



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Διατριβή

Μελέτη της υπολειμματικότητας των ανθελμινθικών φαρμάκων
σε ζώα παραγωγής και εκτίμηση της έκθεσής του
περιβάλλοντος σε αυτά

ΜΑΔΙΚΑΣ ΘΩΜΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

Μελέτη της υπολειμματικότητας των ανθελμινθικών
φαρμάκων σε ζώα παραγωγής και εκτίμηση της έκθεσης του
περιβάλλοντος σε αυτά

Study of residual anthelmintic drugs on production animals and
assessment of environmental exposure to them

Υπεύθυνος καθηγητής

Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής επιτροπή

- Καρπούζας Δημήτρης, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας (συνεπιβλέπων)
- Σωτηράκη Σμαράγδα, Ερευνήτρια Α, Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών, ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ (συνεπιβλέπων)
- Καλλιόπη Λιαδάκη, Επικ. Καθηγήτρια Βιοχημική Φαρμακολογία (μέλος)

Ευχαριστίες

Ένα θερμό ευχαριστώ στον καθηγητή μου κ. Δημήτρη Καρπούζα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη, και μου έδωσε την ευκαιρία να γίνω κομμάτι μίας τέτοιας αξιόλογης έρευνας. Η καθοδήγηση του, η επίβλεψή και η βοήθεια του στάθηκαν αρωγός στην επίτευξη του τελικού στόχου.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Σωτηράκη Σμαράγδα, Ερευνήτρια Α στον Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ ΔΗΜΗΤΡΑ με την οποία υπήρξε άψογη συνεργασία. Υπό το πρίσμα του κτηνιάτρου, υπέδειξε τις κατάλληλες τοποθεσίες για την δειγματοληψία του πειράματος. Η βοήθεια της ήταν πολύτιμη για την εκτέλεση της παρούσας διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κυρία Λιαδάκη Καλλιόπη για την προθυμία της στην παροχή οποιασδήποτε καθοδήγησης στην εκπόνηση της παρούσας έρευνας.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δύο Διδακτορικούς ερευνητές που συνεργάζονται κατά τη διάρκεια της έρευνας στα δύο εργαστήρια. Πρόκειται για την Σαράτση Αικατερίνη και τον Λαγό Ευστάθιο οι οποίοι μου παρείχαν καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος πολύ μεγάλη βοήθεια, καθώς και στη συγγραφή του κειμένου της πτυχιακής διατριβής.

Θα ήταν παράλειψη, να μην ευχαριστούσα θερμά όλα τα παιδιά και στα δύο εργαστήρια με τα οποία συνεργάστηκα και επικοινωνήσα καθώς και για το όμορφο και συνεργατικό κλίμα που υπήρχε.

Κλείνοντας, ευχαριστώ την οικογένειά μου, για τη στήριξη και την ενθάρρυνση που μου παρείχε και μου παρέχει καθ'όλη τη πορεία της ζωής μου.

Contents

<i>Περίληψη</i>	7
<i>Abstract</i>	8
<i>1.Εισαγωγή</i>	9
1.1 Νηματώδεις του γαστρεντερικού	9
1.2 Κλιματική αλλαγή και συσχέτιση της με τα παράσιτα	10
1.3 Κτηνιατρικά φάρμακα και αναγκαιότητα τους	10
1.4 Χρήσεις-Τρόποι Δράσης	11
1.5 Κίνδυνοι από ανθελμινθικά φάρμακα και επίδραση στο περιβάλλον	12
1.6 Οικογένεια βενζιμιδαζολών	13
1.6.1 <i>Albendazole</i> – Χρήσεις και μηχανισμός δράσης	13
1.6.2 <i>Fenbendazole</i> - Χρήση, μηχανισμός δράσης και χημική δομή.....	14
1.7 Μακροκυκλικές λακτόνες	16
1.7.1 <i>Eprinomectin</i> – Χρήση και μηχανισμός δράσης	16
1.8 Υπολειμματικότητα ανθελμινθικών φαρμάκων σε ζώα παραγωγής	17
1.8.1 <i>Μεταβολισμός και υπολειμματικότητα των βενζιμιδαζολών σε ζωικούς</i>	18
1.8.2 <i>Μεταβολισμός και υπολειμματικότητα του Albendazole ζωικούς οργανισμούς</i>	18
1.8.3 <i>Μεταβολισμός και υπολειμματικότητα του Fenbendazole ζωικούς</i> <i>οργανισμούς</i>	19
1.8.4 <i>Υπολειμματικότητα βενζιμιδαζολών στο γάλα</i>	20
1.8.5 <i>Υπολειμματικότητα του Eprinomectin στους ζωικούς οργανισμούς</i>	20
1.9 Υπολειμματικότητα των βενζιμιδαζολών σε κοπροσωρούς	22
1.10 Υπολειμματικότητα του Eprinomectin σε κοπροσωρούς	22
<i>Σκοπός</i>	24
<i>2.Υλικά και μέθοδοι</i>	26
2.1 Εκτροφές	26
2.2 Μεθοδολογία συλλογής	27
2.3 Ανάλυση δειγμάτων και έλεγχος συγκέντρωσης παρασίτων.....	27
2.3.1 <i>Χημικά αντιδραστήρια και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν</i>	27
2.3.2 <i>Περιγραφή της διαδικασίας καταμέτρησης των αβγών των νηματώδων (GINs)</i>	28

2.4 Ανάλυση δειγμάτων για υπολείμματα ανθελμινθικών παρασιτοκτόνων.....	29
2.4.1 Διαλύτες, χημικά παρασκευάσματα	29
2.4.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης.....	29
2.4.3 Περιγραφή πειράματος αποδόμησης κτηνιατρικών φαρμάκων σε κόπρανα .	29
2.4.3 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	30
3.Αποτελέσματα	32
4.1 Συσχέτιση μεταξύ μετρήσεων GINs και μετρήσεων ανάκτησης των κτηνιατρικών φαρμάκων	32
4.Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	38
4.1 Συζήτηση.....	38
4.1.1 Albendazole	38
4.1.2 Fenbendazole	39
4.1.3 Eprinomectin	39
4.2 Συμπεράσματα	40
5.Βιβλιογραφία	42

Περίληψη

Η ολοένα και αυξανόμενη χρήση των κτηνιατρικών ανθελμινθικών φαρμάκων έχει οδηγήσει στην αύξηση της ρύπανσης τόσο του εδάφους και των υδάτων μέσω της απέκρισης των φαρμάκων από τα κόπρανα των ζώων καθώς και στην αύξηση της υπολειμματικότητας τους στα προϊόντα των ζώων. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος του αριθμού των αβγών των γαστρεντερικών νηματωδών παρασίτων (GINs) σε σύγκριση με τη μελέτη της υπολειμματικότητας των κτηνιατρικών ανθελμινθικών φαρμάκων σε κοπροσωρούς. Τα ανθελμινθικά φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Albendazole, Fenbendazole και Eprinomectin. Τα συγκεκριμένα φάρμακα ανήκουν στην κατηγορία των ανθελμινθικών και χρησιμοποιούνται κατα κόρον στην κτηνοτροφία για την καταπολέμηση των ελμίνθων. Για τη πραγματοποίηση του στόχου της μελέτης, έγινε συλλογή κοπράνων από κτηνοτροφικές μονάδες στις περιοχές των Νομών Γρεβενών και Κοζάνης που χρησιμοποιούσαν τα προαναφερθέντα φάρμακα αλλά και από μονάδες που δεν χρησιμοποιούσαν τα συγκεκριμένα φάρμακα. Για την εκτίμηση του παρασιτικού φορτίου εφαρμόστηκε η ποσοτική μέθοδος McMaster (Raynaud, 1970) με σκοπό την ανίχνευση και καταμέτρηση των αβγών των παρασίτων ανά γραμμάριο κοπράνων (αγκ) σε οπτικό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση του αριθμού τους μετά τη χορήγηση του φαρμάκου στις περισσότερες εκτροφές. Η ανάλυση της υπολειμματικότητας των ανθελμινθικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους σε κόπρανα έδειξε υπολείμματα του φαρμάκου ακόμη και πολλούς μήνες μετά τη χορήγηση του, γεγονός που εντείνει την ανάγκη για καλύτερους ελέγχους των προϊόντων των ζώων παραγωγής. Τέλος σε σύγκριση των 2 εκτιμήσεων φάνηκε η ανάπτυξη ανθελμινθικοαντοχής σε ορισμένες εκτροφές.

Λέξεις - κλειδιά: υπολειμματικότητα, ανθελμινθικά, έκθεση στο περιβάλλον, ανθελμινθικοαντοχή, ζώα παραγωγής, νηματώδεις, κτηνιατρικά, βενζιμιδαζόλες, μακροκυκλικές λακτόνες, φάρμακα

Abstract

The increasing use of veterinary anthelmintic drugs has led to increased pollution of both soil and water through the excretion of medicines from animal faeces as well as an increase in their residues in animal products. The aim of the present study was to inspect the number of the pest eggs (GINs) in comparison with the residual study of veterinary anthelmintic medicines in faecal. The anthelmintic drugs used were Albendazole, Fenbendazole and Eprinomectin. These drugs belong to the family of pesticides and are mainly used in livestock breeding against helminthes. For the purpose of this study faeces were collected from livestock farms in the ares of Grevena and Kozani that used the aforementioned medicines but also from livestock farms that did not use these medicines. To estimate the level of parasitism, the number of eggs per gram of faeces (epg) was calculated by applying the modified McMaster method. The results shoed a decrease in their number after administration of the drug to most farms. Analysis of residues of anthelmintic drugs and their metabolites in faeces showed residues of the drug even many months its administration intersified the need for better control on animal products. The comparison of these two studies also showed the development of anthelmintic resistance in some livestock farms.

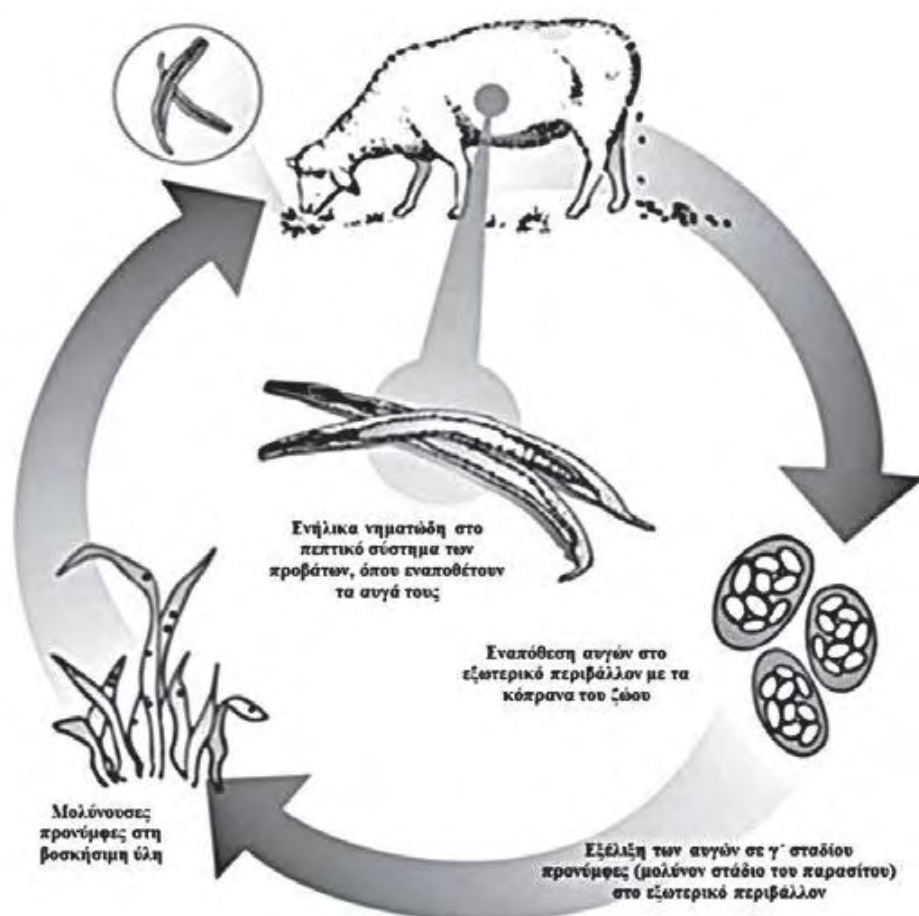
Key words: residues, anthelmintic, environmental exposure, anthelmintic resistance, production animals, filamentous, veterinary, benzimidazoles, macrocyclic lactones, drugs

1.Εισαγωγή

1.1 Νηματώδεις του γαστρεντερικού

Τα γαστρεντερικά νηματώδη (GINs) είναι παράσιτα τα οποία μολύνουν τα ζώα παραγωγής μέσω της τροφής όταν τα δεύτερα βρίσκονται στη διαδικασία της βόσκησης. Η μόλυνση από γαστρεντερικά νηματώδη οδηγεί σε μείωση της παραγωγής και της ποιότητας των ζωοκομικών προϊόντων. Τα κυριότερα νηματώδη που προσβάλλουν τα συγκεκριμένα ζώα παραγωγής είναι αυτά της οικογένειας Trichostrongylidae. Τα παράσιτα αποβάλλονται από το ζώο με τα κόπρανα στο εξωτερικό περιβάλλον, όπου εκκολάπτονται, ελευθερώνοντας προνύμφες οι οποίες και εξελίσσονται σε προνύμφες 3^{ου} σταδίου (L3-μολύνουσες μορφές). Με αυτή τη μορφή προσβάλλουν το ζώο-ξενιστή και αφού εγκατασταθούν στον γαστρεντερικό σωλήνα ενηλικιώνονται. Με την ενηλικίωση ξεκινάει η διαδικασία παραγωγής αυγών, τα οποία αποβάλλονται στο φυσικό περιβάλλον μέσω των κοπράνων του ζώου ολοκληρώνοντας έτσι τον βιολογικό κύκλο τους (Εικόνα 1) (Σαράτση Κ., 2015).

Εικόνα 1: Βιολογικός κύκλος των γαστρεντερικών νηματωδών (GINs)



1.2 Κλιματική αλλαγή και συσχέτιση της με τα παράσιτα

Η κλιματική αλλαγή μπορεί όχι μόνο να επηρεάζει τους ελμινθες άμεσα (π.χ. εξωτερική αλλαγή), αλλά και μέσω επιδράσεων στη διαθεσιμότητα οριστικών ή ενδιάμεσων ξενιστών ή σε ενδιαιτήματα καθώς και μέσω της γεωργίας. Γενικά τα παράσιτα, τείνουν να προσαρμόζονται στις αλλαγές που συμβαίνουν γύρω τους μέσω της εξέλιξης. Η προσαρμογή μπορεί να περιλαμβάνει φαινοτυπική αλλαγή, γενετική παρέκκλιση και αλλαγή ξενιστή. Τα παράσιτα μπορεί να διασπείρουν τις αλλαγές που επηρεάζουν τους ξενιστές σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα. Ένα παράδειγμα είναι η προσαρμοστική επιδημιολογία του είδους *Nematodirus battus*, το οποίο ενώ είχε μία γόνιμη περίοδο ανά έτος, έχει πλέον αναπτύξει στρατηγική δύο γόνιμων περιόδων άνα έτος, κάτι το οποίο το βοηθάει στον απρόβλεπτο ανοιξιάτικο καιρό (Morgan *et al.*, 2019).

Παράλληλη έρευνα στα μικρόβια υποδηλώνει ότι η ευαισθησία σε περιβαλλοντικές διαφορές είναι από μόνο του ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να εξελιχθεί προσφέροντας ελαστικότητα σε κλιματικές αλλαγές (Koelle, Pascual and Yunus, 2005). Υπάρχει σημαντικό πεδίο εφαρμογής ως προς τη βελτίωση των προβλέψεων και των μετρήσεων της ανταπόκρισης των ελμινθων στη κλιματική αλλαγή, τόσο από εξελικτικής όσο και από επιδημιολογικής δυναμικής. Ο ρόλος της κλιματικής αλλαγής στην επέκταση του φάσματος δράσης των παρασίτων υπονομεύει τις προσπάθειες να προβλεφθούν μελλοντικές προκλήσεις στην επιδημιολογία (Morgan *et al.*, 2019).

