τόπους Π.Ε., τα Περιφερειακά Κέντρα Προστασίας Φυτών, Ποιοτικού και Φυτοϋγειονομικού Ελέγχου του ΥΠΑΑΤ και οι Τελωνειακές Αρχές, πρέπει να εντατικοποιήσουν τους ελέγχους τους μήνες Ιανουάριο έως Μάρτιο καθώς εκείνη την περίοδο, συνήθως εισάγονται αρκετά φυτοπροστατευτικά προϊόντα για να συσκευαστούν και να τροφοδοτήσουν τα καταστήματα εμπορίας τους. Επίσης πρέπει να επιβάλλονται με αυστηρότητα τα νομοθετημένα πρόστιμα και κυρώσεις (ΥΠΑΑΤ 2018). Στην κατεύθυνση αυτή κινούνται όλες οι τροποποιήσεις του νόμου με πολύ υψηλές κυρώσεις και με φυλάκιση (ΦΕΚ, 2015, 2021).

Μεμονωμένα περιστατικά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον όπως ανίχνευσης cypermethrin σε γάτες. Η αυξημένη ευαισθησία του ζώικου αυτού είδους στις πυρεθρίνες, οφείλεται στη μειωμένη δραστηριότητα των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό των πυρεθρινοειδών στο ήπαρ (τοξίκωση τύπου Α) και συγκεκριμένα της γλυκουρονικής τρανσφεράσης (Richardson 2000). Η δηλητηρίαση μπορεί να οδηγήσει σε σιελόρροια, έμετο, μυϊκό τρόμο, αταξία, επιληπτικές κρίσεις και θάνατο (Anadón, et al., 2009). Η έγκαιρη υποστηρικτική θεραπεία είναι αποτελεσματική σε 24 έως 72 ώρες (Anadón et al. 2009).

Για την αποτελεσματική αντιμετώπιση του φαινομένου των δηλητηριάσεων ζώων στην Ελλάδα, έχουν θεσπιστεί πολλοί νόμοι στο πλαίσιο της ευζωίας των ζώων 4039 /12, . Νόμος 4830/2021 (ΦΕΚ 169/Α/18-9-2021) Νέο πλαίσιο για την ευζωία των ζώων συντροφιάς - Πρόγραμμα «ΑΡΓΟΣ» και λοιπές διατάξεις και την ΥΑ 168599/1495/2018 του ΥΠΕΝ και την Υ.Π.ΕΝ./ΔΔΔ/83415/271582022- ΦΕΚ: 4459/Β/22.8.2022<< Τοπικό Σχέδιο Δράσης για την καταπολέμηση της παράνομης χρήσης δηλητηριασμένων δολωμάτων>>. Αντίστοιχη εκστρατεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, που πραγματοποιήθηκε το 2016, με ενημερώσεις φυλλάδια, πόστερ, βιβλία για παιδιά (ΥΠΑΑΤ 2016), πρέπει να επαναλαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα με πιο τοπικό χαρακτήρα. Προτείνεται η κινητοποίηση και ενεργοποίηση των Δήμων με άμεση συνεργασία με τα σχολεία και ενσωμάτωση διαδραστικών προγραμμάτων κατά τις σχολικές διδακτικές ώρες της Κοινωνικής και Πολιτικής Αγωγής. Μεμονωμένες ομιλίες

ιδιωτών Κτηνιάτρων στα σχολεία, έχουν δείξει μεγάλη ευαισθητοποίηση των μικρών παιδιών που η αγάπη τους για τα ζώα είναι ενστικτώδης και αναμφισβήτητη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Αντωνίου, Β., Τσούκαλη-Παπαδοπούλου, Ε., & Επιβατιανός, Π. (1993). Εφαρμοσμένη κτηνιατρική τοξικολογία. Θεσσαλονίκη: University Studio Press.
- Αντωνίου, Β., Τσούκαλη-Παπαδοπούλου, Ε., & Ζαντόπουλος, Ν. (2002). Δηλητηριάσεις ζώων: Συμπεράσματα 10 χρόνων από τοξικολογικές αναλύσεις κτηνιατρικού ενδιαφέροντος. In Κ. Νικολάου (Ed.), Πρακτικά 1ου Περιβαλλοντικού Συνεδρίου Μακεδονίας. Θεσσαλονίκη: 1ο Περιβαλλοντικό Συνέδριο Μακεδονίας. Retrieved December 17, 2018 from <http://kynigos.net.gr/diaxirisi/articles/dilitiriaseis.html>
- Αττά-Πολίτου, Τ. (2011). Εισαγωγή στην τοξικολογία. Τοξικά αέρια και διαλύτες. Retrieved December 12, 2018, from <https://docplayer.gr/2633853-Toxika-aeria-kai-dialytes.html>
- Βερονίκη, Φ., & Παπαδόπουλος, Α. (2001). Δηλητηριάσεις. Θέματα Αναισθιολογίας Και Εντατικής Ιατρικής, 11(23), 154–165.
- Δεληγιαννάκης, Ι., Χελά, Δ., & Κωνσταντίνου, Ι. (2010). Χρωματογραφικές Μέθοδοι. In Ενόργανη Περιβαλλοντική Ανάλυση (pp. 89–90, 92, 139–140, 182). Αθήνα: Εκδόσεις Τζιόλα.
- Διοσκουρίδης. (2006). Περί ύλης ιατρικής. Λόγοι πέντε (αποσπάσματα). (Ε. Α. Βαρέλλα, Ed., Θ. Γ. Μανρόπουλος, Trans.). Θεσσαλονίκη: Ζήτρος.
- Θωμαΐδης, Ν. (2008). Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές. Αθήνα: ΕΚΠΑ, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας.
- Καλοκαιρινός, Α. Κ. (2015). Αναλυτική Χημεία. Αθήνα: ΣΕΑΒ.
- Καπετανάκης, Ε. (2002). Μέθοδοι και Μέσα Αντιμετώπισης Φυτοπαρασίτων. Κρήτη.
- Κουμπάρης, Μ. (2011). Υγρή χρωματογραφία ΚΕΦ.20Β Retrieved December 12, 2018, from https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/CHEM233/%CE%9A%CE%95%CE%A6.20%CE%92_%CE%A5%CE%93%CE%A1%CE%97%20%CE%A7%CE%A1%CE%A9%CE%9C%CE%91%CE%A4%CE%9F%CE%93%CE%A1%CE%91%CE%A6%CE%99%CE%91.pdf
- Κουμπάρης, Μ. (2011). _Υγρή χρωματογραφία ΚΕΦ.20Γ Retrieved December 12, 2018, from https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/CHEM233/%CE%9A%CE%95%CE%A6.20%CE%93_%CE%A5%CE%93%CE%A1%CE%97%20%CE%A7%CE%A1%CE%A9%CE%9C%CE%91%CE%A4%CE%9F%CE%93%CE%A1%CE%91%CE%A6%CE%99%CE%91.pdf
- Κουμπάρης, Μ. (2016). Φασματομετρία Υπεριώδους Ορατού UV-Vis. Retrieved December 12, 2018, from <https://docplayer.gr/13441985-Kef-8-fasma>
- Κουμπάρης, Μ. (2016). Ιοντική χρωματογραφία ΚΕΦ.21 Retrieved December 12, 2018, from http://195.134.76.37/old_site_10-7-2016/courses/Separations/%CE%9A%CE%95%CE%A6.21%20%CE%99%CE%9F%CE%9D%CE%A4%CE%99%CE%9A%CE%97%20%CE%A7%CE%A1%CE%A9%CE%9C%CE%91%CE%A4%CE%9F%CE%93%CE%A1%CE%91%CE%A6%CE%99%CE%91.pdf