1.3 Κτηνιατρικά φάρμακα και αναγκαιότητα τους

Καθώς ο παγκόσμιος πληθυσμός αυξάνεται συνεχώς και μέχρι το 2050 αναμένεται να φτάσει τα 9 δισεκατομμύρια, αυτομάτως δημιουργείται η ανάγκη για περαιτέρω αύξηση του αποθέματος τροφής. Ένας από τους κυριότερους τρόπους για να επιτευχθεί αυτή η αύξηση είναι η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων ώστε να βελτιωθεί όσο περισσότερο γίνεται η κτηνοτροφική παραγωγή τόσο σε επίπεδο μείωσης απωλειών και μετάδοσης ασθενειών μέσω της τροφικής αλυσίδας, όσο και σε επίπεδο μεγαλύτερης και ποιοτικότερης παραγωγής τροφίμων (Martin, Ward and Martin, 2011)

Τα γαστρεντερικά νηματώδη (GINs) είναι μία σημαντική απειλή για την υγεία και την αναπαραγωγή των μικρών μηρυκαστικών. Τόσο τα πρόβατα όσο και οι αίγες μολύνονται συνήθως από τα ίδια είδη νηματωδών, αν και έχει προταθεί η εμφάνιση ορισμένων στελεχών προσαρμοσμένων σε αίγες. Και στα δύο είδη ξενιστών τα συγκεκριμένα παράσιτα είναι υπεύθυνα για σημαντικό οικονομικό κόστος λόγω τόσο των άμεσων απωλειών (μειωμένη παραγωγή, ποιότητα των προϊόντων, θνησιμότητα) όσο και των έμμεσων απωλειών (κόστος που σχετίζεται με τον έλεγχο και τη θεραπεία, κόστος φαρμάκων). (Hoste, Sotiraki and Torres-Acosta, 2011)

Αυτες οι οικονομικές απώλειες καθιστούν επιτακτική την ανάγκη καλύτερων μέτρων ελέγχου. Η συνήθης χρήση εμπορικών χημικών αντιελμινθικών είναι ο ακρογωνιαίος λίθος των προγραμμάτων ελέγχου GIN για περισσότερο από 5 δεκαετίες. Αυτά τα φάρμακα εφαρμόζονται θεραπευτικά, για τη διατήρηση της παραγωγικότητας ή προληπτικά για να σπάσουν τον κύκλο ζωής του παρασίτου πριν το επίπεδο του παρασιτισμού φτάσει σε κλινικά επίπεδα (Hoste, Sotiraki and Torres-Acosta, 2011)

1.4 Χρήσεις-Τρόποι Δράσης

Γενικότερα, τα κτηνιατρικά φάρμακα προσφέρουν πολλά οφέλη στις κτηνοτροφικές μονάδες, τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις βασικούς τομείς: κοινωνικό, οικονομικό και περιβαλλοντικό (Cooper and Dobson, 2007). Η αποφυγή σοβαρών λοιμώξεων, τόσο για τον άνθρωπο όσο και στη ζωική παραγωγή, είναι βασικό πλεονέκτημα των κτηνιατρικών φαρμάκων. Η αξία τους, δε αυξάνεται, αν συνυπολογιστεί ότι το θερμό κλίμα και οι εκάστοτε συνθήκες (για παράδειγμα ελώδη περιβάλλοντα, με αυξημένη παρουσία κουνουπιών) εντείνουν την προσβολή των κτηνοτροφικών ζώων από λοιμώξεις (Cooper and Dobson, 2007). Η αναγκαιότητά τους, μάλιστα, έχει επισημανθεί και από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Cooper and Dobson, 2007). Πέρα από την ζωική παραγωγή, η αντιμετώπιση πολλών παθογόνων που προσβάλλουν τα ζώα, προστατεύει άμεσα και τους ανθρώπους, δεδομένου ότι τα ζώα μπορεί να μεσολαβούν ως ξενιστές για την μετάδοση ασθενειών, όπως για παράδειγμα το τρυπανόσωμα (Cooper and Dobson, 2007).

Κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή, την απώθηση ή τη μείωση κάθε παρασίτου που προσβάλλει τα ζώα καλείται κτηνιατρικό φάρμακο. Η κτηνοτροφία μπορεί να πληγεί από πλήθος προσβολών όπως παράσιτα, έντομα και μικροοργανισμούς. Γενικά τα κτηνιατρικά φάρμακα μπορούν να διαχωριστούν βάσει του σκοπού χορήγησής τους σε θεραπευτικά, (όταν η προσβολή έχει εκδηλωθεί), μετα-θεραπευτικά (προς αντιμετώπισης της προσβολής πριν γίνουν κλινικά αισθητά τα συμπτώματα στα ζώα, προφυλακτική χορήγηση σε περιόδους έξαρσης) ή υποθεραπευτικά (με στόχο όχι την επιβίωση, αλλά την αύξηση της παραγωγής) (Aarestrup, 2005). Έτσι, η χορήγηση τους γίνεται ουσιαστικά, σε διευρυμένα πλαίσια, εκτός της άμεσης θεραπείας, γεγονός που εξηγεί την συσσώρευσή τους στο περιβάλλον.

1.5 Κίνδυνοι από ανθελμινθικά φάρμακα και επίδραση στο περιβάλλον

Για την καταπολέμηση των γαστρεντερικών νηματωδών (GINs) χρησιμοποιούνται ως επι το πλείστον, χημικές ουσίες ευρέως φάσματος, τα ανθελμινθικά φάρμακα. Η ταξινόμησή τους προκύπτει με βάση τη χημική τους δομή, τον τρόπο και το εύρος δράσης τους. Οι κυριότερες οικογένειες ανθελμινθικών φαρμάκων είναι οι ιμιδαζοθειαζόλες, οι βενζιμιδαζόλες και οι ιβερμεκτίνες. Δυστυχώς η χορήγηση των ανθελμινθικών φαρμάκων δεν οδηγεί πάντα στα αναμενόμενα θεραπευτικά αποτελέσματα εξαιτίας κάποιων παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί έχουν να κάνουν με 1) ανεπαρκή ενσωμάτωση στρατηγικών διαχείρισης και ενημέρωσης, 2) λάθος χειρισμός των φαρμάκων λόγω ελλιπούς γνώσης σχετικά με τα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά, 3) ανεπαρκής κατανόηση της σχέσης μεταξύ των φαρμακολογικών ιδιοτήτων, και 4) αρκετοί ξενιστές που σχετίζονται μεταξύ τους και μεταβάλλουν τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά και αποτελεσματικότητα του εκάστοτε φαρμάκου (Křizová-Forstová *et al.*, 2011).

Ένα από τα προβλήματα που προέκυψαν λόγω της αλόγιστης χρήσης των ανθελμινθικών φαρμάκων είναι η ανθελμινθικοαντοχή. Η ανθελμινθικοαντοχή εμφανίζεται όταν τα παράσιτα που συνήθως εξουδετερώνονται από μία συγκεκριμένη δόση, ξαφνικά επιβιώνουν της θεραπείας. Δεδομένου ότι η αντοχή κληρονομείται στους απογόνους, οι επιζήσαντες σκώληκες θα περάσουν τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα και στους απογόνους τους. Σήμερα η ανθελμινθική αντοχή είναι μακράν το πιο σοβαρό πρόβλημα σε μικρά μηρυκαστικά, ενώ σε πολλές χώρες (Ν. Αφρική, Νέα Ζηλανδία, Αυστραλία) η ανθελμινθικοαντοχή έχει αναγκάσει αγρότες να σταματήσουν την εκτροφή αιγοπροβάτων (De Graef, Claerebout and Geldhof, 2013). Μάλιστα, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης ανθελμινθικοαντοχής με την ολοένα και αυξανόμενη παγκόσμια υπερθέρμανση του πλανήτη (Kaplan and Vidyashankar, 2012)

Τα ανθελμινθικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των ενδοπαρασίτων, εισέρχονται στο περιβάλλον μέσω των κοπράνων των ζώων που βρίσκονται υπό θεραπεία. Ωστόσο, το ακριβές προφίλ απέκκρισης των φαρμάκων συνδέεται και με τον τρόπο χορήγησης του. Για παράδειγμα, τα φάρμακα που χορηγούνται με ρίψη απεκκρίνονται σε μεγάλο βαθμό αμετάβλητα στα κόπρανα, ενώ οι ενώσεις που χορηγούνται μέσω της στοματικής οδού ή με ένεση μεταβολίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό πριν την απέκκριση. Εξαιρέσεις αποτελούν οι βενζιμιδαζόλες, ιμιδαζοθειαζόλες και τετραϋδροπυριμιδίνες (Beynon, 2012). Τα ανθελμινθικά μπορούν να φτάσουν στο περιβάλλον είτε στη μορφή της μητρικής ένωσης είτε μέσω των μεταβολιτών τους. Όταν απελευθερωθούν στο περιβάλλον αυτοί οι ρύποι θα μεταφερθούν και θα κατανεμηθούν στο νερό, στο έδαφος και στο ίζημα. Συμμετέχουν σε διαδικασίες οι οποίες βοηθούν στο να αποδομηθούν (π.χ. βιοαποδόμηση, χημική και φωτοχημική αποδόμηση) ή αντιδρούν με άλλες ενώσεις. Οι συγκεντρώσεις αυτών των ουσιών στο περιβάλλον καθορίζονται από

αρκετούς παράγοντες όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες της κάθε ένωσης, η αποδόμηση, τα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά και οι κλιματικές συνθήκες που επικρατούν στον εκτεθειμένο βióτοπο (Horvat *et al.*, 2012)

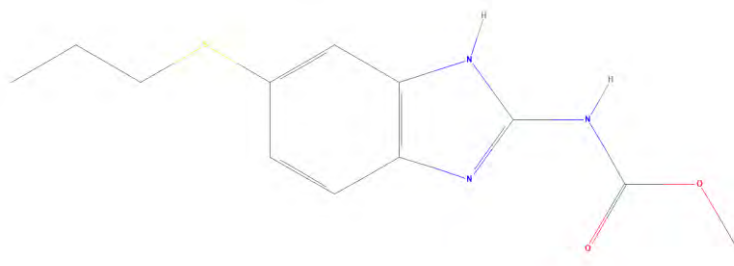
1.6 Οικογένεια βενζιμιδαζολών

1.6.1 Albendazole – Χρήσεις και μηχανισμός δράσης

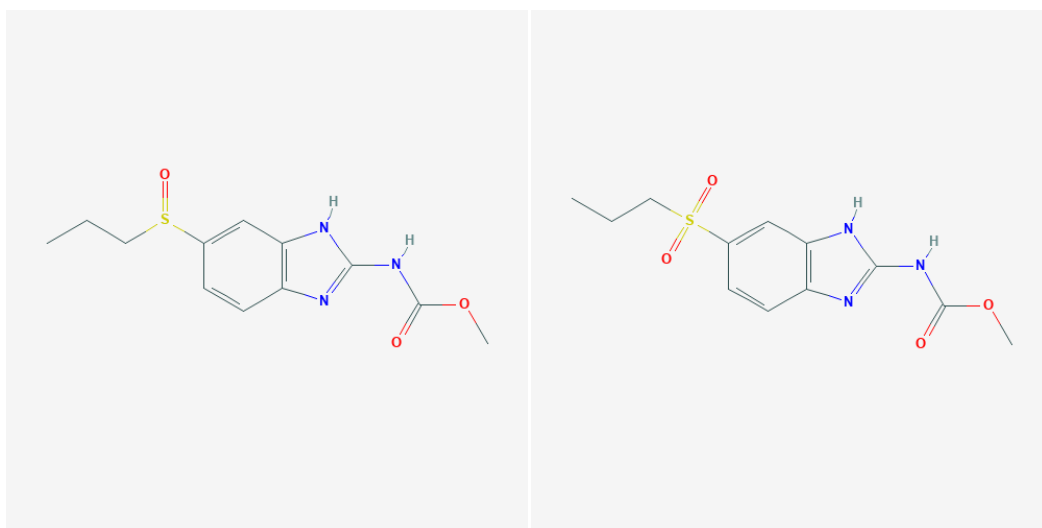
Το κτηνιατρικό ανθελμινθικό φάρμακο Albendazole (ABZ) είναι ένα συνθετικό ανθελμινθικό παράγωγο, με ευρύ φάσμα, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των βενζιμιδαζολών. Το ABZ μεταβολίζεται περαιτέρω σε Albendazole Sulphoxide (ABZSO) (Εικόνα 2) και σε έναν λιγότερο ενεργό μεταβολίτη το Albendazole Sulphone (ABZSO₂) (Εικόνα 3). Η χορήγηση του γίνεται από του στόματος μέσω ενός δισκίου επικαλυμμένου με υμένιο. Η χρήση του γίνεται κυρίως εναντίον των νηματωδών σκωλήκων που προσβάλλουν το γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων παραγωγής. Τα ζώα χορήγησης του φαρμάκου είναι κυρίως βοοειδή και αιγοπρόβατα και δευτερεύοντως σε σκύλους, γάτες και πτηνά για παρασιτικά μαστίγια και ταινίες, ενώ μικρότερη χρησιμοποίηση έχει βρει σε υδατοκαλλιέργειες ψαριών. Η χορήγηση του γίνεται είτε σε μορφή χαπιού μέσω του στόματος, είτε σε υγρή μορφή. Στοχεύει σε ένα ευρύ φάσμα νηματωδών, ενώ η δόση χορήγησης είναι σχετικά μικρή αλλά αποτελεσματική (Gyurik, Chow and Zaber, 1981).

Η δράση του ABZ έγκειται στο ότι παρεμβαίνει στην αναπαραγωγή και επιβίωση των ελμίνθων μέσω παρεμπόδισης του σχηματισμού μικροσωληνίσκων από την τουμπουλίνη. Αυτό το γεγονός, έχει ως αποτέλεσμα την εξασθενημένη πρόσληψη γλυκόζης, την επακόλουθη εξάντληση των αποθεμάτων γλυκογόνου με τελικό αποτέλεσμα το να οδηγούνται τα νηματώδη σε θάνατο (Mutavdžić Pavlović *et al.*, 2018). Πιο συγκεκριμένα το ABZ συνδέεται στη β-τουμπουλίνη με συνέπεια να αναστέλλεται ο πολυμερισμός ή η συναρμολόγησή της στους μικροσωληνίσκους. Η ικανότητα δέσμευσής του φαρμάκου στη β-τουμπουλίνη των παρασίτων είναι πιο μεγάλη σε σύγκριση με την ικανότητα δέσμευσης της στη β-τουμπουλίνη των θηλαστικών και γι αυτό υπάρχει περιορισμένη τοξικότητα στα ζώα. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να αναστείλλει μεταβολικά ένζυμα (μηλεϊνική αφυδρογονάση και φουμαρική ρεδοукτάση) διαταράσσοντας κατ'αυτό τον τρόπο τον κύκλο του Krebs, με άμεση συνέπεια στην παραγωγή ATP. Το φάρμακο μπορεί να καταλήξει στο έδαφος μέσω απεκρίσεων των ζώων ή στο νερό μέσω κακού χειρισμού των αποβλήτων (Mutavdžić Pavlović *et al.*, 2018).

Το Albendazole ανακαλύφθηκε το 1975 από τους Robert J. Gyurik και Vassilios J. Theodorides και ανατέθηκε στη SmithKline Corporation, ενώ καταχωρήθηκε για ανθρώπινη χρήση το 1982.



Εικόνα 2: Ο χημικός τύπος του κτηνιατρικού φαρμάκου Albendazole



Εικόνα 3: Οι χημικές δομές των Albendazole sulfoxide και Albendazole sulfone, αριστερά και δεξιά, αντίστοιχα

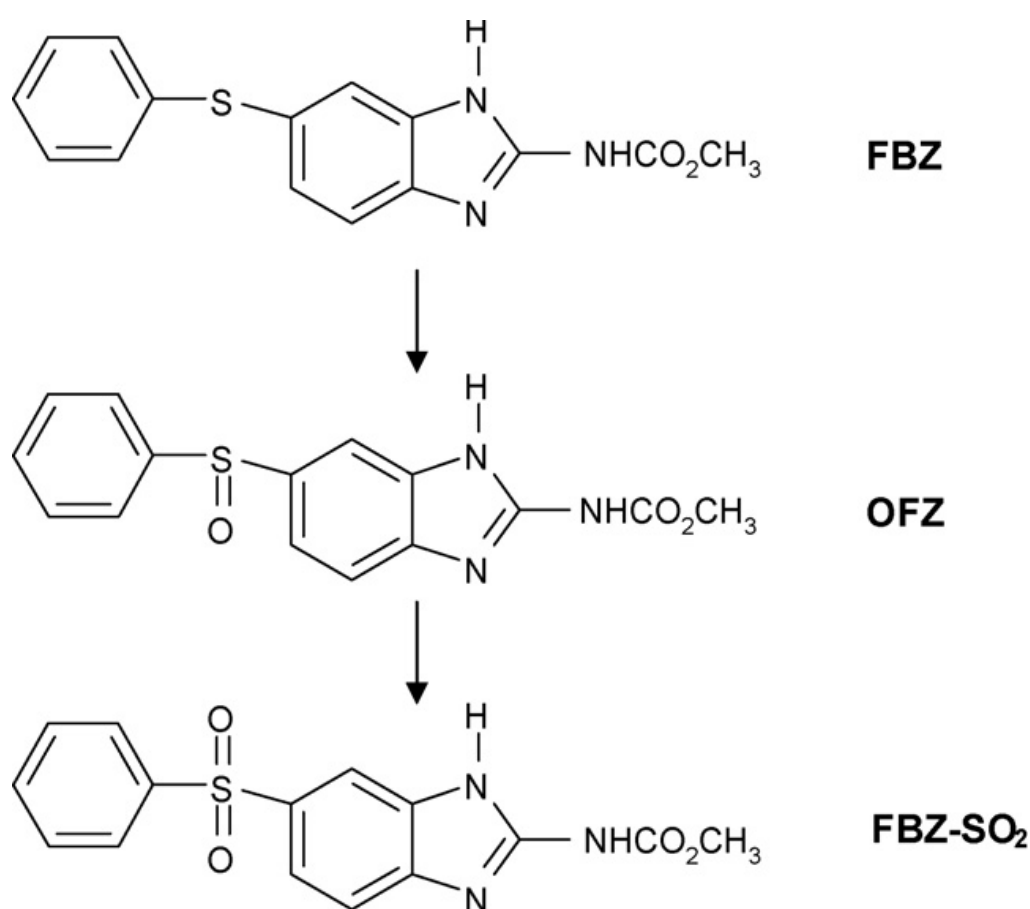
1.6.2. Fenbendazole- Χρήση, μηχανισμός δράσης και χημική δομή

Το κτηνιατρικό φάρμακο Fenbendazole (FBZ) είναι ένα ανθελμινθικό νηματωδοκτόνο φάρμακο το οποίο ανήκει στην οικογένεια των βενζιμιδαζολών. Η χορήγησή του γίνεται μέσω εναιωρήματος το οποίο εισάγεται στο πόσιμο νερό των ζώων. Το FBZ μεταβολίζεται σε Oxfendazole (OFZ) στο ήπαρ, ένας μεταβολίτης ο οποίος έχει εξίσου ανθελμινθική δράση, και σε Fenbendazole sulphone (FBZSO₂), ένας αδρανής μεταβολίτης (Εικόνα 4). Το OFZ μετατρέπεται εν μέρει πίσω σε FBZ (Moreno *et al.*, 2012).

Τόσο το FBZ όσο και ο μεταβολίτης του το OFZ είναι αποτελεσματικά κατά των γαστρεντερικών και πνευμονικών νηματώδων, των ενήλικων και των προνυμφών σταδίου L4 του γένους *Bunostomum*, *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Oesophagostomum*, *Nematodirus*, *Teladorsagia*, *Cooperia*, *Trichostrongylus*, *Dictyocaulus*, *Trichuris* κ.λ.π., ενώ σε μερικά προλαμβάνει τη σύλληψη προνυμφών. Ακόμη είναι πολύ αποτελεσματικό έναντι της πλειοψηφίας των ταινιών των ζώων. Η χρήση γίνεται απο τη στοματική κοιλότητα σε ζώα

παραγωγής (αγελάδες, αιγοπρόβατα) αλλά και σε οικόσιτα ζώα (σκύλος, γάτα) (Ngomuo *et al.*, 1984).

Ο μηχανισμός δράσης του έγκειται στη δέσμευσή του με την τουμπουλίνη εμποδίζοντας τον πολυμερισμό της και τη δημιουργία μικροσωληνίσκων. Όπως και με την περίπτωση του ABZ, το παράσιτο αδυνατεί να προσλάβει γλυκόζη, τα αποθέματα γλυκογόνου αδειάζουν με αποτέλεσμα να οδηγείται στο θάνατο λόγω ασιτίας. Επίσης το FBZ έχει αντιμηκυτιακή δράση (Grønvold *et al.*, 2004). Μέσω αυτού του μηχανισμού, έχει αναφερθεί ότι το FBZ μπορεί να έχει αντικαρκινική δράση προάγοντας τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων (Dogra, Kumar and Mukhopadhyay, 2018).



Εικόνα 4: Χημική δομή του κτηνιατρικού ανθελμινθικού φαρμάκου *Fenbendazole* και των μεταβολιτών του

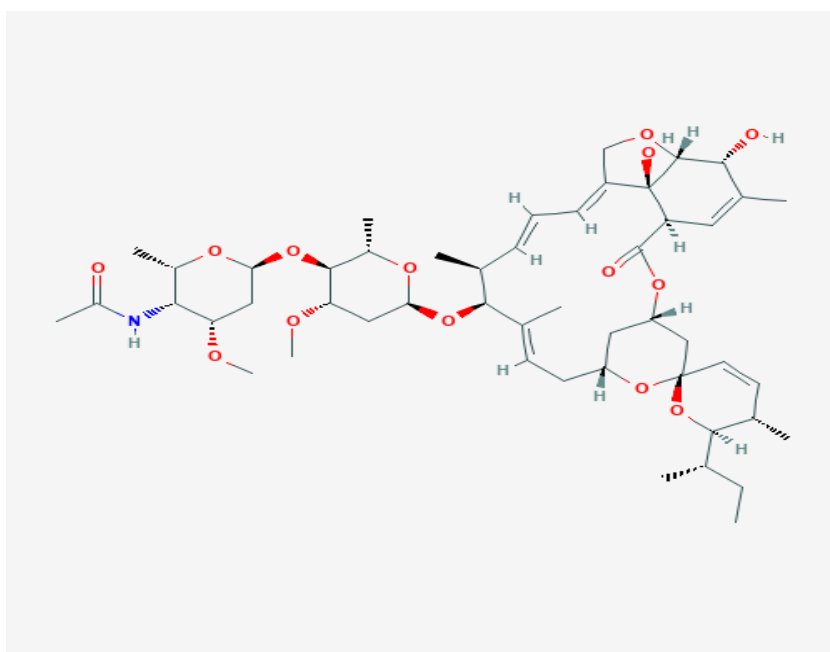
1.7 Μακροκυκλικές λακτόνες

1.7.1 Eprinomectin – Χρήση και μηχανισμός δράσης

Οι μακροκυκλικές λακτόνες θεωρούνται η τελευταία ‘παραδοσιακή’ τάξη των ανθελμινθικών, οι οποίες αποτελούνται από δύο στενά συγγενικές χημικές ομάδες. Η πρώτη ομάδα είναι οι αβερμεκτίνες οι οποίες περιλαμβάνουν τις ουσίες abamectin, doramectin, ivermectin, emamectin, eprinomectin, και selamectin καθώς και moxidectin που φαίνεται να είναι η πιο αντιπροσωπευτική χημική ένωση της κατηγορίας (Romero-González, Garrido Frenich and Martínez Vidal, 2013).

Το κτηνιατρικό φάρμακο Eprinomectin είναι ένα ανθελμινθικό νηματωδοκτόνο φάρμακο το οποίο ανήκει στην κατηγορία των μακροκυκλικών λακτονών και πιο συγκεκριμένα στην υποκατηγορία των αβερμεκτινών. Εισήχθη στη βιομηχανία της υγείας των ζώων το 1997 ως εναλλακτική λύση έναντι της ιβερμεκτίνης, καθώς θεωρήθηκε ότι είναι το πιο ασφαλές από τη συγκεκριμένη οικογένεια για θηλάζοντα γαλακτοφόρα ζώα. Η χορήγηση του γίνεται μέσω επιχύσεων στη ράχη των ζώων ή μέσω υποδόριας ένεσης (Floate, 2006).

Το Eprinomectin είναι μια ημισυνθετική μακροκυκλική λακτόνη, η οποία αποτελείται από ένα μίγμα δύο ομολόγων, του B1a (90%, M.B.: 914) με χημική ονομασία (4''R)-4''ακετυλαμινο-5-O-διμεθυλ-4''-διοξυαβερμεκτίνη και του B1b (10%, M.B.: 900) με χημική ονομασία (4''R)-4''ακετυλαμινο-5-O-διμεθυλ-25-δι(1-μεθυλπροπυλ)-4''-δεοξυ-25-(1-μέθυλ)αβερμεκτίνη (Merck 1996). (Εικόνα 5)



Εικόνα 5: Χημική δομή της ανθελμινθικής ουσίας Eprinomectin

Οι μακροκυκλικές λακτόνες χρησιμοποιούνται κατα κόρων λόγω του μεγάλου εύρους δράσης τους εναντίον νηματόδων και αρθρόποδων παρασίτων. Αν και

έχουν μεγάλο περιθώριο ασφαλείας για τα ζώα και είναι αποτελεσματικά εναντίον όλων των σταδίων των σκωλήκων, είναι αναποτελεσματικά έναντι ταινιών και τρηματόδων (Romero-González, Garrido Frenich and Martínez Vidal, 2013). Οι στόχοι του κτηνιατρικού φαρμάκου Eprinomectin αποτελούνται από ένα ευρύ φάσμα παρασίτων μερικοί εκ των οποίων είναι:

- 1) Οι ασκαρίδες του εντέρου (*Haemonchus placei*, *Nematodirus helvetianus*)
- 2) Σκώληκες του πνεύμονα (*Dictiocaulus viviparus*)
- 3) Προνύμφες εντόμων (*Hypoderma lineatum*)
- 4) Ψείρες (*Damalia bovis*, *Linognathus vituli*)
- 5) Ακάρεα της ψώρας (*Chorioptes bovis*, *Sarcoptes scabiei*)
- 6) Έντομα (*Heamatobia irritans*)

Όπως όλες οι αβερμεκτίνες, έτσι και το Eprinomectin χαρακτηρίζεται ως υδρόφοβο μόριο, μεγάλου μοριακού βάρους, το οποίο προσροφάται στο έδαφος, είναι δυσδιάλυτο στο νερό, όπου φωτολύεται σχετικά γρήγορα, ενώ αντίθετα στο έδαφος ο χρόνος ημιζωής του μπορεί να είναι πάνω από 60 ημέρες (Merck 1996).

Ο μηχανισμός δράσης είναι παρόμοιος με των υπόλοιπων αβερμεκτινών. Προκαλούν αργή αλλά μη αναστρέψιμη ενεργοποίηση καναλιών χλωρίου εξαρτώμενων από γλουταμινικό τα οποία εκφράζονται σε νευρώνες και μυϊκά φαρυγγικά κύτταρα των νηματοδών. Ως αποτέλεσμα τα νευρικά ή τα μυϊκά κύτταρα παραμένουν σε κατάσταση υπερπόλωσης ή αποπόλωσης, το οποίο οδηγεί στην παράλυση ή στο θάνατο των παρασίτων. Λόγω υδροφοβικότητας η ένωση δεν διαπερνά εύκολα των αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Wolstenholme, 2012).

1.8 Υπολειμματικότητα ανθελμινθικών φαρμάκων σε ζώα παραγωγής

Παρά την ευεργετική χρήση των ανθελμινθικών φαρμάκων έναντι διαφόρων παρασίτων μπορούν να προκαλέσουν μία σειρά από ανεπιθύμητα αποτελέσματα στα ζώα που υποβάλλονται σε θεραπεία όπως εμβρυοτοξικότητα και τερατογένεση (Higa *et al.*, 1992). Έτσι, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στην απειλή της ανθρώπινης υγείας λόγω κατανάλωσης τροφίμων ζωικής προέλευσης όπως γάλα, τυρί ή ακόμη και το ίδιο το κρέας του ζώου. Τα μέγιστα όρια καταλοίπων σε ορισμένα προϊόντα ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος και του κρέατος, έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (EU 2010) αλλά για άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα (τυρί, βούτυρο) υπάρχει έλλειψη ελέγχων. Για τη διασφάλιση της συμμόρφωσης με τους κανονισμούς απαιτείται παρακολούθηση των υπολειμμάτων ανθελμινθικών φαρμάκων στα τρόφιμα (Tsiboukis *et al.*, 2013).

1.8.1 Μεταβολισμός και υπολειμματικότητα των βενζιμιδαζολών σε ζωικούς οργανισμούς

Οι βενζιμιδαζόλες είναι ιδιαίτερα δυσδιάλυτες στο νερό και είναι γενικά αποτελεσματικές μόνο όταν χορηγούνται από του στόματος. Γενικά, οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την υπολειμματικότητα του εκάστοτε φαρμάκου είναι:

- 1) Η οδός χορήγησης
- 2) Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου
- 3) Το είδος του ζώου που χορηγείται το φάρμακο
- 4) Η κτηνοτροφία

1.8.2 Μεταβολισμός και υπολειμματικότητα του *Albendazole* ζωικούς οργανισμούς

Οι μεταβολίτες των ανθελμινθικών φαρμάκων ABZ και FBZ περιέχουν έναν δεσμό σουλφιδίου, ο οποίος είναι ευαίσθητος στην οξείδωση, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται οι μεταβολίτες των δύο φαρμάκων. Ο χρόνος ημιζωής της κύριας ένωσης είναι μικρός και ως εκ τούτου τα μεταβολικά προϊόντα είναι αυτά που κυριαρχούν στη συστηματική κυκλοφορία. Οι κύριοι μεταβολίτες που συνήθως παράγονται μέσω οξείδωσης και υδρόλυσης, είναι πιο πολικοί και υδατοδιαλυτοί από την αρχική ένωση (Křížová-Forstová *et al.*, 2011).

Σε βοοειδή που υποβλήθηκαν σε αγωγή από του στόματος με δόση ραδιοσημασμένου ABZ, αποδείχθηκε ότι τα κατάλοιπα εμφανίζονται κυρίως στο ήπαρ, ακολουθούμενα από τους νεφρούς με χαμηλότερα επίπεδα καταλοίπων. Στους μόσχους, 90% των υπολειμμάτων ήταν εκχυλίσμα την 1^η ημέρα μετά τη θεραπεία με από του στόματος δόση ραδιοσημασμένου ABZ. Εντούτοις, 4-10 ημέρες μετά την αγωγή μόνο το 20-30% των καταλοίπων ήταν εκχυλίσμα. Το μητρικό φάρμακο και οι μεταβολίτες του αντιπροσώπευαν το 27% και 52% των συνολικών εκχυλισμάτων σε 1 ημέρα μετά τη θεραπεία, αντίστοιχα. Στις 4 ημέρες μετά την αγωγή το ABZ δεν ανιχνεύθηκε στους ιστούς και οι μεταβολίτες αντιπροσώπευαν το 40-50% των ολικών εκχυλίσμων καταλοίπων.(Danaher *et al.*, 2007).

Σε πρόβατα που υπεβλήθησαν σε αγωγή με μία δόση ABZ από το στόμα, 100% των υπολειμμάτων ήταν εκχυλίσμα σε 1 ημέρα μετά τη θεραπεία. Η κατανομή υπολειμμάτων στους ιστούς ήταν παρόμοια με εκείνη στα βοοειδή. Ωστόσο, μόνο το 37% και 13% των υπολειμμάτων ήταν εκχυλίσμα στις 4 και 8 ημέρες μετά τη θεραπεία, αντίστοιχα. Σε πρόβατα που έλαβαν ενδοφλέβια δόση ABZ για 7 και 14 ημέρες, φάνηκε ότι τα υπολείμματα αντιπροσώπευαν τα 80-100%, 52-58% και 47-74% των συνολικών εκχυλισμάτων στους μύες, το ήπαρ και τα νεφρά, αντίστοιχα, την ίδια ημέρα μετά τη θεραπεία. Τέλος σε πρόβατα που έλαβαν απο του στόματος δόση του μεταβολίτη του ABZ, το ABZSO βρέθηκε ότι ο κύριος μεταβολίτης που

ανιχνεύθηκε στο ήπαρ και στα νεφρά, 1 ημέρα μετά τη θεραπεία ήταν το ABZSO₂ (Danaher *et al.*, 2007).

Οι (Delatour *et al.*, 1990) μελέτησαν τη φαρμακοκινητική του Albendazole (ABZ) σε βοοειδή και πρόβατα και αποκάλυψαν διαφορές στις συγκεντρώσεις του σουλφοξειδίου της Αλμπενδαζόλης (ABZSO) και της αδρανούς σουλφόνης της αλμπενδαζόλης (ABZSO₂) μετά από χορήγηση ABZ. Ο χρόνος ημιζωής και ο μέσος χρόνος παραμονής του ABZSO ήταν σημαντικά υψηλότερος στα πρόβατα απ' ό,τι στα βοοειδή. Επίσης η συστηματική διαθεσιμότητα των ABZ και ABZSO ήταν επίσης σημαντικά υψηλότερη στις αίγες απ' ό,τι στα πρόβατα, κάτι το οποίο σημαίνει πως οι αίγες χρειάζονται μεγαλύτερη ποσότητα φαρμάκου (HENNESSY *et al.*, 1993)

1.8.3 Μεταβολισμός και υπολειμματικότητα του Fenbendazole σε ζωικούς οργανισμούς

Φαρμακοκινητικές μελέτες για το Fenbedazole (FBZ) και τους μεταβολίτες του, Oxfendazole (OFZ) και FBZSO₂, έδειξαν χαμηλές συγκεντρώσεις ενεργών σουλφοξειδίων και σουλφονών και ταχεία απενεργοποίηση. Συγκρίνοντας τους φαρμακοκινητικούς παράγοντες FBZ και OFZ σε άλογα και μηρυκαστικά, βρέθηκε ταχύτερη απενεργοποίηση, χαμηλότερη βιοδιαθεσιμότητα και βραχύτερη επιμονή των δραστικών ουσιών στα άλογα (Capece *et al.*, 2009).