- Κωτσάκη-Κοβάτση, Β.-Π. (2004). Κτηνιατρική Τοξικολογία.
- Μπακέας, Ε. (2008). Αεριοχρωματογραφία. Retrieved December 27, 2018, from https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/CHEM165/%CE%91%CE%B5%CF%81%CE%B9%CE%BF%CF%87%CF%81%CF%89%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CE%B3%CF%81%CE%B1%CF%86%CE%AF%CE%B1_2009.pdf
- Νιώπας, Ι. (2016). Μαθήματα Τοξικολογίας. Retrieved December 13, 2018, from <https://slideplayer.gr/slide/2900876/>
- Ντουρτόγλου, Β., Χατζηλαζάρου, Α., & Ντουρτόγλου Ευθαλία. (2016). Σύγχρονη μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης. Ενότητα 4: Χρωματογραφία, Φασματογραφία μάζας, Ισοτοπική ανάλυση, NMR. Retrieved December 27, 2018, from <https://slideplayer.gr/slide/3625369/>
- Ομήρου Ιλιάς - Ραψωδία Ο. Retrieved December 12, 2018, from <http://users.uoa.gr/~nektar/arts/tributes/omhros/il15.htm>
- Παπαδόπουλος, Γ. (2015). Ο Παράκελσος και η σύγχρονη ιατρική. Τρίκαλα: Επέκεινα.
- Παπαδόπουλος, Γ. (2011). Τα φάρμακα στην Αρχαία Ελλάδα: Ανάμεσα στο μύθο, τη λαϊκή εμπειρική θεραπευτική και την επιστήμη. Αρχαιολογία & Τέχνες, (102).
- Σκουρολιάκου, Μ. (2015). Τοξικολογία - Διατροφή. Retrieved December 13, 2018, from <https://docplayer.gr/5030244-Toxikologia-diatrofi.html>
- ΥΠΑΑΤ. (2016). Εκστρατεία ευαισθητοποίησης για τη φιλοζωία από τον Παγκόσμιο Οργανισμό για την Υγεία των Ζώων. Retrieved December 18, 2018, from <http://www.minagric.gr/index.php/el/for-citizen-2/pets/3678-filozoiia>
- ΥΠΑΑΤ. (2018). Ενημέρωση του κοινού, των κατόχων εγκρίσεων και των πωλητών γεωργικών φαρμάκων σχετικά με περιστατικά οξείας δηλητηρίασης από γεωργικά φάρμακα. Retrieved December 18, 2018, from http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Georgika_Farmaka/elenxoi/Statistika_Dhlhthriaseis_080318.pdf
- ΥΠΑΑΤ. (2017). Επιδημιολογικά Στοιχεία Δηλητηριάσεων. Retrieved December 18, 2018, from <http://0317.syzefxis.gov.gr/wp-content/uploads/2017/12/Apolog2015.pdf>
- ΦΕΚ. (2015). Νόμος 4351/2015—ΦΕΚ 164/Α/4-12-2015 (Κωδικοποιημένος). e-nomothesia.gr | Τράπεζα Πληροφοριών Νομοθεσίας. <https://www.e-nomothesia.gr/kat-agrotike-anaptukse/ktenotrophia/n-4351-2015.html>
- ΦΕΚ. (2021a). Νόμος 4859/2021 ΦΕΚ Α 228/27.11.2021. <https://www.taxheaven.gr/law/4859/2021>
- ΦΕΚ. (2021b, September 19). Νόμος 4830/2021—ΦΕΚ 169/Α/18-9-2021 (Κωδικοποιημένος). e-nomothesia.gr | Τράπεζα Πληροφοριών Νομοθεσίας. <https://www.e-nomothesia.gr/kat-zoa-suntrophias-prostasia-zoon/nomos-4830-2021-phek-169a-18-9-2021.html>