Μελέτες σε ζώα που έλαβαν θεραπεία με Febantel (η μητρική ένωση του FBZ), FBZ και OFZ, έδειξαν ότι τα FBZ, OFZ, FBZSO₂ ήταν τα κύρια υπολείμματα. Όπως και το ABZ, το FBZ και τα σχετικά υπολείμματα φαρμάκων εντοπίζονται κυρίως στο ήπαρ και στους νεφρούς, με χαμηλότερα επίπεδα στους μύες και στο λιπώδη ιστό. Σε βοοειδή που έλαβαν από του στόματος δόση FEB, το 90% των υπολειμμάτων ήταν άμεσα εκχυλίσιμα 18 ώρες μετά τη θεραπεία ('Residues of some veterinary drugs in animals and foods', 1988). Σε αυτό το χρονικό σημείο, τα FBZ, OFZ, FBZSO₂ και FEB αντιπροσώπευαν το 30-41%, 4-19%, 14-15% και 3-6% των συνολικών εκχυλισμάτων. Στις 10 ημέρες μετά τη θεραπεία, λιγότερο από το 25% των υπολειμμάτων ήταν άμεσα εκχυλίσιμα από το ήπαρ. Το κύριο υπόλειμμα που βρέθηκε στις 10 ημέρες μετά τη θεραπεία ήταν η αμινοσουλφόνη FBZ (FBZ-SO₂-NH₂), η οποία αντιπροσώπευε το 12-35% των συνολικών υπολειμμάτων (Danaher *et al.*, 2007).

Σε πρόβατα που έλαβαν από του στόματος δόση FEB, παρουσίασαν υπολειμματικότητα κυρίως στο ήπαρ, με πολύ χαμηλά επίπεδα σε άλλους ιστούς. Οι χωριστές μελέτες σε βοοειδή και πρόβατα μετά από χορήγηση από το στόμα FBZ ανέφεραν περίπου 20 και 50 φορές υψηλότερα επίπεδα υπολειμμάτων, αντίστοιχα, στο ήπαρ σε σχέση με τον επόμενο ιστό που περιέχει την υψηλότερη υπολειμματικότητα. Το FBZ εντοπίστηκε επίσης αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα, σε χοίρους που έλαβα από του στόματος δόση FEB, καθώς τα επίπεδα

υπολειμματικότητας ήταν 10 φορές υψηλότερα στο ήπαρ απ'ότι σε άλλους ιστούς.(Danaher *et al.*, 2007). Οι (Capece *et al.*, 2009) διερεύνησαν τη διανομή οξειδωμένων καταλοίπων FBZ στους ιστούς μετά από θεραπεία χοίρων με χορήγηση FBZ μέσω τροφής. Η μελέτη έδειξε ότι και πάλι τα υψηλότερα επίπεδα μεταβολιτών ανιχνεύθηκαν στο ήπαρ ακολουθούμενα από τους νεφρούς, τον λιπώδη ιστό και τον μυϊκό ιστό.

Μετά από χορήγηση σε αίγες της ένωσης OFZ μέσω της στοματικής οδού, μερική συγκέντρωση της ουσίας μεταβολίζεται σε FBZ, ενώ και οι δύο ενώσεις απορροφώνται από τη γαστρεντερική οδό και στη συνέχεια μεταβολίζονται στο ήπαρ σε FBZSO₂. Και οι τρεις χημικές ενώσεις φτάνουν στη μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα μεταξύ 16 και 36 ώρες μετά τη χορήγηση της δόσης. Σύμφωνα με τους (Sangster *et al.*, 1991) οι αίγες εμφάνιζαν χαμηλότερη συγκέντρωση του OFZ στο πλάσμα τους σε σχέση με τα πρόβατα.

Σε συγκριτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε ως προς τον μεταβολισμό και την εναπόθεση του FBZ και του ABZ στο πλάσμα και στους ιστούς οι (Virkel *et al.*, 2004) κατέληξαν σε δύο αποτελέσματα. Το πρώτο αποτέλεσμα είχε να κάνει με το ότι τα αρωματικά παράγωγα των βενζιμιδαζολών όπως το FBZ και ο ενεργός μεταβολίτης του OFZ απαιτούν εκτεταμένο ηπατικό οξειδωτικό μεταβολισμό σε σχέση με τα αλειφατικά παράγωγα ABZ και ABZSO για να επιτευχθεί επαρκής πολικότητα για απέκκριση. Συνεπώς το FBZ ανακτάται από το πλάσμα μετά από στοματική χορήγηση σε πρόβατα και βοοειδή, ενώ το ABZ δεν ανιχνεύεται. Επίσης ο χρόνος ημιζωής και ο χρόνος παραμονής στο πλάσμα ήταν μεγαλύτεροι για το FBZ και τους μεταβολίτες του σε σύγκριση με τους μεταβολίτες του ABZ στα πρόβατα. Το 2^ο αποτέλεσμα είχε να κάνει με τις μεγάλες ποσότητες ανάκτησης των φαρμάκων από ιστούς όπως τους πνεύμονες και το λεπτό έντερο τόσο για το ABZ όσο και για το FBZ.

1.8.4 Υπολειμματικότητα βενζιμιδαζολών στο γάλα

Σε μελέτη που έγινε στην Ελλάδα και ασχολήθηκε με την εμφάνιση και τα επίπεδα συγκέντρωσης ανθελμινθικών υπολειμμάτων στο γάλα που προορίζεται για κατανάλωση βρέθηκε ότι το Albendazole δεν υπήρχε σε κανένα δείγμα, υποδεικνύοντας ότι η χορήγηση του χρησιμοποιείται σωστά και ακολουθεί ο απαραίτητος χρόνος μεταξύ χορήγησης του φαρμάκου και απόσυρσης του γάλακτος. Οι μεταβολίτες του ανιχνεύθηκαν αλλά σε συγκεντρώσεις που κυμαινόνταν στο όριο της ανίχνευσής τους, ενώ για να εξαλειφθούν πλήρως χρειάστηκαν 156 ώρες, αν και ο νόμιμος χρόνος εξάλειψης είναι 72 ώρες. Επίπλέον δεν ανιχνεύθηκε ούτε η άλλη βενζιμιδαζόλη το Fenbendazole καθώς και μεταβολίτης του.

1.8.5 Υπολειμματικότητα του Eprinomectin στους ζωικούς οργανισμούς

Η ανθελμινθική ουσία Eprinomectin, είναι η μοναδική μακροκυκλική λακτόνη που έχει πάρει έγκριση για χρήση κατά τη διάρκεια της γαλουχίας με μηδενική περίοδο αναμονής γάλακτος, λόγω του ευνοϊκού προφίλ διαχωρισμού μεταξύ ορού

και γάλακτος που διατηρεί. Η διαφορά του Eprinomectin σε σχέση με τις άλλες αβερμεκτίνες είναι η πολύ μικρή τιμή της συγκέντρωσής της στο γάλα αγελάδων προς την αντίστοιχη στο πλάσμα, όπου υπολογίστηκε στο 0,1 σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής όταν στις άλλες ιβερμεκτίνες ο λόγος είναι 1 (Baoliang *et al.*, 2006). Τα προϊόντα που δε φέρουν απαγόρευση για χρήση σε ζώα γαλακτοπαραγωγής κατά τη διάρκεια της γαλουχίας έχουν ιδιαίτερη σημασία για την εμπορική εκτροφή προβάτων στη περιοχή της Μεσογείου, όπου παράγονται τα 2/3 του παγκόσμιου γάλακτος από πρόβατα (Hamel *et al.*, 2017).

Σε έρευνα που είχε ως σκοπό τη μελέτη του προφίλ εξάντλησης του Eprinomectin σε ιστούς βοοειδών για τον καθορισμό της περιόδου απόσυρσης μετά από υποδόρια χορήγηση (Jiang *et al.*, 2005), τα αποτελέσματα έδειξαν ότι είχε συσσωρευτεί φάρμακο σε μύες, ήπαρ, νεφρούς και λιπώδη ιστό. Ο κύριος στόχος φαίνεται πως είναι το συκώτι καθώς οι συγκέντρωση του Eprinomectin στο συγκεκριμένο ιστό ήταν τουλάχιστον 5 φορές μεγαλύτερη από τη δεύτερη υψηλότερη στους νεφρούς και στον λιπώδη ιστό, ενώ η συγκέντρωση στους μύες ήταν πολύ μικρότερη. Μετά από 28 ημέρες οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου ήταν περίπου ίδιες για ήπαρ, νεφρούς και λιπώδη ιστό, κάτι που υποδείκνυε τη χαμηλή εξάλειψη του φαρμάκου σε νεφρούς και λιπώδη ιστό, ενώ δεν υπήρχαν υπολείμματα στον μυϊκό ιστό. Τέλος μετά από 56 ημέρες υπολείμματα φαρμάκου βρισκόταν μόνο στο ήπαρ (Jiang *et al.*, 2005).

Μία πρόσφατη έρευνα που εξέτασε τη φαρμακοκινητική του Eprinomectin και την συγκέντρωση του στο πλάσμα προβάτων με χορήγηση με σύριγγα (Hamel *et al.*, 2017) έδειξε πως η συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα έφτασε στη μέγιστη απόδοση μετά από 2 ημέρες, ενώ δεν υπήρχε καθόλου υπολειμματικότητα μετά από 17 ημέρες.

Γενικά, συνίσταται ότι, δεδομένης της χαμηλότερης βιοδιαθεσιμότητας που παρατηρείται σε κατσίκες σε σύγκριση με άλλα μηρυκαστικά, η δόση μακροκυκλικών λακτονών σε αιγοειδή πρέπει να διπλασιαστεί σε σύγκριση με εκείνη που ορίζεται για τα πρόβατα ή τα βοοειδή, ανεξαρτήτως της οδού χορήγησης (Toutain, Ferran and Bousquet-Mélou, 2010). Η συμπεριφορά γλειψίματος που επιδεικνύουν τα μνηκαστικά, έχει δειχθεί ότι οδηγεί σε απροσδόκητες συγκεντρώσεις φαρμάκου όταν χορηγηθεί τοπικά, παρόλο που η συμπεριφορά αυτή φαίνεται να είναι πιο έντονη στα βοοειδή απ'ότι στα αιγοειδή. Με βάση αυτό θα ήταν πιο αποτελεσματική η χορήγηση μέσω ενέσιμης μορφής του φαρμάκου για την ανθελμινθική θεραπεία των αιγών (Bousquet-Mélou *et al.*, 2011). Όσον αφορά την φαρμακοκινητική του Eprinomectin στο πλάσμα των αιγών, τα αποτελέσματα των (Briqué-Pellet *et al.*, 2017), έδειξαν ότι το φάρμακο έφτασε στη μέγιστη συγκέντρωση του στις 2 ημέρες, ενώ μετά από 14 ημέρες τα επίπεδα του στο πλάσμα είχαν σχεδόν εξαφανιστεί.

1.9 Υπολειμματικότητα των βενζιμιδαζολών σε κοπροσωρούς

Παρ'όλο που χημική ουσία Albendazole είναι γνωστή από το 1975, οι μελέτες που έχουν γίνει για την επίδρασή της γενικότερα στο περιβάλλον και ειδικότερα σε κοπροσωρούς ελάχιστες. Το ABZ μετά την από του στόματος χορήγηση απορροφάται στο γαστρεντερικό σωλήνα και μπορεί να μεταβολιστεί σε ABZSO το οποίο έχει επίσης αντιπαρασιτική δράση και χορηγείται επίσης ως ανθελμινθικό με την ονομασία Ricobendazole με τη σειρά του οξειδώνεται στον περισσότερο πολικό και λιγότερο ανθελμινθικώς ενεργό μεταβολίτη ABZSO₂ (Prchal *et al.*, 2016).

Σε πρόσφατη έρευνα που μελετήθηκε η υπολειμματικότητα του ABZ και των μεταβολιτών του σε κοπροσωρούς έδειξε ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις τόσο της μητρικής ένωσης όσο και του Ricobendazole επιτεύχθηκαν σε 9 και 7,5 ώρες, αντίστοιχα μετά από τη χορήγηση από του στόματος ενώ του ABZSO₂ μετά από 42 ώρες. Οι συγκεντρώσεις τους παρέμειναν σε ανιχνεύσιμα επίπεδα έως και 72 ώρες μετά. Οι μέσοι χρόνοι παραμονής ήταν σχεδόν ίδιοι για τα ABZ και ABZSO, ενώ για το ABZSO₂ ήταν μεγαλύτερος (36 ώρες) (Prchal *et al.*, 2016).

Το ABZ εμφανίζει από τις υψηλότερες τιμές προσρόφησης, κάτι το οποίο μειώνεται εάν αυξηθεί το pH, αφού εξαρτάται από την περιεκτικότητα των εδαφών σε οργανικές ουσίες, το pH και διάφορα ιχνοστοιχεία του εδάφους (Mutavdžić Pavlonić *et al.*, 2018). Τέλος, το ABZ εμφανίζει φωτοχημική διάσπαση μέσω UV-V ακτινοβολίας, ενώ οι μεταβολίτες του φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητοι σε UV-A (Ljubas *et al.*, 2018).

Τα κοινώς χρησιμοποιούμενα κτηνιατρικά αντιβακτηριακά και αντιπαρασιτικά φάρμακα, όπως οι βενζιμιδαζόλες φαίνεται πως επηρεάζουν αρνητικά την αποσύνθεση της οργανικής ουσίας της κοπριάς. Αυτό υποστηρίχθηκε από τους (Sommer and Bibby, 2002) μέσω της ανάλυσης της αποσύνθεσης της οργανικής ύλης των κοπροσωρών που περιείχαν κτηνιατρικά αντιπαρασιτικά (Fenbendazole) υποδηλώνοντας έτσι την υπολειμματικότητα της ουσίας ακόμη και 16 ημέρες μετά. Σε άλλη έρευνα για την τύχη του FBZ σε εκχύλιση από κοπροσωρούς από τους Kreuzig, Blümlein and Höltege, (2007) τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπήρξε υπολειμματικότητα τόσο του FBZ όσο και των αντίστοιχων μεταβολιτών του.

1.10 Υπολειμματικότητα του Eprinomectin σε κοπροσωρούς

Οι μακροκυκλικές λακτόνες μεταβολίζονται ελαφρά έως μέτρια στο ζώο που έχει υποστεί αγωγή και στη συνέχεια απεκκρίνονται στα κόπρανα για εβδομάδες έως και μήνες. Το μοτίβο της απέκκρισης επηρεάζεται τόσο από τα σκευάσματα όσο και από άλλους παράγοντες. Η μέγιστη έκκριση συνήθως εμφανίζεται την 1^η εβδομάδα με ενέσιμα σκευάσματα. Η συγκέντρωση της υπολειμματικότητας των

αβερμεκτινών μειώνεται ταχέως στη συνέχεια, αλλά το προϊόν μπορεί να ανιχνευθεί έως και 58 ημέρες μετά την εφαρμογή. Η κατανομή και η τύχη των αποβαλλόμενων υπολειμμάτων στο περιβάλλον εξαρτάται από το εάν τα ζώα που έχουν υποστεί αγωγή βρίσκονται σε βοσκότοπους ή είναι κλεισμένα σε εσωτερικούς χώρους (Floate, 2006).

Τα αποβαλλόμενα υπολείμματα δεσμεύονται ισχυρά με τις οργανικές ενώσεις των κοπράνων. Σε βοσκοτόπους, τα υπολείμματα εντοπίζονται κυρίως μέσα στον κοπροσωρό. Τα περιορισμένα δεδομένα υποδεικνύουν μικρή υποβάθμιση των υπολειμμάτων έως ότου ενσωματωθούν στο έδαφος. Τα υπολείμματα ιβερμεκτίνης σε κοπροσωρούς βοοειδών στη Δανία και την Τανζανία δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτη αποικοδόμηση μετά από 45 και 14 ημέρες αντίστοιχα. Οι χρόνοι ημιζωής στο έδαφος είναι περίπου 64 ημέρες για το Eprinomectin, 60 ημέρες για το Moxidectin ενώ σε μίγματα εδάφους και κοπριάς για το Ivermectin ο χρόνος ημιζωής κυμαινόταν από 14 έως 56 ημέρες. Η κοπριά λιπασματοποιείται την άνοιξη ή απλώνεται στην καλλιεργήσιμη γη. Η ενσωμάτωση στο έδαφος πριν από τη σπορά σε συνδυασμό με την αερόβια αποικοδόμηση και τη φωτο-αποικοδόμηση, μειώνει περαιτέρω τη συγκέντρωση των καταλοίπων (Floate, 2006).