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2009). Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, 182(1), 7–20. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.04.008>
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412–31.
- Arnold, B. S. (2012). Sample submission for toxicological analysis. In R. Gupta (Ed.), *Veterinary Toxicology, Basic and Clinical Principles* (2nd ed., pp. 1335–1340). London: Academic Press.
- Bates, N. S., Sutton, N. M., & Campbell, A. (2012). Suspected metaldehyde slug bait poisoning in dogs: a retrospective analysis of cases reported to the Veterinary Poisons Information Service. *Veterinary Record*, 171(13), 324–324. <http://doi.org/10.1136/vr.100734>
- Beckett, E. M., Abelmann, A., Roberts, B., Lewis, R. C., Cheatham, D., Miller, E. W., Hall, E., & Pierce, J. S. (2023). An updated evaluation of reported no-observed adverse effect levels for chrysotile, amosite, and crocidolite asbestos for lung cancer and mesothelioma. *Critical Reviews in Toxicology*, 53(10), 611–657. <https://doi.org/10.1080/10408444.2023.2283169>
- Berny, P., Caloni, F., Croubels, S., Sachana, M., Vandenbroucke, V., Davanzo, F., & Guitart, R. (2010). Animal poisoning in Europe. Part 2: Companion animals. *The Veterinary Journal*, 183(3), 255–259. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.034>
- Beyer, A., & Biziuk, M. (2008). Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. *Food Chemistry*, 108(2), 669–680. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.024>
- Bille, L., Toson, M., Mulatti, P., Dalla Pozza, M., Capolongo, F., Casarotto, C., Binato, G. (2016). Epidemiology of animal poisoning: An overview on the features and spatio-temporal distribution of the phenomenon in the north-eastern Italian regions. *Forensic Science International*, 266, 440–448. <http://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.07.002>
- Bradberry, S. M., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2004). Glyphosate poisoning. *Toxicological Reviews*, 23(3), 159–67.
- Braselton, W. E., & Johnson, M. (2003). Thin layer chromatography convulsant screen extended by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 15(1), 42–45. <http://doi.org/10.1177/104063870301500109>
- Brent, J. (2017). *Critical care toxicology: Diagnosis and management of the critically poisoned patient*. Springer Berlin Heidelberg.

- Brown, P., Charlton, A., Cuthbert, M., Barnett, L., Ross, L., Green, M., ... Fletcher, M. (1996). Identification of pesticide poisoning in wildlife. *Journal of Chromatography. A*, 754(1–2), 463–78.
- Caloni, F., Cortinovis, C., Rivolta, M., & Davanzo, F. (2012). Animal poisoning in Italy: 10 years of epidemiological data from the Poison Control Centre of Milan. *Veterinary Record*, 170(16), 415–415. <http://doi.org/10.1136/vr.100210>
- Caloni, F., Cortinovis, C., Rivolta, M., & Davanzo, F. (2016). Suspected poisoning of domestic animals by pesticides. *Science of The Total Environment*, 539, 331–336. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.005>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2012). Occupational phosphine gas poisoning at veterinary hospitals from dogs that ingested zinc phosphide--Michigan, Iowa, and Washington, 2006-2011. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 61(16), 286–288.
- Chiari, M., Cortinovis, C., Vitale, N., Zaroni, M., Faggionato, E., Biancardi, A., & Caloni, F. (2017). Pesticide incidence in poisoned baits: A 10-year report. *The Science of the Total Environment*, 601–602, 285–292. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.158>
- Coats, J. R. (1990). Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87, 255–62. <http://doi.org/10.1289/ehp.9087255>
- Cocchi, M., Vascellari, M., Gallina, A., Agnoletti, F., Angeletti, R., & Mutinelli, F. (2010). Canine nephrotoxicosis induced by melamine-contaminated pet food in Italy. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 72(1), 103–7.
- Crespo, J. M. (2011). Intoxicación por plantas en el toro bravo. In X Simposium del Toro de Lidia. Edición digital de la revista del Symposium del Toro de Lidia. Zafra, Badajoz, Spain. Retrieved December 18, 2018 from <http://www.simposiotorozafra.org/index.php?codigo=499>
- Cuzick, J. (1985). A Wilcoxon-type test for trend. *Statistics in Medicine*, 4(1), 87–90.
- Daunoras, G. (2012). *Veterinary Toxicology. Lecture notes and classes works*. Kaunas.
- De Jong, W. H., Carraway, J. W., & Geertsma, R. E. (2012). In vivo and in vitro testing for the biological safety evaluation of biomaterials and medical devices. In J.-P. Boutrand (Ed.), *Biocompatibility and Performance of Medical Devices* (pp. 120–158). Philadelphia, PA: Woodhead Publishing. <http://doi.org/10.1533/9780857096456.2.120>
- De Roma, A., Miletti, G., D'Alessio, N., Marigliano, L., Bruno, T., Gallo, P., Binato, G., & Esposito, M. (2018). Inspective and toxicological survey of the poisoned baits and bites. *Forensic Science International*, 287, 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.03.038>
- De Roma, A., Rossini, C., Rivero, C., Galiero, G., & Esposito, M. (2017). Endosulfan poisoning in canids and felids in the Calabria region of southern Italy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 29(1), 122–125. <http://doi.org/10.1177/1040638716681389>

- Denogean, F., Moreno, S., Martín, M., & Ibarra, F. (2008). Impacto económico de las plantas tóxicas para el ganado sobre la producción pecuaria en Sonora. *Revista Mexicana de Agronegocios*, XII(22), 538–549.
- Deshmukh, C. D., & Pawar, A. T. (2020). General Principles, Types, Diagnosis and Management of Poisoning. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 09(05), 155–162. <https://doi.org/10.36347/sajp.2020.v09i05.001>
- Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Duarte, J. A., Remião, F., Marques, A., Santos, A., & Magalhães, T. (2010). Collection of biological samples in forensic toxicology. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20(7), 363–414. <http://doi.org/10.3109/15376516.2010.497976>
- Dunlap, K. L., Reynolds, A. J., Tosini, G., Kerr, W. W., & Duffy, L. K. (2007). Seasonal and diurnal melatonin production in exercising sled dogs. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 147(4), 863–867. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.015>
- Dunnivant, F. M., & Ginsbach J. (2008). The Liquid Chromatography. Retrieved December 27, 2018, from http://people.whitman.edu/~dunnivfm/C_MS_Ebook/CH3/3_3.html
- Eaton, D. L., & Gilbert, S. G. (2008). Principles of toxicology. In C. D. Klaassen (Ed.), *Casarett and Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons* (7th ed., pp. 11–43). USA: McGraw-Hill.
- EFSA. (2023, April 27). *Margin of Exposure* | EFSA. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/margin-exposure>
- El-Aneed, A., Cohen, A., & Banoub, J. (2009). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3), 210–230. <http://doi.org/10.1080/05704920902717872>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
- Ensley, S. (2007). Pyrethrins and pyrethroids. In R. C. Gupta (Ed.), *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles* (2nd ed., pp. 494–498). Academic Press. <http://doi.org/10.1016/B978-012370467-2/50138-3>
- EPA. (n.d.). *Reregistration Eligibility Decision (RED)*, EPA 738-R-98-007.
- EPA & United States: Environmental Protection Agency. (1998). Rodenticide Cluster Reregistration Eligibility Decision Document for Comment. Notices. *Federal Register*. Vol. 63, No. 227, 65043–65516.
- European Commission. (2007). COMMISSION DECISION of 13 June 2007 concerning the non-inclusion of carbofuran in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing that substance (notified under document number C(2007). Official Journal of the European Union.
- European Commission. (2005). COMMISSION DECISION of 2 December 2005 concerning the non-inclusion of endosulfan in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance (notified under document numbe. Official Journal of the European Union, 25–28.

- Feo, M. L., Eljarrat, E., & Barcelo, D. (2010). Determination of Pyrethroid Insecticides in Environmental Samples by GC–MS and GC–MS–MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(7), 692–705.
- Firth, J., Conlon, C., & Cox, T. (Eds.). (2020). *Oxford Textbook of Medicine* (6th ed.). Oxford University Press/Oxford. <https://doi.org/10.1093/med/9780198746690.001.0001>
- Filigenzi, M. (2018). Analytical Toxicology and Sample Submission Requirements. In R. C. Gupta (Ed.), *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles* (3rd ed., pp. 1119–1137). London: Academic Press.
- Fishel, F. M. (2005). Pesticide Toxicity Profile: Carbamate Pesticides IFAS Extension. Florida.
- Gad, S. C. (2014). Rodents model for toxicity testing and Biomarkers. In R. Gupta (Ed.), *Biomarkers in Toxicology* (pp. 7–69). Academic Press.
- Gad, S. C., & Barbare, R. (2012). Statistics in veterinary toxicology. In *Veterinary Toxicology* (pp. 168–186). Academic Press. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-385926-6.00012-0>
- Galey, F. D. (2000). Diagnostic toxicology for the food animal practitioner. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 16(3), 409–421.
- Galey, F. D. (1995). Diagnostic and forensic toxicology. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 11(3), 443–454.
- Galey, F. D., & Hall, J. O. (1990). Field investigations of small animal toxicoses. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 20(2), 283–291.
- Gallo, M. A. (2008). History and Scope of Toxicology. In C. D. Klaassen (Ed.), *Casarett and Doull's Toxicology, the Basic Science of Poisons* (7th ed., pp. 3–10). USA: McGraw-Hill.
- Gallocchio, F., Basilicata, L., Benetti, C., Angeletti, R., & Binato, G. (2015). Multi-residue determination of seven methyl-carbamate pesticides by high-performance liquid chromatography with diode array detection: investigation of suspected animal poisoning in the period 2010–2014 in north-eastern Italy. *Austin. J. Forensic. Sci. Criminol*, 2(4).
- Gallocchio, F., Basilicata, L., Benetti, C., Angeletti, R., & Binato, G. (2014b). Multi-residue determination of eleven anticoagulant rodenticides by high-performance liquid chromatography with diode array/fluorimetric detection: Investigation of suspected animal poisoning in the period 2012–2013 in north-eastern Italy. *Forensic Science International*, 244, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.08.012>
- Gallocchio, F., Moressa, A., Stella, R., Rosin, R., Basilicata, L., Bille, L., Toson, M., Biancotto, G., Lega, F., Angeletti, R., & Binato, G. (2021c). Fast and simultaneous analysis of carbamate pesticides and anticoagulant rodenticides used in suspected cases of animal poisoning. *Forensic Science International*, 323, 110810. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110810>
- Gallocchio, F., Moressa, A., Stella, R., Rosin, R., Basilicata, L., Bille, L., Toson, M., Biancotto, G., Lega, F., Angeletti, R., & Binato, G. (2021a). Fast and simultaneous analysis of carbamate pesticides and anticoagulant rodenticides used in suspected cases of animal poisoning. *Forensic Science International*, 323, 110810.