Τα υπολείμματα στους βοσκότοπους θεωρείται ότι αποτελούν μεγάλο κίνδυνο για το περιβάλλον. Αν και η συγκέντρωση των φαρμάκων περιορίζεται σε μια μικρή περιοχή (αυτή των κοπροσωρών), οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων μπορεί να είναι σχετικά υψηλές και ενδέχεται να επηρεάσουν δεκάδες είδη οργανισμών που δημιουργούν αποικίες στις κοπροσωρούς κατά τους καλοκαιρινούς μήνες (Floate, 2006).

Η σχετική βιβλιογραφία είναι αρκετά περιορισμένη και αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι το συγκεκριμένο φάρμακο πήρε τη σχετική άδεια πρόσφατα (1997) στις Η.Π.Α, ακόμη πιο αργά ήρθε στην Ευρώπη, ενώ στην Ελλάδα αδειοδοτήθηκε μόλις το 2013 ενώ δευτερευόντως οφείλεται στη μη ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για τον ποσοτικό προσδιορισμό του Eprinomectin σε περιβαλλοντικά δείγματα όπως η κοπριά, το έδαφος και το νερό (Litskas *et al.*, 2013).

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος του αριθμού των αβγών των παρασίτων (GINs) σε σύγκριση με τη μελέτη της υπολειμματικότητας των κτηνιατρικών ανθελμινθικών φαρμάκων σε κοπρωσώρους και η εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων σχετικά με το σωστό τρόπο χρήσης τους.

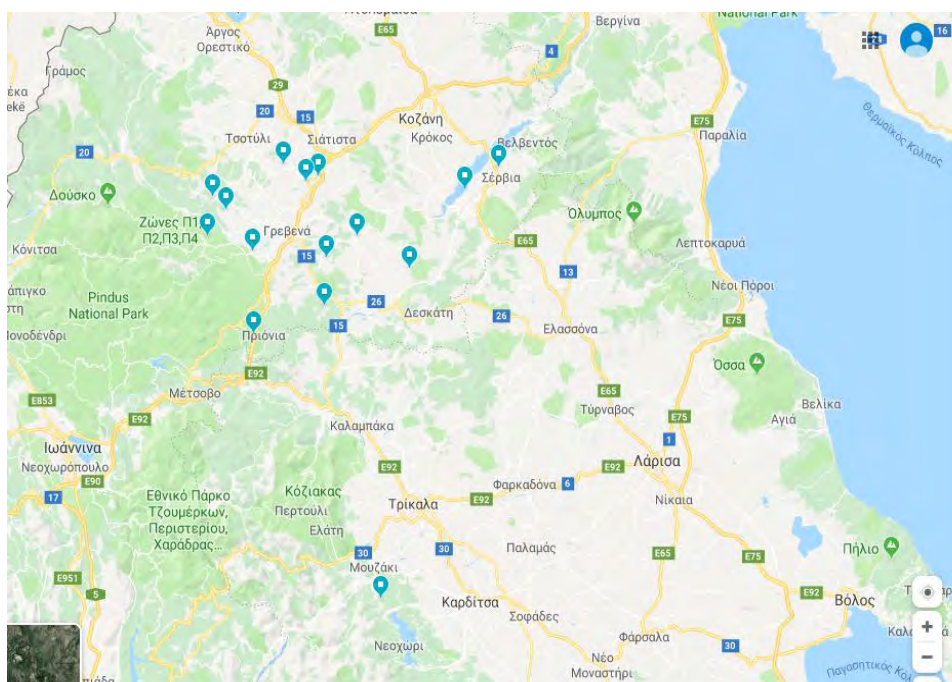
2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Εκτροφές

Οι εκτροφές που επιλέχθηκαν για τη διαδικασία της δειγματοληψίας, έγιναν βάση διακρατικού προγράμματος μεταξύ Ελλάδας-Αλβανίας μέσω του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού ‘‘Δήμητρα’’ σε περιοχές της Κοζάνης και των Γρεβενών οι οποίες και εμφανίζουν υψηλή κτηνοτροφική δραστηριότητα, επομένως ήταν και έντονη η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων. Λεπτομερή στοιχεία των εκτροφών καταγράφηκαν σε ερωτηματολόγια (Παράρτημα 1)

Οι μονάδες εκτροφής αποτελούνταν από αιγοπρόβατα στα οποία χορηγούνταν Albendazole (είτε σε μορφή χαπιού, είτε σε υγρή μορφή), Fenbendazole (χάπι) και Eprinomectin (χάπι) ετήσια και συνήθως σε συγκεκριμένες περιόδους (πριν τον τοκετό ή πριν τη βόσκηση συνήθως). Συλλέχθηκαν δείγματα κοπράνων από συνολικά 18 φάρμες εκ των οποίων οι 2 βρισκόταν στο Ν.Κοζάνης. Αναλυτικά τα δείγματα που συλλέχθηκαν αναγράφονται παρακάτω (Εικόνα 1, Πίνακας 1) μαζί με τις τοποθεσίες της κάθε εκτροφής.

Εικόνα 1: Εκτροφές όπου πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία



Πίνακας 1: Εκτροφές, κτηνιατρικά φάρμακα, ημερομηνία χορήγησης ουσίας και καταγραφής δειγματοληψίας

ΕΚΤΡΟΦΗ	ΟΥΣΙΑ ΠΟΥ ΧΟΡΗΓΗΘΗΚΕ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ	ΜΗΝΑΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΟΥΣΙΑΣ
GR006	ALBENDAZOLE	19/2/2019	ΜΑΙΟΣ
GR007	ALBENDAZOLE	19/2/2019	ΠΡΟΒΑΤΑ-ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, ΑΙΓΕΣ-ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ
GR009	HAPADEX(NETOBIMIN)	21/2/2019	ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ
GR010	ALBENDAZOLE	21/2/2019	ΠΡΟΒΑΤΑ-ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, ΑΙΓΕΣ-ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ
GR011	FENBENDAZOLE	21/2/2019	ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ
GR012	EPRINOMECTIN	28/2/2019	ΠΡΟΒΑΤΑ-ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, ΑΙΓΕΣ-ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ
GR013	ALBENDAZOLE, EPRINOMECTIN	28/2/2019	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ,ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ (ALBENDAZOLE), ΜΑΙΟΣ(EPRINOMECTIN)
GR014	ALBENDAZOLE	28/2/2019	ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ,ΑΠΡΙΛΙΟΣ
GR015	ALBENDAZOLE, FENBENDAZOLE	12/3/2019	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ,ΜΑΡΤΙΟΣ (ALBENDAZOLE), ΙΟΥΝΙΟΣ (FENBENDAZOLE)
GR017	IVERMECTIN, EPRINOMECTIN	12/3/2019	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ
GR019	10-CODACIN ?????	14/3/2019	ΠΡΟΒΑΤΑ-ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, ΑΙΓΕΣ-ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ
GR020	ALBENDAZOLE, HAPADEX	14/3/2019	ΠΡΟΒΑΤΑ-ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, ΑΙΓΕΣ-ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ
GR025	ALBENDAZOLE	3/4/2019	ΠΡΟΒΑΤΑ-ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, ΑΙΓΕΣ-ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ
GR028	FENBENDAZOLE, EPRINOMECTIN	11/4/2019	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, ΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ?>?>?
GR029	ALBENDAZOLE	11/4/2019	ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ
FARM C	EPRINOMECTIN	11/7/2019 & 17/7/2019	DAY 0/7 μετά τη χορήγηση
FARM B	EPRINOMECTIN	11/7/2019 & 17/7/2019	DAY 0/7 μετά τη χορήγηση
FARM A	EPRINOMECTIN	11/7/2019 & 17/7/2019	DAY 0/7 μετά τη χορήγηση

2.2 Μεθοδολογία συλλογής

Τα δείγματα κοπράνων συλλέχθηκαν απευθείας από ζώα. Από κάθε εκτροφή απομονώθηκαν κόπρανα από 20 διαφορετικά ζώα, εκτός από τις 3 τελευταίες όπου συλλέχθηκαν 50 δείγματα.

2.3 Ανάλυση δειγμάτων και έλεγχος συγκέντρωσης παρασίτων

2.3.1 Χημικά αντιδραστήρια και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

Χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά ποτήρια ως δοχεία των κοπράνων καθώς και ξύλινες σπάτουλες για την ανάδευση και ομοιογένειά τους. Η φυγοκέντρωση έγινε με σκοπό να καθιζάνουν τα αβγά ενώ για τη μετέπειτα επίπλευσή τους χρησιμοποιήθηκε χλωριούχο νάτριο (NaCl).

2.3.2 Περιγραφή της διαδικασίας καταμέτρηση των αβγών των νηματώδων (GINs)

Τα περιβαλλοντικά δείγματα μεταφέρονταν άμεσα στο εργαστήριο, όπου ακολουθούσε μία σειρά διεργασιών με σκοπό τον έλεγχο των δειγμάτων για τυχών παρουσία παρασίτων μέσω της τεχνικής τροποποιημένης μεθόδου McMaster. Σκοπός της συγκεκριμένης τεχνικής είναι η παρακολούθηση της συγκέντρωσης προνυμφών 3^{ου} σταδίου (L3), των παρασίτων που βρίσκονται στα κόπρανα, ύστερα από καλλιέργεια των τελευταίων (νηματώδη) ή άμεσα (πνευμονικές προνύμφες) καθώς και της συγκέντρωσης των αβγών των παρασίτων. Πιο συγκεκριμένα, τα 20 δείγματα κοπράνων χωρίζονταν σε 5 μιξ των 4 δειγμάτων κοπράνων (Α,Β,Γ,Δ) όπου και ζυγίζονταν 4 gr κοπράνων από το κάθε μιξ και τοποθετήθηκαν σε πλαστικό ποτήρι μίας χρήσης. Έπειτα προστέθηκε νερό βρύσης (28ml) και το εναιώρημα αναδεύτηκε με ξύλινη σπάτουλα αφήνοντας στο στη συνέχεια για 30' να καθιζάνει. Έπειτα, υπήρξε μεταφορά του μίγματος με τη βοήθεια δύο φύλλων γάζας σε νέο πλαστικό ποτήρι, ενώ το νέο δείγμα τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα (10ml). Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 1.500 στροφές/λεπτό για 5' και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε με αναρρόφηση. Στο τέλος της φυγοκέντρωσης προστέθηκε κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου μέχρι το συνολικό όγκο των 4ml και μετά από προσεκτική ανάδευση και με τη βοήθεια πλαστικού σιφωνίου (πιπέτα Pasteur) το δείγμα τοποθετήθηκε στους 2 ειδικούς χώρους της πλάκας McMaster για άμεση παρακολούθηση της συγκέντρωσης των αβγών. Τέλος το παρασκεύασμα εξετάστηκε στο μικροσκόπιο όπου και έγινε η καταμέτρηση των αυγών παρασίτων. Το άθροισμα των αυγών και από τους 2 χώρους της πλάκας πολλαπλασιάστηκε με το συντελεστή 20 για τον υπολογισμό του αριθμού των αυγών ανα γραμμάριο κοπράνων.

Για τον εντοπισμό της συγκέντρωσης των νηματώδων, όπως ειπώθηκε προηγήθηκε καλλιέργεια κοπράνων. Τοποθετήθηκε ολόκληρη η ποσότητα των κοπράνων σε δοχείο και διαβράχθηκε ολόκληρη η μάζα, ανακατεύοντας την, ενώ αμέσως μετά το δοχείο τοποθετήθηκε σε κλίβανο με σταθερές συνθήκες (27°C για 12 ημέρες) ενώ φροντίζαμε κάθε 1-2 ημέρες να ανακατεύονται και να διαβρέχονται καλά οι καλλιέργειες. Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε σε στερεοσκόπιο και αφού πρώτα πραγματοποιήθηκε εκχύλισή τους.

2.4 Ανάλυση δειγμάτων για υπολείμματα ανθελμινθικών παρασιτοκτόνων

2.4.1 Διαλύτες, χημικά παρασκευάσματα

Για τις εκχυλίσεις και τη χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ACN και νερό (ddH₂O), ορθο-φωσφορικό οξύ (H₃PO₄ 0.1%) και MeOH. Όλα τα αντιδραστήρια ήταν HPLCgrade.

2.4.2 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Για τον προσδιορισμό της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των ουσιών συγκέντρωσης 1000mg/L σε MeOH ή ACN. Υπήρξαν διαδοχικές αραιώσεις 100mg/L, 10mg/L, 5mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 0.5 mg/L, 0.1 mg/L, 0.05 mg/L και 0.01 mg/L. Οι παραπάνω αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν στο μηχάνημα της HPLC για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των ουσιών.

2.4.3 Προσδιορισμός υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων στα κόπρανα

Από τα δείγματα κοπράνων που ελήφθησαν από τις διάφορες φάρμες παραλήφθησαν 40g από το καθένα τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Η μέθοδος εκχύλισης που ακολουθήθηκε ήταν η μέθοδος QUECHERS (Asensio-Ramos et al.). Έτσι 15 g κοπράνων διαχωρίστηκαν ισομερώς (5 g) σε 3 πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης Teflon και αναμίχθηκαν με 5 ml νερό HPLC grade. Ακολούθησε ανάδευσή τους σε vortex για 1'. Στη συνέχεια στους σωλήνες προστέθηκαν 10 ml ACN και αναδεύτηκαν ξανά σε vortex για 1'. Στα δείγματα ακολούθως προστέθηκε μίγμα αλάτων (4g άνυδρο MgSO₄, 1g NaCl και 1.5g Tris) για να ξαναμπούν σε vortex για 1'. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 7.500 rpm για 5', ενώ με το τέλος της φυγοκέντρωσης απομακρύνθηκε το υπερκείμενο (1ml) με τη βοήθεια πιπέτας και τοποθετήθηκε σε eppendorfs τα οποία περιείχαν δεύτερο μίγμα αλάτων (0.225g άνυδρο MgSO₄, 0.0375g PSA) και ξαναφυγοκεντρήθηκαν στα 2.400 rpm για 2'. Τέλος, το υπερκείμενο παραλήφθηκε με τη βοήθεια σύριγγας και τοποθετήθηκε σε vials αφού πρώτα διηθήθηκαν μέσω φίλτρου σύριγγας (0,45 μm). Τα vials χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των ουσιών στόχων μέσω HPLC.

Για το κτηνιατρικό φάρμακο Eprinomectin, υπήρξε ακόμη ένα στάδιο που περιελάμβανε τη τοποθεσία των δειγμάτων σε λουτρό υπερήχων. Η διαδικασία

πραγματοποιήθηκε μετά την εισαγωγή του 1^{ου} μιξ αλάτων και πριν τη 1^η φυγοκέντρωση για 5' αλλά και μετά την εισαγωγή του 2^{ου} μιξ αλάτων και πριν τη 2^η φυγοκέντρωση για 1'.

Για το Albendazole sulfoxide χρησιμοποιήθηκε άλλη τεχνική εκχύλισης η οποία περιελάμβανε ζύγισμα 5g εδάφους σε κωνικές φιάλες των 100ml και πρόσθεση 10ml ACN. Στη συνέχεια οι κωνικές φιάλες καλυπτόταν με αλουμινόχαρτο και τοποθετούνταν σε οριζόντιο αναδευτήρα για 60' στα 300 rpm. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης Teflon και στο εναπομείναν υλικό προστέθηκαν άλλα 10ml ACN και υπήρξε επανάληψη ανάδευσης για άλλα 60' ενώ και πάλι το υπερκείμενο συλλέχθηκε στο προηγούμενο Teflon. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 7500 rpm για 5' (20 °C), ενώ μετά τη φυγοκέντρωση αφαιρέθηκε το υπερκείμενο μέσω σύριγγας με τη χρήση φίλτρου με πόρους 0,45 μm. Πλέον το διάλυμα ήταν έτοιμο για ανάλυση σε μηχανήμα HPLC-DAD.

Για τη βελτίωση της ακρίβειας και της αποτελεσματικότητας της μεθόδου εκχύλισης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης των κτηνιατρικών φαρμάκων (Albendazole, Fenbendazole, Eprinomectin) σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/L, 0.5 mg/L, 0.1 mg/L) στις εκτροφές GR009 και GR019 οι οποίες δεν περιείχαν κανένα από τα προαναφερθέντα φάρμακα. Για κάθε συγκέντρωση ζυγιζόταν 40g κοπράνων. Υπήρξε επιτυχία στα τεστ ανάκτησης αφού έφτασε το ποσοστό ανάκτησης έφτασε πάνω από 80%.