- García-Arroyo, R., Míguez, M.-P., Hevia, M.-L., & Quiles, A. (2015). Cattle mortality due to poisoning in Spain: a cross-sectional epidemiological study. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 13(1), e0502. <http://doi.org/10.5424/sjar/2015131-6613>
- Gates, P. J. (2014). Electron Ionisation (EI). Retrieved December 27, 2018, from <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/ei-ionisation.xhtml>
- Glen, A. S., Gentle, M. N., & Dickman, C. R. (2007). Non-target impacts of poison baiting for predator control in Australia. *Mammal Review*, 37(3), 191–205. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2007.00108.x>,
- Gonzalez, M., Mazucchelli, F., Blanco, J., Parrilla, G., & González, J. (1999). Intoxicaciones de origen vegetal en ganado vacuno. *Producción Animal*, 140, 32–42.
- Gow, A. G., Marques, A. I. C., Yool, D. A., Duncan, A., & Mellanby, R. J. (2010). Whole Blood Manganese Concentrations in Dogs with Congenital Portosystemic Shunts. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(1), 90–96. <http://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0408.x>
- Grilo, A., Moreira, A., Carrapiço, B., Belas, A., & São Braz, B. (2021). Epidemiological Study of Pesticide Poisoning in Domestic Animals and Wildlife in Portugal: 2014–2020. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 616293. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.616293>
- Guitart, R., Croubels, S., Caloni, F., Sachana, M., Davanzo, F., Vandenbroucke, V., & Berny, P. (2010). Animal poisoning in Europe. Part 1: Farm livestock and poultry. *Veterinary Journal*, 183(3), 249–254. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.002>
- Gwaltney-Brant, S. M. (2016). Veterinary Forensic Toxicology. *Veterinary Pathology*, 53(5), 1067–1077. <http://doi.org/10.1177/0300985816641994>
- Hallbach, J., & Guder, W. G. (1991). Mechanized toxicological serum tests in screening hospitalized patients. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry : Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 29(9), 537–547.
- Ho, C. S., Lam, C. W. K., Chan, M. H. M., Cheung, R. C. K., Law, L. K., Lit, L. C. W., ... Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 24(1), 3–12.
- Ho, Y.-M., Tsoi, Y.-K., & Leung, K. S.-Y. (2013). Highly sensitive and selective organophosphate screening in twelve commodities of fruits, vegetables and herbal medicines by dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 775, 58–66. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2013.02.043>
- Hock, W. (2016). Toxicity of Pesticides. Retrieved December 16, 2018, from <https://extension.psu.edu/toxicity-of-pesticides>
- Holdsworth, T., Tasker, K., Thompson, A., Thompson, L., Wiles, L., & Willis, J. (2001). Poisoning in Ancient Times. Retrieved December 18, 2018, from <https://archive.is/l64P>
- Honda, M., Robinson, M., & Kannan, K. (2018). A rapid method for the analysis of perfluorinated alkyl substances in serum by hybrid solid-phase extraction. *Environmental Chemistry*, 15(2), 92. <https://doi.org/10.1071/EN17192>
- Hovda, L. R., Brutlag, A. G., Poppenga, R. H., & Peterson, K. L. (Eds.). (2016). *Blackwell's five-minute veterinary consult clinical companion. Small animal toxicology* (Second edition). John Wiley & Sons Inc.

- Indian Academy of Forensic Medicine., T., Jaiswa, A. K., & Behera, C. (2008). Collection, preservation and forwarding of biological samples for toxicological analysis in medicolegal autopsy cases: a review. *Journal of Indian Academy of Forensic Medicine*, 30(2), 96–100.
- Ivanenko, N. B., Solovyev, N. D., Ivanenko, A. A., & Ganeev, A. A. (2012). Application of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry with High-Frequency Modulation Polarization for the Direct Determination of Aluminum, Beryllium, Cadmium, Chromium, Mercury, Manganese, Nickel, Lead, and Thallium in Human Blood. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(3), 299–308. <http://doi.org/10.1007/s00244-012-9784-1>
- Jacquet, P., Daudé, D., Bzdrenga, J., Masson, P., Elias, M., & Chabrière, E. (2016). Current and emerging strategies for organophosphate decontamination: special focus on hyperstable enzymes. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(9), 8200–8218. <http://doi.org/10.1007/s11356-016-6143-1>
- Jain, A. V, Ross, P. F., & Carlson, M. P. (1999). Screening nitrate in forages with a test strip: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 82(1), 9–15.
- Jayaraj, R., Megha, P., & Sreedev, P. (2016). Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary Toxicology*, 9(3–4), 90–100. <http://doi.org/10.1515/intox-2016-0012>
- Johnson, B. J. (2001). Handling forensic necropsy cases. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 17(3), 411–418.
- Khan, O. (2017). Mass Analyzers (Mass Spectrometry) - Chemistry LibreTexts. Retrieved December 26, 2018, from [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Mass_Spectrometer_s_\(Instrumentation\)/Mass_Analyzers_\(Mass_Spectrometry\)](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Mass_Spectrometry/Mass_Spectrometer_s_(Instrumentation)/Mass_Analyzers_(Mass_Spectrometry))
- Klaassen, C. D., & Watkins, J. B. (2015). Casarett and Doull's essentials of toxicology (3rd ed.). New York, NY: Mc Graw Hill Education.
- Ko, K. Y., Shin, J. Y., Kim, D.-G., Kim, M., & Son, S.-W. (2014). Determination of Organophosphorus Pesticides in Stomach Contents of Postmortem Animals by QuEChERS and Gas Chromatography. *Journal of Analytical Toxicology*, 38(9), 667–671. <http://doi.org/10.1093/jat/bku097>
- Kwak, S., Lee, J.-Y., Kim, M. J., Lee, H. J., Lee, D.-K., Kang, J., Kang, W., Son, W.-C., & Cruz, D. J. M. (2023). Combination of PD-1 Checkpoint Blockade and Botulinum Toxin Type A1 Improves Antitumor Responses in Mouse Tumor Models of Melanoma and Colon Carcinoma. *Immunological Investigations*, 52(6), 749–766. <https://doi.org/10.1080/08820139.2023.2232403>
- Langford, K. H., Reid, M., & Thomas, K. V. (2013). The occurrence of second generation anticoagulant rodenticides in non-target raptor species in Norway. *The Science of the Total Environment*, 450–451, 205–208. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.100>
- Levine, B. (2010). Principles of forensic toxicology (3rd ed.). Washington, DC: American Association for Clinical Chemistry.

- Lehotay, S. J., Anastassiades, M., & Majors, R. (2010). The QuEChERS revolution. *LC GC Europe*, 23(9).
- Lipnick, R. L., Cotruvo, J. A., Hill, R. N., Bruce, R. D., Stitzel, K. A., Walker, A. P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J. A., & Myers, R. C. (1995). Comparison of the up-and-down, conventional LD50, and fixed-dose acute toxicity procedures. *Food and Chemical Toxicology*, 33(3), 223–231. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)00136-C](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)00136-C)
- Lipton, R. A., & Klass, E. M. (1984). Human ingestion of a “superwarfarin” rodenticide resulting in a prolonged anticoagulant effect. *JAMA*, 252(21), 3004–3005.
- Locke, D. (2023). *Understanding Toxic Substances*
- Lorgue, G., Lechenet, J., & Riviere, A. (1996). *Clinical Veterinary Toxicology*. UK: Blackwell Science.
- Lozano, J., Virgós, E., & Mangas, J. G. (2010). Veneno y control de predadores. *Galemys*, 22, 123–132.
- Ma, J., & Dasgupta, P. K. (2010). Recent developments in cyanide detection: A review. *Analytica Chimica Acta*, 673(2), 117–125. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2010.05.042>
- Márquez, C., Vargas, J. M., Villafuerte, R., & Fa, J. E. (2013). Understanding the propensity of wild predators to illegal poison baiting. *Animal Conservation*, 16(1), 118–129. <http://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2012.00581.x>
- Marrero, E., Bulnes, C., Sánchez, L. M., Palenzuela, I., Stuart, R., Jacobs, F., & Romero, J. (2001). *Pteridium aquilinum* (bracken fern) toxicity in cattle in the humid Chaco of Tarija, Bolivia. *Veterinary and Human Toxicology*, 43(3), 156–158.
- Martinez, T. T., & Brown, K. (1991). Oral and pulmonary toxicology of the surfactant used in roundup herbicide. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 34, 43–46.
- Martínez-Haro, M., Mateo, R., Guitart, R., Soler-Rodríguez, F., Pérez-López, M., María-Mojica, P., & García-Fernández, A. J. (2008). Relationship of the toxicity of pesticide formulations and their commercial restrictions with the frequency of animal poisonings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3), 396–402. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.05.006>
- Mateo-Tomás, P., Olea, P. P., Sánchez-Barbudo, I. S., & Mateo, R. (2012). Alleviating human-wildlife conflicts: identifying the causes and mapping the risk of illegal poisoning of wild fauna. *Journal of Applied Ecology*, 49(2), 376–385. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02119.x>
- McConkey, S. E., Grant, D. M., & Cribb, A. E. (2009). The role of para-aminophenol in acetaminophen-induced methemoglobinemia in dogs and cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32(6), 585–595. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2009.01080.x>
- McFarland, S. E., Mischke, R. H., Hopster-Iversen, C., von Krueger, X., Ammer, H., Potschka, H., Greiner, M. (2017). Systematic account of animal poisonings in Germany, 2012–2015. *Veterinary Record*, 180(13), 327–327. <http://doi.org/10.1136/vr.103973>
- McLean, M. K., & Hansen, S. R. (2012). An overview of trends in animal poisoning cases in the United States: 2002-2010. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 42(2), 219–228. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.12.009>

- Millo, T., Jaiswa, A. K., & Behera, C. (2008). Collection, preservation and forwarding of biological samples for toxicological analysis in medicolegal autopsy cases: a review. *J Indian Acad Forensic Med*, 30(2), 96–100.
- Moran, P. A. (1950). Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika*, 37(1–2), 17–23.
- Motas-Guzmán, M., Marla-Mojica, P., Romero, D., Martínez-López, E., & García-Fernández, A. J. (2003). Intentional poisoning of animals in southeastern Spain: a review of the veterinary toxicology service from Murcia, Spain. *Veterinary and Human Toxicology*, 45(1), 47–50.
- Murphy, M. J. (Michael J. (1996). *A field guide to common animal poisons*. Ames, IA: Distributed by Iowa State University Press.
- Newman, M. C. (2010). *Fundamentals of ecotoxicology* (3rd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Nikolaou, P., Michalopoulou, P., Papoutsis, I., Dona, A., Kokkinari, A., Athanaselis, S., & Stefanidou, M. (2015). Lethal intoxications of animals in Greece during the years 2012–2014. In 53 TIAFT meeting. Florence: The International Association of Forensic Toxicologists.
- Ntemiri, K., Saravia, V., Angelidis, C., Baxevani, K., Probonas, M., Kret, E., Xirouchakis, S. M. (2018). Animal mortality and illegal poison bait use in Greece. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(8), 488. <http://doi.org/10.1007/s10661-018-6838-5>
- Parris, N. (2000). *Instrumental Liquid Chromatography: A Practical Manual on High-Performance Liquid Chromatographic Methods*. USA: Elsevier Science.
- Pedrero, Z., Ouerdane, L., Mounicou, S., Lobinski, R., Monperrus, M., & Amouroux, D. (2012). Identification of mercury and other metals complexes with metallothioneins in dolphin liver by hydrophilic interaction liquid chromatography with the parallel detection by ICP MS and electrospray hybrid linear/orbital trap MS/MS. *Metallomics : Integrated Biometal Science*, 4(5), 473–479. <http://doi.org/10.1039/c2mt00006g>
- Pélissier-Alicot, A.-L., Gaulier, J.-M., Champsaur, P., & Marquet, P. (2003). Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs: a review. *Journal of Analytical Toxicology*, 27(8), 533–544.
- Peres, M. D., Nascimento, S., & Pelício, F. S. (2019). A new clean-up approach for stomach content toxicological analysis. *Forensic Science International*, 302, 109936. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.109936>
- Peterson, M. E., Talcott, P. A., & Peterson, M. E. (Eds.). (2013). *Small animal toxicology* (3rd ed). Elsevier.
- Pillai, S., Kobayashi, K., Michael, M., Mathai, T., Sivakumar, B., & Sadasivan, P. (2021a). Concept of Median Lethal Dose (LD50/LC50) – more misused than used. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 15(3), 137–141. <https://doi.org/10.26444/jpccr/139588>
- Pillai, S., Kobayashi, K., Michael, M., Mathai, T., Sivakumar, B., & Sadasivan, P. (2021b). John William Trevan's concept of Median Lethal Dose (LD50/LC50) – more misused than used. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 15(3), 137–141. <https://doi.org/10.26444/jpccr/139588>