2.4.3 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η διαδικασία της ανάλυσης των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν πραγματοποιήθηκε μέσω συστήματος HPLC Μοντέλο της εταιρείας UFLC SHIMADZU με ανιχνευτή φωτοδιόδων και στήλη Athena C18, 120A, (4,6 mm x 150mm, 5μm). Η ροή της κινητής φάσης ήταν 1ml min⁻¹. Στον Πίνακα 2 περιγράφονται οι συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης

Πίνακας 2: Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης σε σύστημα HPLC των υπό μελέτη κτηνιατρικών φαρμάκων

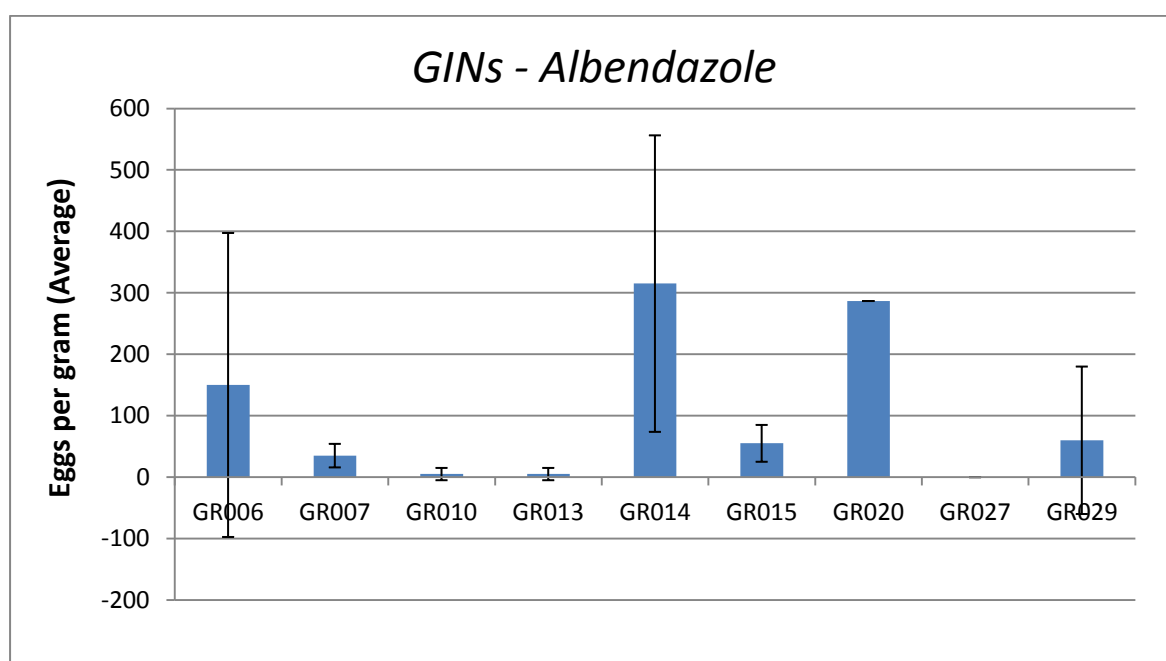
Κτηνιατρικά Φάρμακα	Κινητή Φάση	Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης	Μήκος κύματος (nm)	Χρόνος έκλουσης	Ροή ml/min
Albendazole	ACN : H ₃ PO ₄ (0,1%)	15:85→gradient (30:70)	205	27,5 min	1
Albendazole Sulfoxide	ACN : H ₃ PO ₄ (0,1%)	15:85→gradient (30:70)	220	4.5 min	1
Albendazole sulfone	ACN : H ₃ PO ₄ (0,1%)	15:85→gradient (30:70)	220	10.1 min	1
Fenbendazole	ACN : H ₃ PO ₄ (0,1%)	35:65	245	11.2 min	1
Eprinomectin	MeOH : H ₂ O	85:15	245	6,2 min	1

3. Αποτελέσματα

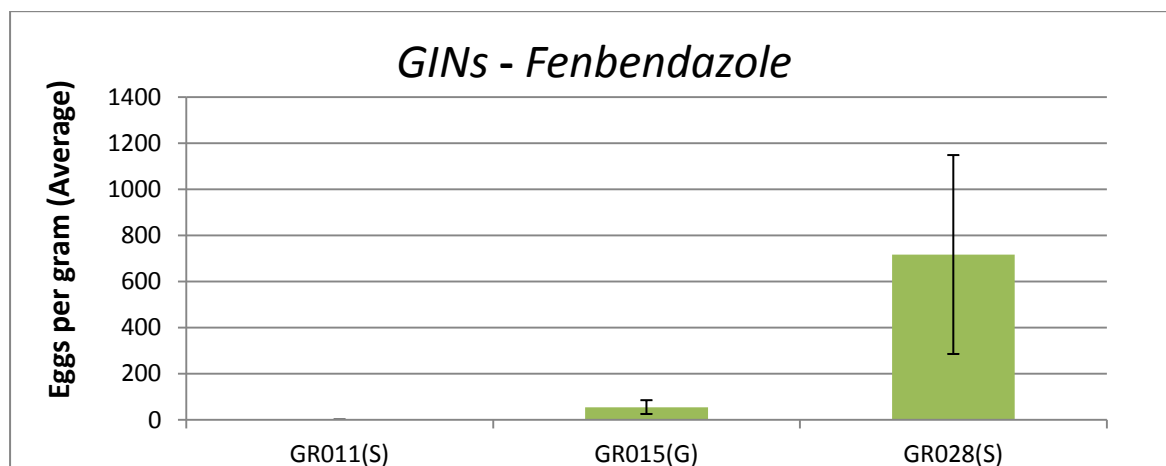
3.1. Μετρήσεις αυγών GINs σε δείγματα κοπράνων από εκτροφές προβάτων και αιγών

Συνολικά πάρθηκαν δείγματα κοπράνων από αιγοπρόβατα από 19 εκτροφές. Οι εκτροφές GR009 και GR019 χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες για δοκιμές ανάκτησης των φαρμάκων εφ' όσον δεν περιείχαν κανένα φάρμακο από τα τρία

Παρακάτω στα διαγράμματα 1,2,3 και 4 παρουσιάζεται ο αριθμός των αυγών των GINs που βρέθηκαν σε διάφορες εκτροφές αιγοπροβάτων μετά την χορήγηση των κτηνιατρικών ανθελμινθικών φαρμάκων σε δείγματα κοπράνων.



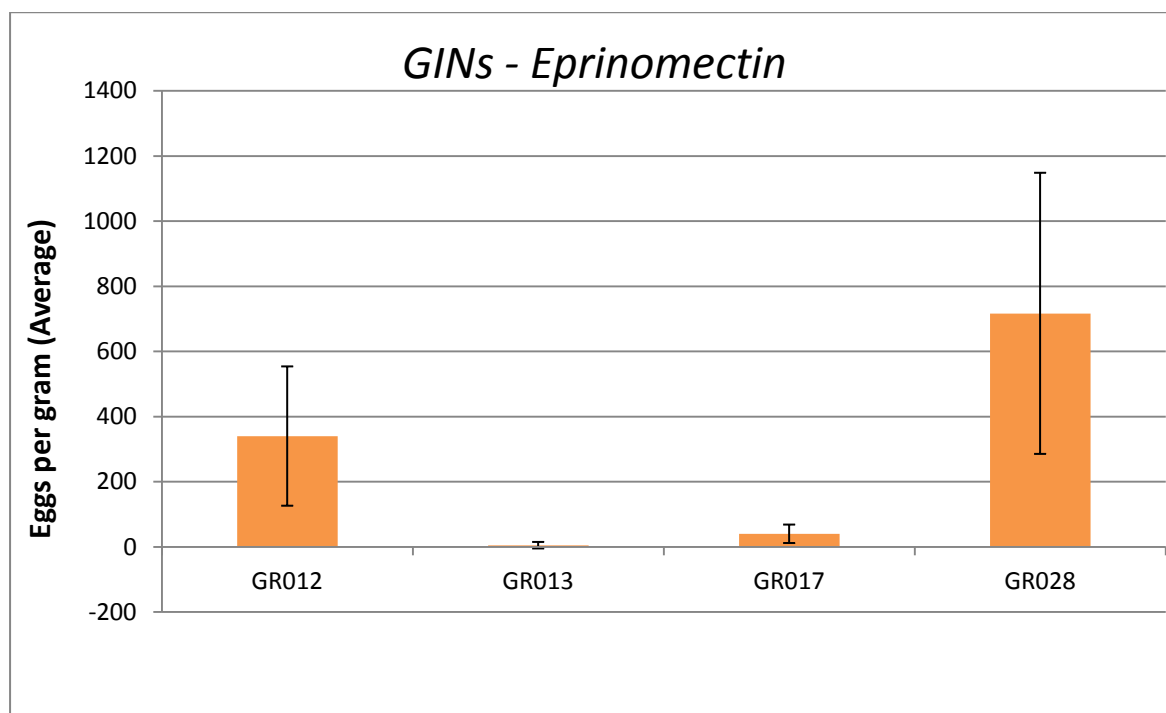
Διάγραμμα 1: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του αριθμού των αυγών GINs μετά τη χορήγηση του ανθελμινθικού φαρμάκου Albendazole



Διάγραμμα 2: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του αριθμού των αβγών GINs μετά τη χορήγηση του ανθελμινθικού φαρμάκου *Fenbendazole*

Από το 1^ο διάγραμμα που περιέχει εκτροφές στις οποίες χορηγήθηκε *Albendazole* φαίνεται να υπάρχει αυξημένος αριθμός αβγών (>100) στις εκτροφές GR006, GR014 και GR020. Ακολουθούν οι εκτροφές GR007, GR015 και GR029 με αριθμό αβγών άνω των 35 ενώ ο αριθμός αβγών στις φάρμες GR010, GR013 και GR027 κυμαίνονται μεταξύ 5 και 0 μία ένδειξη που δείχνει την θετική δράση του φαρμάκου.

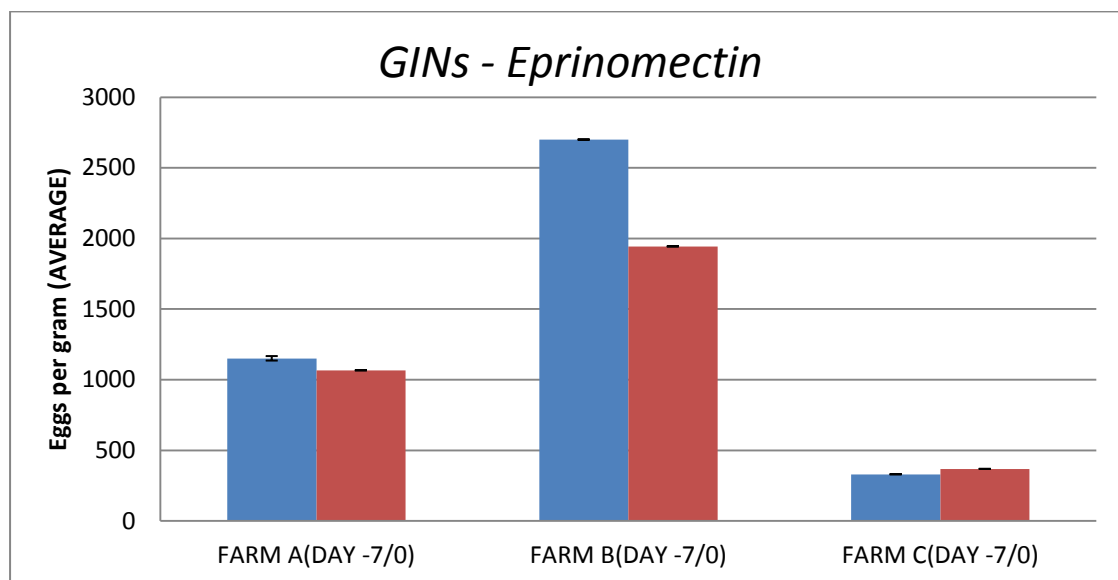
Στο 2^ο διάγραμμα το οποίο περιείχε εκτροφές στις οποίες χορηγήθηκε *Fenbendazole* παρατηρείται πολύ μεγάλος αριθμός αυγών στην εκτροφή GR028 (>700) παρ'όλο που χορηγήθηκε το *Fenbendazole* τον Οκτώβριο ενώ και πιο πριν (Μάιο) είχε χορηγηθεί *Eprinomectin* γεγονός το οποίο μπορεί να σημαίνει την ύπαρξη ανθελμινθικοαντοχής καθώς η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 11/4/2019. Στην εκτροφή GR011 δεν βρέθηκαν αβγά με το φάρμακο να χορηγείτε Σεπτέμβριο και τη δειγματοληψία να λαμβάνει χώρα 21/2/2019 κάτι που υποδηλώνει τη σωστή χρήση του φαρμάκου από τον κτηνοτρόφο. Για την 3^η εκτροφή (GR015) στην οποία έχει δοθεί εξίσου *Albendazole* (Οκτώβριος και Μάρτιος του 2018) και *Fenbendazole* (Ιούνιος 2018) ο αριθμός των αβγών είναι αρκετά υψηλός.



Διάγραμμα 3: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του αριθμού των αβγών GINs μετά τη χορήγηση του ανθελμινθικού φαρμάκου *Eprinomectin*

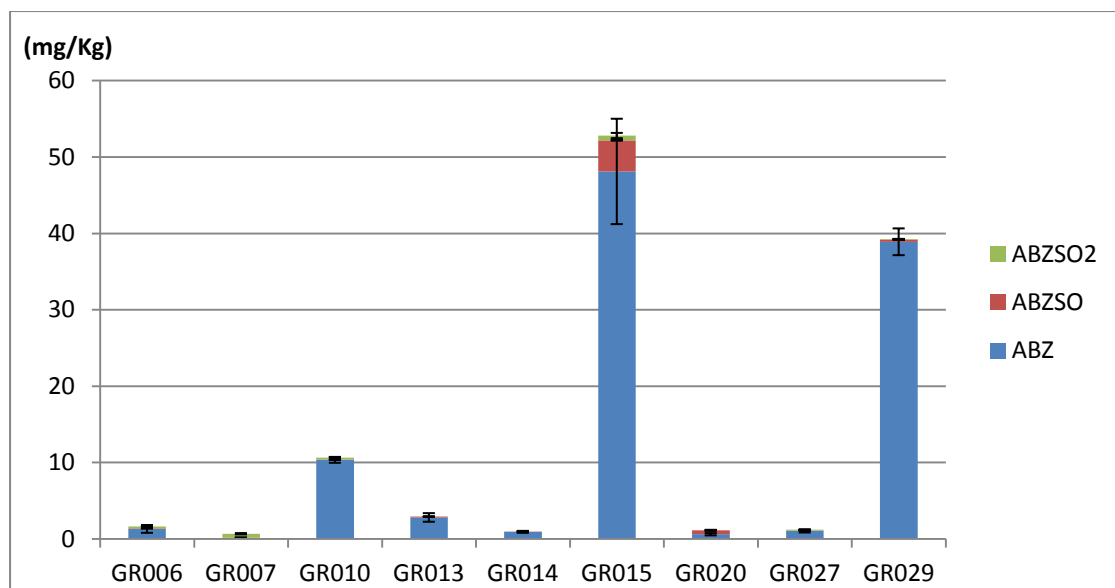
Στο Διάγραμμα 3 το οποίο περιέχει εκτροφές στις οποίες έχει χορηγηθεί το ανθελμινθικό φάρμακο *Eprinomectin* παρατηρείται ότι 2 φάρμες (GR012 και GR028) περιέχουν αρκετά μεγάλο αριθμό αβγών. Η εκτροφή GR028 αναλύθηκε πιο πάνω,

ενώ η GR012 στην οποία χορηγήθηκε Eprinomectin Δεκέμβριο και ελήφθη δείγμα 1 μήνα μετά (28/2/2019) παρουσιάζει αρκετά υψηλό αριθμό αβγών. Τέλος, στη GR017 (χορήγηση τον Οκτώβριο και δειγματοληψία στις 12/3/2019) ο μέσος όρος ήταν 40 αβγά και στη GR013 (χορήγηση τον Μάιο 2018 και δειγματοληψία στις 28/2/2019) ο μέσος όρος ήταν πολύ μικρός (5 αβγά).