- Poppenga, R. H. (2008). Diagnostic sampling and establishing a minimum database in exotic animal toxicology. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*, 11(2), 195–210, v. <http://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.01.005>
- Poppenga, R. H., & Braselton, E. W. (1990). Effective Use of Analytical Laboratories for the Diagnosis of Toxicologic Problems in Small Animal Practice. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 20(2), 293–306. [http://doi.org/10.1016/S0195-5616\(90\)50026-1](http://doi.org/10.1016/S0195-5616(90)50026-1)
- Puschner, B., & Galey, F. D. (2001). Diagnosis and approach to poisoning in the horse. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 17(3), 399–409.
- Ravelo-Pérez, L. M., Herrera-Herrera, A. V., Hernández-Borges, J., & Rodríguez-Delgado, M. Á. (2010). Carbon nanotubes: Solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2618–2641. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.083>
- Rella, J., Marcus, S., & Wagner, B. J. (2004). Rapid cyanide detection using the Cyantesmo kit. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, 42(6), 897–900.
- Retamal, M., Costa, C., Suárez, J. M., & Richter, P. (2013). Multi-determination of organic pollutants in water by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93(1), 93–107. <http://doi.org/10.1080/03067319.2011.637195>
- Reynolds, S. (2024). *ANALYTICAL QUALITY CONTROL*
- Richardson, J. A. (2000). Permethrin Spot-On Toxicoses in Cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 10(2), 103–106. <http://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2000.tb00006.x>
- Rodenticides.* (n.d.). https://www.nps.gov/common/uploads/teachers/lessonplans/rodenticides_FactSheet.pdf
- Rodríguez, C. L., Ríos, E. E., Macció, O. A., Merlo, W., & Lectora, J. (2005). Intoxicación con *Ipomoea fistulosa* (aguapié, mandiyurá) en cabras. Efectos sobre el sistema nervioso. Argentina.
- Ruiz-Suárez, N., Boada, L. D., Henríquez-Hernández, L. A., González-Moreo, F., Suárez-Pérez, A., Camacho, M., ... Luzardo, O. P. (2015). Continued implication of the banned pesticides carbofuran and aldicarb in the poisoning of domestic and wild animals of the Canary Islands (Spain). *The Science of the Total Environment*, 505, 1093–1099. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.093>
- Rumbeiha, W. K., & Snider, D. B. (2014). Veterinary Toxicology. *Encyclopedia of Toxicology*, 915–928. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00444-9>
- Ryvolova, M., Adam, V., & Kizek, R. (2012). Analysis of metallothionein by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1226, 31–42. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.015>
- Saiyed, H., Dewan, A., Bhatnagar, V., Shenoy, U., Shenoy, R., Rajmohan, H., ... Lakkad, B. (2003). Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environmental Health Perspectives*, 111(16), 1958–1962. <http://doi.org/10.1289/ehp.6271>

- Sánchez-Barbudo, I. S., Camarero, P. R., & Mateo, R. (2012). Primary and secondary poisoning by anticoagulant rodenticides of non-target animals in Spain. *The Science of the Total Environment*, 420, 280–288. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.028>
- Schanzer, S., Kröner, E., Wibbelt, G., Koch, M., Kiefer, A., Bracher, F., & Müller, C. (2021). Miniaturized multiresidue method for the analysis of pesticides and persistent organic pollutants in non-target wildlife animal liver tissues using GC-MS/MS. *Chemosphere*, 279, 130434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130434>
- Scott, R. S. P. (1996). The Argon Ionization Family of Detectors: Argon Detectors, Helium Detectors and the Electron Capture Detector. In *Chromatographic Detectors Design, Function, and Operation* (pp. 119–148). New York, NY: Marcel Dekker.
- Shanmugam, P. S. T., Sampath, T., Jagadeeswaran, I., Bhalerao, V. P., Thamizharasan, S., V., K., & Saha, J. (2023). Toxicokinetics. In *Biocompatibility Protocols for Medical Devices and Materials* (pp. 175–186). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91952-4.00012-X>
- Sherding, B. (n.d.). *Saunders Εγχειρίδιο Κτηνιατρικής των Μικρών Ζώων* (3rd ed.).
- Skartsi, T., Elorriaga, J., & Vasiliakis, D. (2010). Eurasian Black Vulture: the focal species of the Dadia-Lefkimi-Soufli Forest National Park. In G. Catsadorakis & H. Källander (Eds.), *The Dadia – Lefkimi – Soufli Forest National Park, Greece: Biodiversity, Management and Conservation* (pp. 195–206). Athens: WWF Greece.
- Skartsi, T., Dobrev, V., Oppel, S., Kafetzis, A., Kret, E., Karampatsa, R., Nikolov, S. C. (2014). Assessment of the illegal use of poison in Natura 2000 sites for the Egyptian Vulture in Greece and Bulgaria during the period 2003-2012. Technical report under action A3 of the LIFE+ project “The Return of the Neophron” (LIFE10 NAT/BG/000152). Athens: WWF Greece.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2007). Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης. (Καραγιάννης Μ. Ι., Κ. Η. Ευσταθίου, & Ν. Χανιωτάκης, Trans.). Αθήνα: Κωσταράκη.
- Song, J. H., & Narahashi, T. (1996). Modulation of sodium channels of rat cerebellar Purkinje neurons by the pyrethroid tetramethrin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277(1), 445–453.
- Steed, R. (2007). Separation fundamentals Agilent Restricted LC Columns and Consumables HPLC Separation Fundamentals. Retrieved December 27, 2018, from <https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/HPLC%20Separation%20Fundamentals.pdf>
- Stowe, H. D., Braselton, W. E., Slanker, M., & Kaneene, J. B. (1986). Multielement assays of canine serum, liver, and kidney by inductively coupled argon plasma emission spectroscopy. *American Journal of Veterinary Research*, 47(4), 822–827.
- Swartz, M. (2010). HPLC detectors: A brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(9–12), 1130–1150. <http://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>
- Tarlok, S., Amit, S., Shina, P., Sourabh, K., & Shalini, D. (2015). Introduction to Poisoning; A Systematic Review. *International Journal of Pharmacy Teaching & Practicoes*, 6(4), 2615–2619.

- Timchalk, C (2006). Physiologically based pharmacokinetic modeling of organophosphorus and carbamate pesticides. In *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*, Gupta RC (ed.). Academic Press/Elsevier, Amsterdam, pp. 103–25.
- Tindle, R. C., & Stalling, D. L. (1972). Apparatus for automated gel permeation cleanup for pesticide residue analysis. Applications to fish lipids. *Analytical Chemistry*, 44(13), 1768–1773.
- Tissue, B. M. (2000). Nitrogen-Phosphorus Detector (NPD). Retrieved December 26, 2018, from <https://www.tissuegroup.chem.vt.edu/chem-ed/sep/gc/detector/npd.html>
- Toxicology Tanuvas Lecture Notes - VPT-421: VETERINARY TOXICOLOGY (2+0) SYLLABUS General Toxicology: - Studocu.* (n.d.). Retrieved 27 January 2024, from <https://www.studocu.com/in/document/kerala-veterinary-and-animal-sciences-university/bachelor-of-veterinary-science-animal-husbandry/toxicology-tanuvas-lecture-notes/29537625>
- Vandenbroucke, V., Van Pelt, H., De Backer, P., & Croubels, S. (2010). Animal poisonings in Belgium: a review of the past decade. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 79, 259–268.
- Vasilakis, D. P., Whitfield, D. P., Schindler, S., Poirazidis, K. S., & Kati, V. (2016). Reconciling endangered species conservation with wind farm development: Cinereous vultures (*Aegypius monachus*) in south-eastern Europe. *Biological Conservation*, 196, 10–17. <http://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2016.01.014>
- Volmer, P. A., & Meerdink, G. L. (2002). Diagnostic toxicology for the small animal practitioner. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 32(2), 357–365.
- Walker, L. A., Turk, A., Long, S. M., Wienburg, C. L., Best, J., & Shore, R. F. (2008). Second generation anticoagulant rodenticides in tawny owls (*Strix aluco*) from Great Britain. *Science of The Total Environment*, 392(1), 93–98. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.10.061>
- Wilhelm, K., & Reiner, E. (1973). Effect of sample storage on human blood cholinesterase activity after inhibition by carbamates. *Bulletin of the World Health Organization*, 48(2), 235–238.
- Wingfield, W. E. (Ed.). (2001). *Veterinary emergency medicine secrets* (2nd ed). Hanley & Belfus
- Xirouchakis, S., Andreou, G., & Arnellos, G. (2000). The impact of poisoned baits set for vermin on the population of vultures in Crete (Greece)-Incidences of secondary poisoning during 1990-1999. *Vulture News*, 42, 13–24.
- Xirouchakis, S., Sakoulis, A., & Andreou, G. (2001). The decline of the bearded vulture *Gypaetus barbatus* in Greece. *Ardeola*, 48, 183–190.
- Xirouchakis, S., & Tsiakiris, R. (2009). Status and population trends of vultures in Greece. In J. Donázar, A. Margalida, & D. Campión (Eds.), *Vultures, feeding stations and sanitary legislation: a conflict and its consequences from the perspective of conservation biology* (pp. 167–171). Donostia: Sociedad de Ciencias Aranzadi.

- Xu, M.-L., Liu, J.-B., & Lu, J. (2014). Determination and Control of Pesticide Residues in Beverages: A Review of Extraction Techniques, Chromatography, and Rapid Detection Methods. *Applied Spectroscopy Reviews*, 49(2), 97–120. <http://doi.org/10.1080/05704928.2013.803978>
- Yartsev, A. (2023). *Therapeutic index, ED50, TD50 and LD50 | Deranged Physiology*. <https://derangedphysiology.com/main/cicm-primary-exam/required-reading/pharmacodynamics/Chapter 413/therapeutic-index-ed50-td50-and-ld50>
- Yas-Natan, E., Segev, G., & Aroch, I. (2007). Clinical, neurological and clinicopathological signs, treatment and outcome of metaldehyde intoxication in 18 dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 48(8), 438–443. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2007.00360.x>
- Yeruham, I., Avidar, Y., Perl, S., Yakobson, B., Shlosberg, A., Hanji, V., & Bogin, E. (1998). Probable toxicosis in cattle in Israel caused by the oak *Quercus calliprinos*. *Veterinary and Human Toxicology*, 40(6), 336–340.
- Zeeuw, J. (2009). Reduce impact of septum “sweat” by using septum purge. ChromaBLOGraphy: Restek’s Chromatography Blog. Retrieved December 18, 2018, from <https://blog.restek.com/?p=567>