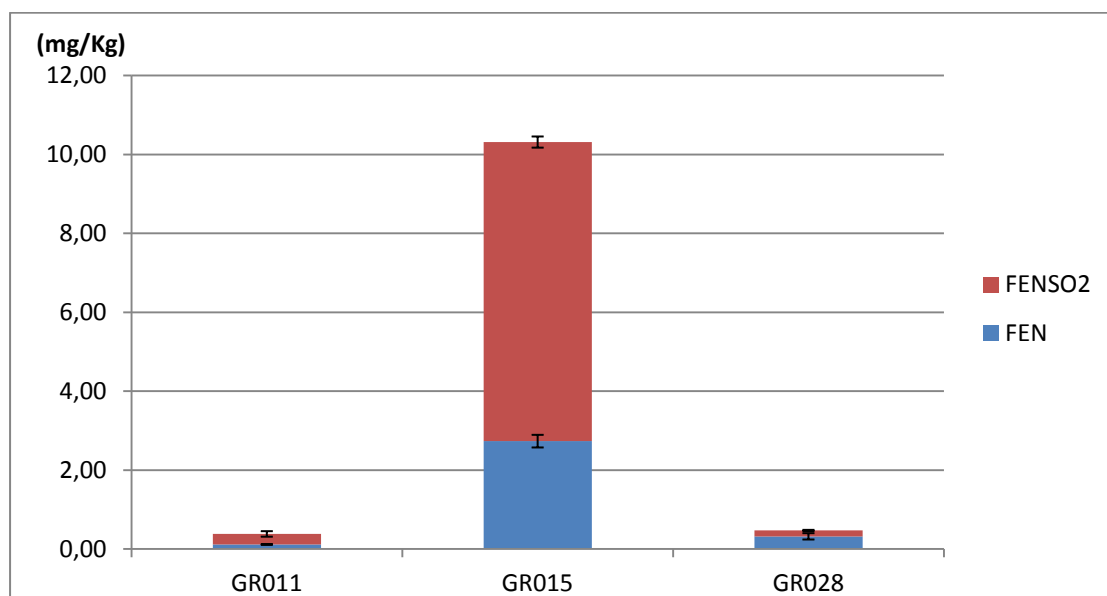


Διάγραμμα 4: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του αριθμού των αβγών GINs 7 ημέρες πριν και αμέσως μετά τη χορήγηση του ανθελμινθικού φαρμάκου Eprinomectin

Στο διάγραμμα 4 γίνεται μία σύγκριση του αριθμού των αβγών των GINs που υπάρχουν στα κόπρανα 7 ημέρες πριν τη χορήγηση του ανθελμινθικού φαρμάκου Eprinomectin και αμέσως μετά στις εκτροφές FARM A,B,C. Η FARM A παρουσιάζει μία μικρή μείωση των αβγών της τάξης του 8% (1150→1065) αμέσως μετά τη χορήγηση του φαρμάκου (DAY 0). Η FARM B φαίνεται να έχει τη μεγαλύτερη μείωση που φτάνει στο 30% του αρχικού μέσου όρου αβγών, αλλά δεν πρέπει να παραλείψουμε ότι είχε πολύ περισσότερα αβγά από τις άλλες δύο εκτροφές. Τέλος η FARM C παρουσιάζει μία μικρή αύξηση των αβγών την ημέρα της δειγματοληψίας που πλησιάζει το 10% του αρχικού μέσου όρου.



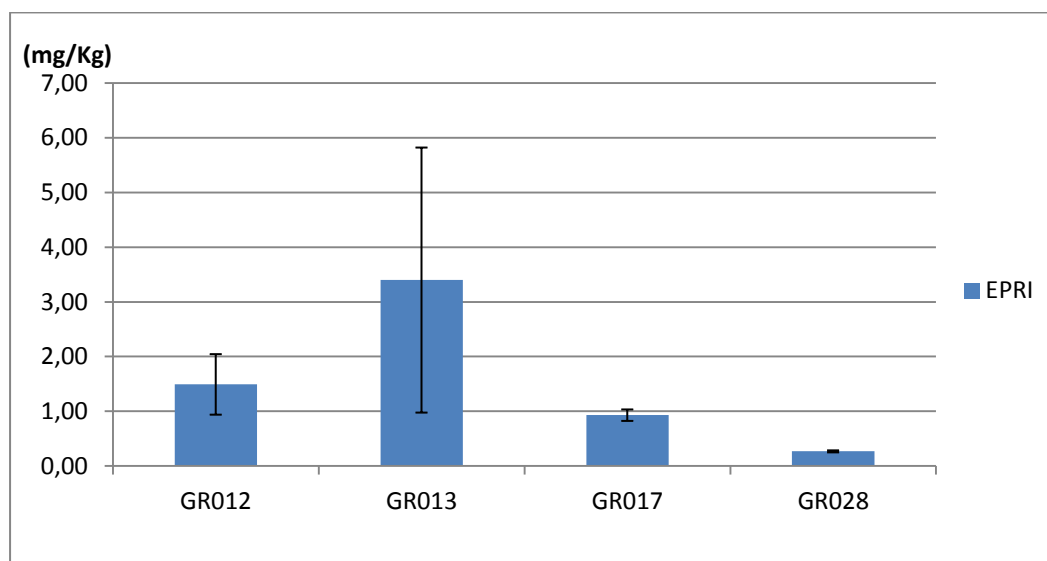
Διάγραμμα 5: Ανάκτηση του κτηνιατρικού ανθελμινθικού φαρμάκου Albendazole καθώς και των μεταβολιτών του Albendazole sulphoxide και Albendazole sulphone σε δείγματα κοπράνων



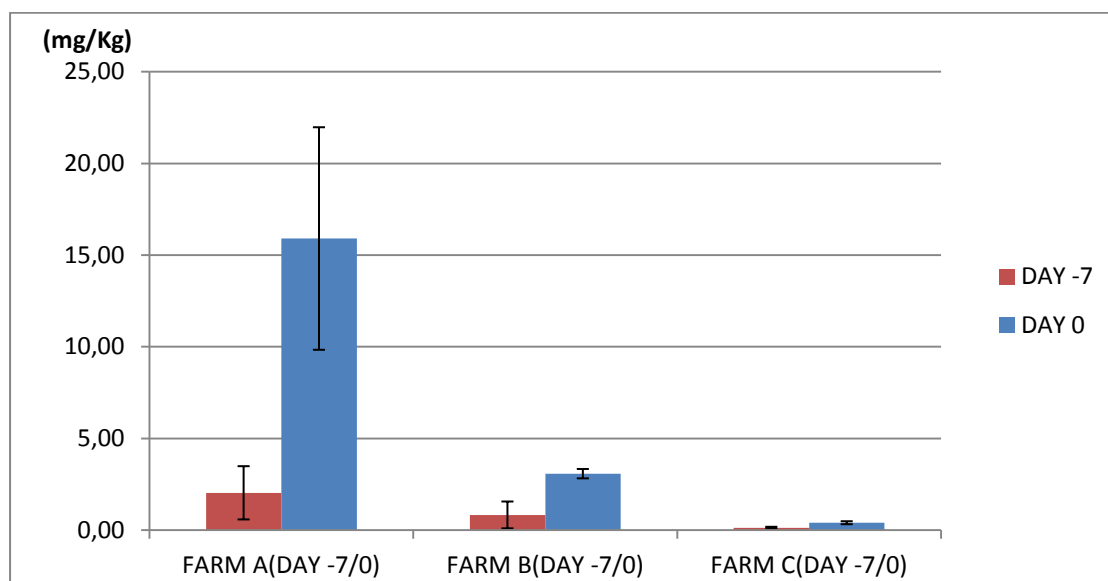
Διάγραμμα: Ανάκτηση του κτηνιατρικού ανθελμινθικού φαρμάκου Fenbendazole καθώς και του μεταβολίτη του Fenbedazole Sulphone σε δείγματα κοπράνων

Στα διαγράμματα 5 και 6 παρατηρούμε τη συγκέντρωση των ανθελμινθικών Βενζιμιδαζολών και των μεταβολιτών τους. Στο διάγραμμα 5 το μεγαλύτερο κομμάτι της πίτας κατέχει το Albendazole το οποίο εμφανίζει πολύ μεγάλη υπολειμματικότητα και ιδιαίτερα στις εκτροφές GR015 και GR029 , ενώ οι μεταβολίτες του εμφανίζουν μικρή ,στα όρια της ανιχνεύσιμης, υπολειμματικότητα εκτός του Albendazole Sulphoxide που φαίνεται να έχει αρκετά μεγάλη υπολειμματικότητα στην εκτροφή GR015. Στην ίδια εκτροφή επίσης εμφανίζεται

μεγάλη υπολειμματικότητα τόσο του Fenbendazole όσο και του μεταβολίτη του (Διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 7: Ανάκτηση του κτηνιατρικού ανθελμινθικού φαρμάκου Eprinomectin σε δείγματα κοπράνων



Διάγραμμα 8: Ανάκτηση του κτηνιατρικού ανθελμινθικού φαρμάκου Eprinomectin σε δείγματα κοπράνων 7 ημέρες πριν τη χορήγησή του και αμέσως μετά τη χορήγηση του

Στα διαγράμματα 7,8 φαίνεται η ανάκτηση των ανθελμινθικού φαρμάκου Eprinomectin από δείγματα κοπράνων αιγοπροβάτων. Στο διάγραμμα 7 φαίνεται να υπάρχει μεγάλη υπολειμματικότητα στην εκτροφή GR013 και λίγο μικρότερη στις υπόλοιπες. Όσον αφορά το διάγραμμα 8 η FARM A εμφανίζει εξαιρετικά μεγάλη συγκέντρωση του ακριβώς πριν τη χορήγησή του φαρμάκου (DAY 0), ενώ και η FARM B παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση του φαρμάκου τη μέρα της χορήγησης

του. Στη FARM C φαίνεται να τηρήθηκαν οι σωστοί χρόνοι χορήγησης του ανθελμινθικού αφού δεν φαίνεται να υπάρχει συγκέντρωση του φαρμάκου τόσο 7 ημέρες όσο και την ημέρα χορήγησης κάτι που ήταν αναμενόμενο.

4.1 Συσχέτιση μεταξύ μετρήσεων GINs και υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων στα δείγματα κοπράνων

Προκειμένου να μελετηθεί η ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στη δόση των ανθελμινθικών φαρμάκων και στον αριθμό αυγών στα κόπρανα, πραγματοποιήθηκαν για τα παραπάνω αποτελέσματα τα test συσχέτισης Pearson's και Spearman, τόσο για όλες τις φάρμες μαζί, όσο και ξεχωριστά για την κάθε εκτροφή. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν ότι σε αυτή τη συσχέτιση να υπάρχει στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$). Οι παραπάνω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε περιβάλλον εργασίας R.

4.Συζήτηση-Συμπεράσματα

4.1 Συζήτηση

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της υπολειμματικότητας των κτηνιατρικών ανθελμινθικών φαρμάκων Albendazole, Fenbendazole και Eprinomectin σε κόπρανα από κτηνοτροφικές μονάδες στις περιοχές του Ν.Γρεβενών και Ν.Κοζάνης σε συσχέτιση με τον αριθμό των αυγών των GINs. Οι περιοχές αυτές εμφανίζουν ιδιαίτερα ανεπτυγμένη κτηνοτροφία και ως εκ τούτου τα συγκεκριμένα ανθελμινθικά χορηγούνται κατά κόρον. Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αξιολογήθηκε α) ο αριθμός των αυγών νηματωδών σε κόπρανα και κατά πόσο αυτά επηρεάζονται από τη χρήση ανθελμινθικών φαρμάκων και β) η υπολειμματικότητα των συγκεκριμένων ανθελμινθικών φαρμάκων σε κόπρανα αιγοπροβάτων.

Όσον αφορά τη σύγκριση μεταξύ του αριθμού των GINs και της ανάκτησης του φαρμάκου τα αποτελέσματα δεν ήταν ξεκάθαρα κυρίως λόγω του ότι υπάρχουν κάποιοι περιοριστικοί παράγοντες που μας εμποδίζουν να έχουμε μία καλύτερη εικόνα όπως: α) λίγες δειγματοληψίες (θα έπρεπε να είχαν γίνει πριν και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου), β) Θα έπρεπε να δίνεται συγκεκριμένη ημερομηνία χορήγησης του φαρμάκου, καθώς οι απαντήσεις για το πότε χορηγήθηκε το φάρμακο ήταν αρκετά αυθαίρετες (π.χ. πριν τον τοκετό). Αυτοί οι παράγοντες δεν ισχύουν για τις εκτροφές Α,Β,С στις οποίες χορηγήθηκε Eprinomectin και υπήρξε μία πιο λεπτομερής καταγραφή, ωστόσο ήταν περιορισμένος ο αριθμός των δειγμάτων.

4.1.1 Albendazole

Υπάρχει εξαιρετικά μικρή βιβλιογραφία σχετικά με την υπολειμματικότητα του Albendazole σε κοπροσωρούς. Στα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης καταγράφηκε υπολειμματικότητα τόσο του μητρικού φαρμάκου όσο και των μεταβολιτών του σε σχεδόν όλες τις εκτροφές, παρ'όλο που σε μερικές το φάρμακο χορηγήθηκε τον μήνα Οκτώβριο και η δειγματοληψίες έγιναν έως και 6 μήνες μετά όπως για παράδειγμα στις εκτροφές GR027 και GR029 στις οποίες η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 11 Απριλίου. Μάλιστα στην εκτροφή GR029 η υπολειμματικότητα του φαρμάκου ήταν και ασυνήθιστα υψηλή. Μόνο σε 3 εκτροφές από τις 9 (GR013, GR014, GR020) που χρησιμοποιήθηκε Albendazole δε βρέθηκε καθόλου ο μεταβολίτης του (Albendazole sulphoxide). Δεδομένου ότι το συγκεκριμένο φάρμακο και οι μεταβολίτες του θα έπρεπε να έχουν απεκκριθεί εδώ και καιρό (Danaher *et al.*, 2007), τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δεν συνάδουν με τη προηγούμενη έρευνα κυρίως για εκτροφές όπου η δειγματοληψία έγινε πολλούς μήνες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου και ίσως να υπονοεί υπερχορήγηση του φαρμάκου σε δόσεις μεγαλύτερη από τη συνιστώμενη.

Συγκριτικά με τον αριθμό των αβγών των νηματώδων, αν και ισχύουν οι περιοριστικοί παράγοντες φαίνεται πώς μόνο στην εκτροφή GR029 η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου ήταν στο 100% αφού δεν ανιχνεύθηκε κανένα αβγό. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει σωστή χρήση του φαρμάκου από τον παραγωγό τόσο ως προς τη δόση όσο και ως προς τη χρονική περίοδο αφού τα επίπεδα των μεταβολιτών του ήταν στα όρια του ανιχνεύσιμου. Σε φάρμες στις οποίες υπήρχε υψηλή υπολειμματικότητα και ταυτόχρονα μεγάλοι αριθμοί GINs μπορεί να υποδηλώνει ανακρίβειες οσον αφορά την ημερομηνία χορήγησης του φαρμάκου καθώς και εκδήλωση ανθελμινθικοαντοχής.

4.1.2 Fenbendazole

Για το Fenbendazole πήραμε περίπου παραπλήσια αποτελέσματα και για το Albendazole. Φαίνεται από τα αποτελέσματα ότι στην εκτροφή GR011 υπήρξε αρκετά καλή χρησιμοποίηση του φαρμάκου αφού τόσο τα επίπεδα υπολειμματικότητας ήταν στα όρια του ανιχνεύσιμου ενώ και τα επίπεδα των GINs ήταν μηδενικά. Σε μεγάλη αντίθεση με αυτό έρχεται η εκτροφή GR029 στην οποία τα παράσιτα φαίνεται να έχουν αναπτύξει ανθελμινθικοαντοχή, εάν κρίνουμε ότι η υπολειμματικότητα του φαρμάκου και του μεταβολίτη του είναι “φυσιολογική” με βάση και τις άλλες εκτροφές, αλλά ο αριθμός των GINs είναι εξαιρετικά μεγάλος κάτι που υποδηλώνει ότι το φάρμακο απέτυχε ως προς τη δράση του και δημιουργήθηκε ανθελμινθικοαντοχή.

4.1.3 Eprinomectin

Για τις εκτροφές που δεν ισχύουν οι περιοριστικοί παράγοντες που αναφέραμε επάνω (A,B,C) η εκτροφή A παρουσίασε το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, κυρίως λόγω της πολύ μεγάλης υπολειμματικότητας που βρέθηκε αμέσως μετά τη χορήγηση του φαρμάκου (DAY 0) κάτι το οποίο δεν αναμένεται αφού το ενέσιμο φάρμακο χρειάζεται περίπου 2 ημέρες για να παρουσιάσει μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα και μετά να απεκκριθεί (Hamel *et al.*, 2017). Το γεγονός αυτό μπορεί και πάλι να υποδηλώνει ανακρίβειες σχετικά με την ημερομηνία χορήγησης του φαρμάκου ή υπερδοσολογία. Στη FARM C παρατηρούμε μικρότερη υπολειμματικότητα κάτι που είναι αναμενόμενο λόγω του ότι η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε ακριβώς τη μέρα χορήγησης ενώ ο αριθμός των αβγών των GINs δεν φαίνεται να αλλάζει, γεγονός το οποίο υποδηλώνει σωστή χρήση του φαρμάκου, εφ’όσον θεωρητικά το φάρμακο δεν θα έπρεπε να έχει προλάβει να δράσει. Αντίθετα στη FARM B υπάρχει αρκετά μεγάλη υπολειμματικότητα (μικρότερη από τη FARM A) γεγονός που επίσης μπορεί να υποδηλώνει λανθασμένη ημερομηνία χορήγησης του φαρμάκου.

Στις υπόλοιπες 4 εκτροφές παρ’όλο που δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τους λόγους που προαναφέρθηκαν φαίνεται να υπάρχει μία συσχέτιση. Η GR028 έχει μικρή υπολειμματικότητα τόσο του Fenbendazole όσο και

του Eprinomectin αλλά τεράστιο αριθμό αβγών κάτι που όπως προαναφέρθηκε μπορεί να υποδηλώνει την ύπαρξη ανθελμινθικοαντοχής. Η GR012 έχει μέτρια υπολειμματικότητα και μεγάλο αριθμό GINs, ενώ η GR013 εμφανίζει μία ασυνήθιστα μεγάλη υπολειμματικότητα σε σχέση με το χρόνο χορήγησης που μπορεί να υποδηλώνει υπερδοσολογία και λανθασμένη ημερομηνία χορήγησης ενώ σε συσχέτιση με τον αριθμό των αβγών έχει μηδενικό αριθμό. Η GR017 έχει μέτρια υπολειμματικότητα και μικρό αριθμό αβγών GINs.

4.2 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά από την παρούσα μελέτη θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι:

- Και τα 3 ανθελμινθικά εμφάνισαν ικανοποιητικά ποσοστά επιτυχίας και μικρή υπολειμματικότητα, ως επί το πλείστον, πράγμα που υποδηλώνει τη σωστή χρησιμοποίηση τους όσον αφορά τους κανόνες ασφαλείας που ακολουθούνται κατά τη χορήγηση των ανθελμινθικών φαρμάκων (δόση, χρόνος χορήγησης)
- Σε εκτροφές οι οποίες περιείχαν υψηλά επίπεδα υπολειμματικότητας τόσο της μητρικής ένωσης όσο και των μεταβολιτών της φαίνεται να μην ακολουθήθηκαν σωστά οι κανόνες ασφαλείας κατά τη χορήγηση των ανθελμινθικών. Γενικότερα, τα ανθελμινθικά χορηγούνται πριν τη γαλακτική περίοδο και απαγορεύεται να χορηγηθούν κατά τη διάρκεια αυτής (εξαιρείται το Eprinomectin). Υπάρχει μία περίπτωση οι παραγωγοί να μην ακολουθούν σωστά τους συγκεκριμένους κανόνες ασφαλείας και να χορηγούν φάρμακα μέσα στη γαλακτική περίοδο, αλλά να δίνουν ανακριβείς πληροφορίες σχετικά με τη χορήγηση τους. Επομένως, αυτή η μέθοδος αποτελεί μία αρκετά αξιόπιστη και φθηνή μέθοδος για τον έλεγχο της τήρησης των κανόνων ασφαλείας από τους παραγωγούς.
- Μία άλλη περίπτωση μη σωστής χρήσης των ανθελμινθικών είναι η υπερδοσολογία στα ζώα με αποτέλεσμα να υπάρχουν συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των ορίων που έχουν τεθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση τίθοντας σε κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών.
- Ως αποτέλεσμα της μη σωστής χρήσης σε μερικές εκτροφές φαίνεται τα παράσιτα να έχουν αναπτύξει κάποιου είδους ανθελμινθικοαντοχή, αφού ο αριθμός των GINs δε φαίνεται να επηρεάζεται από τη χορήγηση ή όχι του φαρμάκου.
- Σήμερα, δεν υπάρχουν κατάλληλοι έλεγχοι των τροφίμων έναντι των υπολειμμάτων των ανθελμινθικών φαρμάκων. Φαίνεται πως πλέον είναι

επιτακτική ανάγκη να δημιουργηθούν φορείς ελέγχου των τροφίμων για ανθελμινθικά φάρμακα, όπως γίνεται σε αντίστοιχη περίπτωση για τα αντιβιοτικά.

Περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να εστιάσουν στην ανάπτυξη φθηνών και γρήγορων μεθόδων ελέγχου ώστε να καταστεί δυνατός ο έλεγχος των τροφίμων για την υπολειμματικότητα των ανθελμινθικών στα τρόφιμα. Παράλληλα καθίσταται η ανάγκη αποτελεσματικής ενημέρωσης των παραγωγών ως προς τη χρήση των ανθελμινθικών και την επικινδυνότητά τους.



ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ

Στοιχεία εκτροφής

1. Εκτροφή (α/α) : _____
2. Ημερομηνία Καταγραφής : __/__/__
3. Ονοματεπώνυμο Ιδιοκτήτη : _____
4. Τοποθεσία (Χωριό/ Περιοχή/ Δήμος) : _____
5. Συντεταγμένες : _____

Χαρακτηριστικά Εκτροφής

6. Αριθμός προβάτων : _____
7. Αριθμός αιγών : _____
8. Φυλή προβάτων : _____

9. Φυλή αιγών : _____

Πρόληψη Ενδοπαρασιτώσεων

10. Γίνεται; Εάν ναι, ποια είναι η συχνότητα; _____

11. Πότε κάνετε θεραπεία;

☐ Πριν τον τοκετό

☐ Μόλις βοσκήσουν

☐ Άλλο _____

12. Σε ποια ζώα το δίνετε;

13. Σκεύασμα/τα που δώσατε τον/ους μήνα/ες που δηλώσατε.

14. Πώς υπολογίσατε τη δόση;

15. Εφαρμόζετε την ίδια πρακτική αν είναι μικτό το κοπάδι;

☐ Ναι

☐ Όχι

16. Αν εφαρμόζετε διαφορετική τακτική εξηγήστε:

Ανθελμινθικοαντοχή

17. Έχετε ενημερωθεί για την ανθελμινθικοαντοχή;

☐ Όχι

☐ Ναι

18. Ελέγξατε για ανθελμινθικοαντοχή το κοπάδι;

☐ Όχι

☐ Ναι

19. Είδατε βελτίωση μετά από τη χορήγηση ανθελμινθικής αγωγής ;

☐ Όχι

☐ Ναι

20. Αν όχι, πόσα ζώα είδαν βελτίωση;

21. Ποιο/α σκευάσματα χρησιμοποίησατε;

22. Αριθμός θεραπειών ανά ζώο στο έτος:

23. Αλλάζετε τα φάρμακα;

- ☐ Όχι
- ☐ Ναι

24. Ποια φάρμακα αλλάζετε;

25. Πότε αλλάζετε τα φάρμακα ;

26. Έχετε εντοπίσει ζώα που θέλουν παραπάνω από μία φορά θεραπεία;

- ☐ Όχι
- ☐ Ναι

27. Πως διαλέγετε τα ζώα για θεραπεία;

- ☐ Δεν διαλέγω
 - ☐ Διάρροια
 - ☐ Αδυναμία
 - ☐ Μειωμένη γαλακτοπαραγωγή
 - ☐ Καταρροή (μύξες)
 - ☐ Βήχας
 - ☐ Άλλο
-

28. Χορηγείτε την ίδια δόση σε πρόβατα και αίγες;

- ☐ Όχι
- ☐ Ναι

29. Εξηγήστε αν όχι.

Προβλήματα μαστού

30. Κλινικές μαστίτιδες εμφανίζονται κυρίως:

- ☐ Μετά τη 1^η γαλακτική περίοδο
- ☐ Κατά τη γαλουχία των αμνών/εριφίων
- ☐ Στην αρχή της γαλακτικής περιόδου
- ☐ Στο μέσο της γαλακτικής περιόδου
- ☐ Στο τέλος της γαλακτικής περιόδου
- ☐ Χαμηλής γαλ/γής ζώα
- ☐ Υψηλής γαλακτοπαραγωγής ζώα

31. Συνήθη συμπτώματα μαστίτιδας:

32. Είδος θεραπείας

- ☐ Μόνο ενδομαστικό σκεύασμα
- ☐ Μόνο συστηματική θεραπεία
- ☐ Συνδυασμό ενδομαστικής και συστηματικής θεραπείας
- ☐ Καμία-Αυτοϊάση

33. Πότε κάνατε τελευταία φορά θεραπεία; _____

34. Σκευάσματα: _____

35. Διάρκεια θεραπείας (ημέρες) : _____

Άλλες Θεραπείες

36. Έχει γίνει θεραπεία στα ζώα για κάποιο άλλο λόγο;

- ☐ Όχι
- ☐ Ναι

37. Αν ναι, πότε έγινε η θεραπεία και ποιο φάρμακο χρησιμοποιήσατε;

Παράρτημα 1: Ερωτηματολόγιο

5.Βιβλιογραφία

- Aarestrup, F. M. (2005) 'Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin', *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. doi: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto960401.x.
- Baoliang, P. *et al.* (2006) 'Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following subcutaneous administration to Lactating dairy cattle', *Veterinary Research Communications*, 30(3), pp. 263–270. doi: 10.1007/s11259-006-3230-7.
- Beynon, S. A. (2012) 'Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep', *Veterinary Parasitology*. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.040.
- Bousquet-Mélou, A. *et al.* (2011) 'Licking behaviour induces partial anthelmintic efficacy of ivermectin pour-on formulation in untreated cattle', *International Journal for Parasitology*. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.12.007.
- Briqué-Pellet, C. *et al.* (2017) 'Pharmacokinetics and anthelmintic efficacy of injectable eprinomectin in goats', *Veterinary Parasitology*. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.05.021.
- Capece, B. P. S. *et al.* (2009) 'Effect of age and gender in the pharmacokinetics of albendazole and albendazole sulphoxide enantiomers in goats', *Research in Veterinary Science*. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.08.002.
- Cooper, J. and Dobson, H. (2007) 'The benefits of pesticides to mankind and the environment', *Crop Protection*. doi: 10.1016/j.cropro.2007.03.022.
- Danaher, M. *et al.* (2007) 'Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices', *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 845(1), pp. 1–37. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.07.046.
- Delatour, P. *et al.* (1990) 'Pharmacokinetics in sheep and cattle of albendazole administered by an intraruminal slow release capsule', *Research in Veterinary Science*.
- Dogra, N., Kumar, A. and Mukhopadhyay, T. (2018) 'Fenbendazole acts as a moderate microtubule destabilizing agent and causes cancer cell death by modulating multiple cellular pathways', *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41598-018-30158-6.
- Floate, K. D. (2006) 'Endectocide use in cattle and fecal residues: Environmental effects in Canada', *Canadian Journal of Veterinary Research*.
- De Graef, J., Claerebout, E. and Geldhof, P. (2013) 'Anthelmintic resistance of gastrointestinal cattle nematodes', *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 82(3), pp. 113–123.
- Grønvold, J. *et al.* (2004) 'Effect of the antiparasitic drugs fenbendazole and ivermectin on the soil nematode *Pristionchus maupasi*', *Veterinary Parasitology*,

124(1–2), pp. 91–99. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.06.003.

Gyurik, R. J., Chow, A. W. and Zaber, B. (1981) 'Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats, and mice', *Drug Metabolism and Disposition*.

Hamel, D. *et al.* (2017) 'Eprinomectin pour-on (EPRINEX® Pour-on, Merial): Efficacy against gastrointestinal and pulmonary nematodes and pharmacokinetics in sheep', *BMC Veterinary Research*. doi: 10.1186/s12917-017-1075-7.

HENNESSY, D. R. *et al.* (1993) 'Comparative kinetic disposition of oxfendazole in sheep and goats before and during infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. doi: 10.1111/j.1365-2885.1993.tb00171.x.

Higa, F. *et al.* (1992) 'Cytotoxicity of mebendazole against established cell lines from the human, rat, and mouse liver', *Archives of Toxicology*. doi: 10.1007/BF01974020.

Horvat, A. J. M. *et al.* (2012) 'Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. doi: 10.1016/j.trac.2011.06.023.

Hoste, H., Sotiraki, S. and Torres-Acosta, J. F. de J. (2011) 'Control of Endoparasitic Nematode Infections in Goats', *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 27(1), pp. 163–173. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.10.008.

Jiang, H. *et al.* (2005) 'Residue depletion of eprinomectin in bovine tissues after subcutaneous administration', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), pp. 9288–9292. doi: 10.1021/jf0515779.

Kaplan, R. M. and Vidyashankar, A. N. (2012) 'An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance', *Veterinary Parasitology*. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.048.

Koelle, K., Pascual, M. and Yunus, M. (2005) 'Pathogen adaptation to seasonal forcing and climate change', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. doi: 10.1098/rspb.2004.3043.

Kreuzig, R., Blümlein, K. and Hölte, S. (2007) 'Fate of the benzimidazole antiparasitics flubendazole and fenbendazole in manure and manured soils', *Clean - Soil, Air, Water*. doi: 10.1002/clen.200720023.

Křížová-Forstová, V. *et al.* (2011) 'Factors affecting pharmacokinetics of benzimidazole anthelmintics in food-producing animals: The consequences and potential risks', *Research in Veterinary Science*. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.12.013.

Litskas, V. D. *et al.* (2013) 'Are the parasitocidal avermectins resistant to dissipation in the environment? The case of eprinomectin', *Environment International*. Elsevier Ltd, 60, pp. 48–55. doi: 10.1016/j.envint.2013.07.017.

Ljubar, D. *et al.* (2018) 'Albendazole Degradation Possibilities by UV-Based Advanced Oxidation Processes', *International Journal of Photoenergy*, 2018. doi: 10.1155/2018/6181747.

Martin, D. F., Ward, D. R. and Martin, B. B. (2011) 'AGRICULTURAL

PHARMACEUTICALS IN THE ENVIRONMENT: A NEED FOR INVENTIVENESS', *Technology & Innovation*. doi: 10.3727/194982410x12858510212287.

Moreno, L. *et al.* (2012) 'A high oxfendazole dose to control porcine cysticercosis: Pharmacokinetics and tissue residue profiles', *Food and Chemical Toxicology*. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.023.

Morgan, E. R. *et al.* (2019) '100 Questions in Livestock Helminthology Research', *Trends in Parasitology*. doi: 10.1016/j.pt.2018.10.006.

Mutavdžić Pavlović, D. *et al.* (2018) 'Sorption of albendazole in sediments and soils: Isotherms and kinetics', *Chemosphere*, 193, pp. 635–644. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.025.

Ngomuo, A. J. *et al.* (1984) 'larvae', 8, pp. 187–193.

Prchal, L. *et al.* (2016) 'Albendazole in environment: faecal concentrations in lambs and impact on lower development stages of helminths and seed germination', *Environmental Science and Pollution Research*. doi: 10.1007/s11356-016-6472-0.

Raynaud, J. P. (1970) 'Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins.', *Annales de parasitologie humaine et comparée*. doi: 10.1051/parasite/1970453321.

'Residues of some veterinary drugs in animals and foods' (1988) *FAO FOOD NUTR. PAP.*

Romero-González, R., Garrido Frenich, A. and Martínez Vidal, J. L. (2013) 'Veterinary Drugs Residues: Anthelmintics', *Encyclopedia of Food Safety*, 3, pp. 45–54. doi: 10.1016/B978-0-12-378612-8.00243-2.

Sangster, N. C. *et al.* (1991) 'Disposition of oxfendazole in goats and efficacy compared with sheep', *Research in Veterinary Science*. doi: 10.1016/0034-5288(91)90074-X.

Sommer, C. and Bibby, B. M. (2002) 'The influence of veterinary medicines on the decomposition of dung organic matter in soil', *European Journal of Soil Biology*. doi: 10.1016/S1164-5563(02)01138-X.

Toutain, P. L., Ferran, A. and Bousquet-Mélou, A. (2010) 'Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics', *Handbook of Experimental Pharmacology*. doi: 10.1007/978-3-642-10324-7_2.

Tsiboukis, D. *et al.* (2013) 'Anthelmintics residues in raw milk. Assessing intake by a children population', *Polish Journal of Veterinary Sciences*. doi: 10.2478/pjvs-2013-0012.

Virkel, G. *et al.* (2004) 'Comparative hepatic and extrahepatic enantioselective sulfoxidation of albendazole and fenbendazole in sheep and cattle', *Drug Metabolism and Disposition*. doi: 10.1124/dmd.32.5.536.

Wolstenholme, A. J. (2012) 'Glutamate-gated chloride channels', *Journal of*

Biological Chemistry, 287(48), pp. 40232–40238. doi: 10.1074/jbc.R112.406280.

Σαράτση Κ. (2016). ‘In vitro μελέτη ανθελμινθικής δράσης φυτικών ειδών, έναντι στα γαστρεντερικά παράσιτα των προβάτων’, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Γεωπονίας, Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Τμήμα Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος