



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Συμβολή της Μεσογειακής χλωρίδας στην προστασία των μικρών
μηρυκαστικών έναντι των γαστρεντερικών παρασίτων

Αικατερίνη Αν. Σαράτση

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ιωάννης Χατζηγεωργίου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ιωάννης Χατζηγεωργίου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Σμαράγδα Σωτηράκη, Διευθύντρια Ερευνών ΙΚΕ - ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ

Γεώργιος Ζέρβας, Καθηγητής ΓΠΑ

Αθανάσιος Γελασάκης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

(Αντικατάσταση του Καθηγητή ΓΠΑ Γεωργίου Ζέρβα, από τον Επίκουρο Καθηγητή ΓΠΑ
Αθανάσιο Γελασάκη, με βάση απόφαση της Συνέλευσης του Τμήματος ΕΖΠ)

**ΑΘΗΝΑ
2021**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

Διδακτορική Διατριβή

Συμβολή της Μεσογειακής χλωρίδας στην προστασία των μικρών
μηρυκαστικών έναντι των γαστρεντερικών παρασίτων

“Contribution of Mediterranean flora against gastrointestinal nematodes in small
ruminants”

Αικατερίνη Αν. Σαράτση

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ιωάννης Χατζηγεωργίου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σμαράγδα Σωτηράκη, Διευθύντρια Ερευνών ΙΚΕ - ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ

Αθανάσιος Γελασάκης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Σέρκο Χαρουτουιάν, Καθηγητής ΓΠΑ

Ευάγγελος Ζωίδης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Ζωή Παρίση, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΑΠΘ

Herve Hoste, Διευθυντής Ερευνών INRAE/ENVT

Συμβολή της Μεσογειακής χλωρίδας στην προστασία των μικρών μηρυκαστικών έναντι των γαστρεντερικών παρασίτων

Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής

Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα τόσο στη χώρα μας, όσο και παγκοσμίως, είναι η μόλυνση των μικρών μηρυκαστικών από γαστρεντερικά νηματώδη παράσιτα της οικογένειας Trichostrongylidae. Αυτό γιατί η συχνότητα εμφάνισης αυτών, σε συνδυασμό με την εκτεταμένη εξάπλωση τους απειλούν την υγεία και την ευζωία των ζώων και μειώνουν την ποσότητα και την ποιότητα των παραγόμενων ζωικών προϊόντων, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του αγροτικού εισοδήματος των κτηνοτρόφων. Σε συστήματα εκτροφής που βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στη βόσκηση, όπως τα ημικτακτικά και τα ημιεντακτικά που επικρατούν στη χώρα μας, η μόλυνση των ζώων από γαστρεντερικά νηματώδη παράσιτα θεωρείται δεδομένη. Μέχρι σήμερα, η αντιμετώπιση των γαστρεντερικών νηματωδών γίνονταν τόσο προληπτικά, όσο και θεραπευτικά με τη χρήση ανθελμινθικών φαρμάκων ευρέως φάσματος, πρακτική που αποδείχθηκε αποτελεσματική, ασφαλής και οικονομικά αποδοτική. Όμως η εμφάνιση και η συχνότητα ανάπτυξης στελεχών των παρασίτων ανθεκτικών στα φάρμακα, φαινόμενο γνωστό με τον όρο «ανθελμινθικοαντοχή», σε συνδυασμό με την ανησυχία των καταναλωτών για υπολείμματα φαρμάκων στα παραγόμενα προϊόντα και το περιβάλλον, οδήγησε στην αναζήτηση εναλλακτικών/συμπληρωματικών τρόπων αντιμετώπισης των παρασιτώσεων. Σήμερα η χρήση βιοενεργών φυτών, δηλαδή φυτών πλούσιων σε δευτερογενείς μεταβολίτες με ανθελμινθική δράση αποτελεί αντικείμενο ερευνητικής δραστηριότητας, που συνάδει και με την πολιτική της ΕΕ για πράσινη ανάπτυξη. Από τα φυτά αυτά, ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν αυτά που όχι μόνο εμφανίζουν ανθελμινθική δράση, αλλά συνεισφέρουν και σαν συστατικά της διατροφής των μικρών μηρυκαστικών, γνωστά με τον αγγλικό όρο «nutraceuticals». Σε ότι αφορά τους δευτερογενείς μεταβολίτες, η μελέτη της ομάδας των συμπυκνωμένων ταννινών των φυτών (CT) με πιθανή δράση έναντι των γαστρεντερικών νηματωδών, συνιστά μέχρι σήμερα ελκυστική προσέγγιση επίλυσης του προβλήματος. Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση και αξιολόγηση της πιθανής ανθελμινθικής δράσης φυτικών ειδών της χώρας μας, που είναι πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες, έναντι των γαστρεντερικών παρασίτων των προβάτων και αποτελούν συγχρόνως και συστατικά διατροφής των μικρών μηρυκαστικών. Για το σκοπό αυτό, αρχικά διερευνήθηκε και αξιολογήθηκε η ανθελμινθική δράση 31 φυτικών εκχυλισμάτων σε *in vitro* δοκιμές. Αλκοολούχα εκχυλίσματα των ειδών αυτών ελέγχθηκαν με τη Δοκιμή της Έκδυσης των Προνομφών (Larval Exsheathment Inhibition Assay/LEIA) σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις (150-1.200μg/mL), για την ανθελμινθική τους δράση έναντι των γαστρεντερικών νηματωδών *Haemonchus contortus* και *Trichostrongylus colubriformis*. Στη συνέχεια, με βάση τα αποτελέσματα της δοκιμής αυτής, υπολογίστηκε η μέση αποτελεσματική δόση (EC₅₀), ενάντια στα δύο είδη παρασίτων. Συνοπτικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι εκχυλίσματα της νωπής πούλπας *Olea europaea* και του υπέργειου τμήματος του φυτού *Aremonia agrimonoides*, εμφάνισαν ανθελμινθική δράση, αλλά μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση των εκχυλίσματος (1.200μg/mL). Τα εκχυλίσματα από τα υπέργεια τμήματα των φυτικών ειδών *Pyrus spinosa* και *Potentilla haynaldiana* παρουσίασαν αντίστοιχη δράση τόσο στη συγκέντρωση των 1.200μg/mL, αλλά και σε αυτή των 600μg/mL εκχυλίσματος. Η ονοβρυχίδα *Onobrychis peloponnesiaca* παρουσίασε δοσοεξαρτώμενη ανθελμινθική δράση ενάντια και στα δύο είδη παρασίτων, ενώ η *On. alba laconica* μόνο έναντι του *H. contortus*. Το μοναδικό φυτικό είδος που εμφάνισε ανθελμινθική δράση έναντι του *H. contortus*, αλλά όχι έναντι του *Tr. colubriformis*, ήταν αυτό του υπέργειου τμήματος του είδους *Alchemilla bulgarica*. Στα εκχυλίσματα όλων των υπό μελέτη φυτών έγινε χημική ανάλυση με έμφαση τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων (μέτρηση των ολικών πολυφαινολών (TPC), των ολικών φλαβονοειδών (TFC) και των επιμέρους πολυφαινολών), όπου και περιεγράφηκε το

προφίλ των δευτερογενών αυτών μεταβολιτών. Επειδή αρκετά από τα υπό δοκιμή φυτά παρουσίασαν ανθελμινθική δράση, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε η στερεοχημική ανάλυση των δευτερογενών μεταβολιτών, σχετικά με το είδος και τη στερεοδομή τους και η συσχέτισή τους με τη δράση ενάντια στα παράσιτα. Για την περαιτέρω αξιολόγηση της ανθελμινθικής δράσης των βιοενεργών φυτών σε συνθήκες εκτροφής, διενεργήθηκαν πειραματισμοί σε *in vivo* συνθήκες. Για το σκοπό, αυτό επιλέχθηκαν 2 φυτά, οι καρποί της χαρουπιάς (*Ceratonia siliqua*) και η ονοβρυχίδα (*Onobrychis viciifolia*). Σχεδιάστηκαν και πραγματοποιήθηκαν 3 *in vivo* πειραματισμοί, όπου τα παραπάνω φυτά ενσωματώθηκαν στα σιτηρέσια αρνιών 6 μηνών, πειραματικά μολυσμένων με τα νηματώδη *H. contortus* και *Tr. colubriformis*. Στόχος των πειραματισμών αυτών ήταν να διερευνηθεί το αν και κατά πόσο η συμμετοχή των φυτικών αυτών ειδών στα σιτηρέσια των προβάτων, μπορεί να αντιμετωπίσει τις μολύνσεις από γαστρεντερικά νηματώδη και να επιλεγεί ο πιο αποτελεσματικότερος τρόπος χορήγησης τους π.χ. μεμονωμένα ή σε συνδυασμό και σε επιθυμητή συγκέντρωση. Συγκεκριμένα, στο **Πείραμα 1** διερευνήθηκε η ανθελμινθική δράση των καρπών της χαρουπιάς σε διάφορες συγκεντρώσεις, έτσι ώστε να επιλεγεί η πιο αποτελεσματική. Στον πειραματισμό αυτό συμμετείχαν 35 ζώα (5 ομάδες των 7), στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο με προσθήκη χαρουπάλευρου (CaBP) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0%, 3%, 6% και 12% g CaBP/100g συνολικού σιτηρεσίου). Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση στις μέσες τιμές FEC (αυγά / g κοπράνων) και των AWC (ενήλικα παράσιτα), μόνο για τα ζώα της ομάδας όπου χορηγήθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση CaBP, που όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Όμως ήταν θετικό, που βρέθηκε αρνητική συσχέτιση της μείωσης του ποσοστού ωοτοκίας των θηλυκών παρασίτων, σε σχέση με τη συγκέντρωση CaBP στο σιτηρέσιο, υποδηλώνοντας δόσοεξαρτώμενη δράση. Δεδομένου ότι τα παράσιτα του είδους *H. contortus* σημειώνουν ιδιαίτερα υψηλή ημερήσια παραγωγή αυγών σε σύγκριση με του *Tr. colubriformis*, η μείωση των FEC οφείλεται κυρίως στην επίδραση του χαρουπιού στα παράσιτα του είδους *H. contortus*. Στη συνέχεια με στόχο να διερευνηθεί το αν η ανθελμινθική δράση του χαρουπιού (όπως αποδείχτηκε στο Πείραμα 1), οφείλεται στις περιεχόμενες ταννίνες του, σχεδιάστηκε το **Πείραμα 2**. Στην περίπτωση αυτή, τα ζώα διατρέφονταν με σιτηρέσιο πλούσιο ή μη σε χαρουπάλευρο και η δράση των ταννινών αξιολογήθηκε μετά από την προσθήκη ενός αναστολέα της δράσης των ταννινών και συγκεκριμένα της πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG). Συγκεκριμένα, στον πειραματισμό συμμετείχαν 24 αρνιά χωρισμένα σε 4 ομάδες, σε δύο από τις οποίες χορηγήθηκε CaBP ως συμπλήρωμα στην μέγιστη συγκέντρωση 12% του συνολικού σιτηρεσίου με PEG (CaBP και CaBP+PEG), ενώ στις υπόλοιπες 2 χορηγήθηκε τυπική διατροφή φτωχή σε ταννίνες επίσης με, ή χωρίς την προσθήκη PEG (Control/C και C+PEG). Τα αποτελέσματα, επιβεβαίωσαν τη δράση του χαρουπιού στα FEC, τα οποία εμφάνισαν μειώσεις 20% έως 45%, σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου. Οι εν λόγω μειώσεις παρατηρήθηκαν στο είδος *H. contortus* (μείωση αριθμού παραγωγής αυγών για ένα πολύ παραγωγικό είδος), αλλά όχι στο *Tr. colubriformis*. Η ανθελμινθική δράση του CaBP αποδόθηκε στις CT, καθότι η επίδραση του χαρουπιού στα FEC και τα ενήλικα *H. contortus* αναστέλλονταν στις ομάδες ελέγχου (C, C+PEG, CaBP+PEG). Καμία επίδραση του CaBP δεν υπήρξε στην ωοτοκία των θηλυκών παρασίτων. Τέλος, στο **Πείραμα 3**, εξετάστηκαν οι υποθέσεις εάν α) οι CT του CaBP παρουσιάζουν ισχυρότερη ανθελμινθική δράση από αυτές της ονοβρυχίδας (*O. viciifolia*) και β) είναι πιθανή η συνεργιστική δράση μεταξύ των παραπάνω φυτικών ειδών. Συγκεκριμένα, στον πειραματισμό συμμετείχαν 24 αρνιά χωρισμένα σε 4 ομάδες, στις οποίες χορηγήθηκε α) χαρουπάλευρο (CaBP), β) pellets ονοβρυχίδας (S) γ) συνδυασμός χαρουπάλευρου και pellets ονοβρυχίδας (CaBP+S) και δ) διατροφή με βάση τη μηδική / μάρτυρας (C). Το χαρουπάλευρο χορηγήθηκε ως συμπλήρωμα, σε ποσοστό 12% του συνολικού σιτηρεσίου, ενώ η ονοβρυχίδα ως pellet, που αντιπροσώπευε το 35% του συνολικού σιτηρεσίου. Τα αποτελέσματα του εν λόγω πειραματισμού, έδειξαν ότι υπήρχε τάση μείωσης των FEC στις ομάδες S και CaBP+S, σε σύγκριση με τις ομάδες C και CaBP, ενώ ο αριθμός των ενηλικών παρασίτων (AWC) του *H. contortus* εμφανίστηκε μειωμένος στις ομάδες CaBP, S, και CaBP+S, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου με αντίστοιχα ποσοστά μείωσης 35,5%, 62,1% και 53,5%, χωρίς όμως οι

διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές. Η ωτοκία και των δύο ειδών παρασίτων, στις ομάδες CaBP, S και CaBP+S εμφανίστηκε σημαντικά μειωμένη σε σχέση με αυτή των μαρτύρων, γεγονός που εξηγεί ως ένα σημείο και τη μείωση των FEC που παρατηρήθηκε, δεδομένου ότι οι πληθυσμοί των ενήλικων παρασίτων δεν επηρεάστηκαν σε μεγάλο βαθμό. Αν και τα αποτελέσματα του πειραματισμού επιβεβαίωσαν την υπόθεση ότι οι ταννίνες του χαρουπιού παρουσιάζουν ανθελμινθική δράση, δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις συνεργιστικής επίδρασης με την ονοβρυχίδα. Τέλος, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση και η σύσταση των ταννινών, του χαρουπιού και της ονοβρυχίδας, με δυο διαφορετικούς τρόπους ανάλυσης α) με τη χρήση acetone-butanol-HCl assay και β) πραγματοποιώντας θειολυτική αποικοδόμηση (thiolytic degradation with benzylmercaptan). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι οι CT του χαρουπιού που έχουν υψηλό λόγο προδελφινιδίνες / προκυανιδίνες (96,7% προδελφινιδίνες / 3,3% προκυανιδίνες), και ταυτόχρονα υψηλό βαθμό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (π.χ. 41,1% των υπομονάδων της φλαβαν-3όλης είναι εστεροποιημένες), δεν παρουσίασαν ισχυρότερη ανθελμινθική δράση από την ονοβρυχίδα, της οποίας οι συμπτωκωμένες ταννίνες έχουν λιγότερες προδελφινιδίνες (74,8%), που μάλιστα δεν είναι και εστεροποιημένες. Σε όλη τη διάρκεια και των 3 πειραματισμών πραγματοποιούνταν ανά τακτά διαστήματα παθοφυσιολογικές εξετάσεις (μετρήσεις αιματοκρίτη και σωματικού βάρους), τα αποτελέσματα των οποίων δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες πειραματισμού. Συμπερασματικά, στην παρούσα διατριβή επιβεβαιώνεται ότι διάφορα φυτικά είδη παρουσιάζουν ανθελμινθική δράση και μάλιστα φαίνεται ότι οι συμπτωκωμένες ταννίνες ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για αυτήν την δράση, έναντι των γαστρεντερικών νηματώδων των μικρών μηρυκαστικών. Σε διερεύνηση που έγινε σε φυτικά είδη που απαντώνται συχνά στη Μεσόγειο, φάνηκε ότι υπάρχουν αρκετά φυτά που παρουσιάζουν τέτοιες ιδιότητες και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Οι μελέτες χορήγησης καρπών χαρουπιάς και ονοβρυχίδας σε αρνιά έδειξαν ότι υπάρχει δυνατότητα μείωσης του αριθμού των αυγών των παρασίτων που εκκρίνονται με τα κόπρανα και κατά συνέπεια μείωση της έντασης της μόλυνσης των λιβαδιών. Σε ότι αφορά τον μηχανισμό δράσης των ταννινών ενάντια στα γαστρεντερικά νηματώδη, η φύση αλλά και η στερεοδομή των ταννινών πιθανά να συσχετίζονται με την ανθελμινθική δράση. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής θα ήταν επιθυμητό να επιβεβαιωθούν και σε πειραματισμούς σε συνθήκες εκτροφής και σε ζώα φυσικώς μολυσμένα από γαστρεντερικά νηματώδη.

Επιστημονική περιοχή: Διατροφή παραγωγικών ζώων

Λέξεις κλειδιά: βιοδραστικές ενώσεις, γαστρεντερικά νηματώδη, μικρά μηρυκαστικά, χαρούπι, ονοβρυχίδα

Contribution of Mediterranean flora against gastrointestinal nematodes in small ruminants

Department of Animal Science

Laboratory of Nutritional Physiology & Feeding

ABSTRACT

Worldwide, gastrointestinal nematode (GIN) infections remain a serious threat for grazing ruminants, as they affect both their health and welfare, causing anorexia, impaired digestion and nutrient absorption with related production losses, diarrhoea, anaemia and even death. Up to now, the control of these parasites relies on repeated treatments with commercial anthelmintic drugs. However, the development and expansion of anthelmintic resistance in worm populations against one or multiple classes of has become a global threat for effective parasite control and productive livestock farming. At the same time the increasing concern of consumers about the presence of drug residues in foods and in the environment have stimulated the search for alternative or complementary solutions within the context of organic farming and sustainable agriculture. Among these alternative solutions, there are considerable and expanding interest in the search for effective plant extracts and plant-derived active components, with anthelmintic properties, strategy that is completely in line with the new priorities set by EU in the new CAP and the Green Deal. From the above bioactive plants, the most interesting ones are those which called nutraceuticals, i.e. plants which represent feed sources with extra health benefits in addition to the basic nutritional value for the animals. Regarding the active components, research results so far suggest that condensed tannins (CTs) represent the most effective plant secondary metabolites against GIN infections of ruminants. The general objective of the current study was to explore the possible anthelmintic effect of CT-rich plants, which at the same time can be food ingredients of small ruminants, against GINs in sheep breeding in Mediterranean conditions. The *in vitro* anthelmintic effect of 31 plant extracts from tannin rich Mediterranean plants was screened against two species gastrointestinal parasites (*Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*) of sheep. Namely, alcoholic extracts of the above plant species were tested against third stage larvae (which produced from faeces from donor sheep, monospecifically infected) of both *H. contortus* and *Tr. colubriformis* by using the Larval Exsheathment Inhibition Assay, at different extract concentration (150/300/600/1200µg/mL PBS). EC₅₀-values (half maximal effective concentration) were estimated also. According to the results, the extracts of aerial *Aremonia agrimonoides* and semi-dry pulp of *Olea europaea* showed a high anthelmintic effect, but only at the highest concentration of extract 1200µg/mL, while aerial *Pyrus spinosa* and *Potentilla haynaldiana* had a similar antiparasitic activity at 1200 and 600µg/mL. *Onobrychis peloponnesiaca* showed a similar high and dose-dependent effect for both parasites at the 3 highest concentration (1200/600/300µg/mL), while *On. alba laconica* extract proved to be more effective against L₃ of *H. contortus* than *Tr. colubriformis*. Finally, aerial *Alchemilla bulgarica* was the only one plant extract, which proved to be more effective against L₃ of *Tr. colubriformis*. Chemical analysis of all extracts was performed, specifically as concerns the determination of phenolic compounds (total polyphenols/TPC, total flavonoids/TFC and other phenolic compounds), and the profile of their secondary metabolites was described. Further research on the stereochemistry (type and stereostructure) of secondary metabolites would be very interesting, because several of the above plants showed anthelmintic activity. In order to evaluate the anthelmintic effect of the bioactive plants, under breeding conditions, three independent *in vivo* trials tested whether i) carob pod (CaBP)-containing feed had an anthelmintic effect and if yes, which was the optimal concentration in the diet; ii) whether this effect could be attributed to tannins through the polyethylene glycol (PEG) test and iii) whether there were any synergistic effects when combined with another tannin-containing feed (e.g. sainfoin). In all trials 6-month-old nematode-naive lambs, experimentally infected with both *H. contortus* and *Tr. colubriformis*, were used. Faecal egg counts (FEC) were performed regularly

and at the end of each trial adult worm counts (AWC) and female worm fecundity were recorded. In **Trial 1**, 35 lambs (five groups of seven lambs) were fed different CaBP concentrations ranging from 0% to 12 % w/w. FEC declined up to 39.2 % only in the group fed with 12 % CaBP, while a declining trend ($P = 0.058$) was demonstrated for the AWC of *Tr. colubriformis*, which was associated with the increasing concentration of CaBP in feed. Female worm fecundity was reduced in groups fed CaBP for both parasites, however this was only significant for *H. contortus* ($P < 0.05$), in a dose dependent manner. In **Trial 2**, four groups of six infected lambs each were used, which received the carob diets CaBP or CaBP + PEG, and the tannin-free diets with or without PEG (C or C + PEG). Results showed that FEC of Groups C, C + PEG, and CaBP + PEG were comparable throughout the trial, while the group receiving only CaBP showed lower FEC from DAY 25 onwards. AWC showed a reduction (67.7 %) only for *H. contortus* ($P < 0.05$). Reversal of the anthelmintic effect of CaBP after PEG administration suggested that CT contributed to the anthelmintic action. However, no effect of CaBP was observed on *Tr. colubriformis* AWC and on female worm fecundity for both species. Finally, for **Trial 3** four groups of six lambs each received a diet based on CaBP, sainfoin (S) or a combination (CaBP + S) and were compared to a control (C) diet of lucerne. On DAY 37 FEC values in groups CaBP + S and S tended to be lower compared to the two other groups (C, CaBP), while for AWCs no significant differences were observed for both parasites. The fecundity of *H. contortus* and *Tr. colubriformis* demonstrated significant differences ($P < 0.05$) between the treated and control groups, with lower values in the animals receiving CaBP + S. Overall, the results supported the hypothesis that carob had an anthelmintic effect due to its CT, but there was no clear indication of a synergistic effect with sainfoin. In conclusion, the results of this PhD thesis confirmed that several plants, commonly found in the Mediterranean region are rich in active secondary metabolites showing anthelmintic effect against GINs of small ruminants. This effect, as recorded in *in vitro* studies its worth to be further investigated. In addition, when selected plants fed to sheep it has been shown that: i) their consumption can modulate the biology of GINs *in vivo* as well; ii) the CT seem to be mainly involved in the anthelmintic effects (e.g., as it has been demonstrated for carob); iii) the concentration in the feed of those resources influenced the anthelmintic effects and iv) different mechanisms appeared to affect their activity. Precisely, the reduction of FECs recorded in the *in vivo* trial could be either attributed to a reduced fecundity of female adult worms (see Trial 1 and 3) and /or to a reduction of the number of the adult worms in the gut (see Trial 2). In future studies, the results of the current thesis should be further confirmed on studies conducted in on-farm conditions enrolling animals naturally infected with GINs.

Scientific area: Livestock nutrition

Keywords: bioactive compounds gastrointestinal nematodes, small ruminants, carob, sainfoin

Στη μνήμη του πατέρα μου

Στη μητέρα μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ο σχεδιασμός, η εκπόνηση και η ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν χάρη στη συνεργασία του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με το Εργαστήριο Παρασιτολογίας του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ. Στο πλαίσιο αυτό είχα την ευτυχία να συνεργαστώ με εξάίρετους ανθρώπους και επιστήμονες, για τους οποίους αισθάνομαι ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη. Θα ήθελα λοιπόν, να εκφράσω τις ολόψυχες ευχαριστίες μου προς:

Τον Επιβλέποντα της Διδακτορικής μου διατριβής Αναπληρωτή Καθηγητή του Γ.Π.Α., Ιωάννη Χατζηγεωργίου, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ξεκινήσω αυτό το ταξίδι, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοριστική συμβολή και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του, όλα αυτά τα χρόνια.

Την κτηνίατρο Διευθύντρια Ερευνών του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ Δρ. Σμαράγδα Σωτηράκη, για τη συνεχή καθοδήγηση, την πολύτιμη συνεργασία της, τη χρηματοδότηση των πειραμάτων μέσω ερευνητικών προγραμμάτων (LowInputBreeds FP7 – EU project και CARES-ERANet), την επιπλέον ενασχόληση μου στο Εργαστήριο Παρασιτολογίας του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών και τη συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια της πορείας μου.

Τον κτηνίατρο Επίκουρο Καθηγητή του Γ.Π.Α. Αθανάσιο Γελασάκη, μέλος της Συμβουλευτικής μου Επιτροπής, για τις συμβουλές, τις παρατηρήσεις και τη σημαντική συμβολή του κατά τη συγγραφή του κειμένου της παρούσας διατριβής.

Τον Καθηγητή του Γ.Π.Α. Σέρκο Χαρουτουγιάν, για την υποστήριξή του σε ό,τι αφορά την ανεύρεση των φυτικών ειδών, τη χημική ανάλυση των εκχυλισμάτων και τη συμβολή του στη συγγραφή των *in vitro* πειραματισμών. Η ανιδιοτελής και ευγενική στήριξή του μαζί με τις πολύτιμες γνώσεις του στη Χημεία, πρόσθεσε ιδιαίτερη αξία στην παρούσα διατριβή.

Τον Dr. Herve Hoste, Διευθυντή Ερευνών του INRA και επιστημονικό συνεργάτη των ερευνητικών προγραμμάτων LowInputBreeds FP7 – EU project και CARES-ERANet, για τη συμβολή του κατά τη διάρκεια του σχεδιασμού και της υλοποίησης των *in vivo* πειραματισμών και τη βοήθειά του κατά τη συγγραφή της δημοσίευσης στο περιοδικό *Veterinary Parasitology*.

Τον κτηνίατρο Δρ. Αλέξανδρο Στεφανάκη, επιστημονικό συνεργάτη του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, για την υποστήριξη σε ό,τι αφορά τους *in vivo* πειραματισμούς που πραγματοποιήθηκαν στην Κρήτη και τις συμβουλές του καθόλη τη διάρκεια της διατριβής.

Την Καθηγήτρια του University of Reading Irene Mueller-Harvey, για τη συμβολή της στη χημική ανάλυση των καρπών χαρουπιού και pellets ονοβρυχίδας των *in vivo* πειραματισμών, καθώς και για τη συμβολή της κατά τη συγγραφή της δημοσίευσης.

Τον Καθηγητή του University of Copenhagen Stig Milan Thamsborg, για τις επικοινωνιακές παρατηρήσεις και προτάσεις του κατά τη συγγραφή της εργασίας των *in vivo* πειραματισμών.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Α.Π.Θ Ζωή Παρίση, καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή του Γ.Π.Α. Ευάγγελο Ζωΐδη για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους στο τελικό κείμενο της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς, όλη την ομάδα του Εργαστηρίου Παρασιτολογίας της Δρ. Σμαράγδας Σωτηράκη (Ι.Κ.Ε. – ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ) και συγκεκριμένα τους Δρ. Βουτζουράκη Νικόλαο και Δρ. Τζανιδάκη Νικόλαο για τη βοήθειά τους κατά τη συλλογή των δειγμάτων των *in vivo* πειραματισμών στην Κρήτη, όπως επίσης και τους Δρ. Αναστάσιο Σαράτση, Δρ. Βάγια Καντζούρα, Δρ. Παναγιώτα Λίγδα, Δρ. Κωστοπούλου Δέσποινα, Γιώργο Πάντσιο και Δρ. Σοφία Αναστασιάδου, γιατί βοήθησαν ο κάθε ένας με τον τρόπο του, ώστε το ταξίδι αυτό να το θυμάμαι με Αγάπη.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

Saratsi, K., Hoste, H., Voutzourakis, N., Tzanidakis, N., Stefanakis, A., Thamsborg, S.M., Mueller-Harvey, I., Hadjigeorgiou I., Sotiraki, S. 2020. Feeding of carob (*Ceratonia siliqua*) to sheep infected with gastrointestinal nematodes reduces faecal egg counts and worm fecundity. *Veterinary Parasitology* 284:109200 doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109200

ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- “*The contribution of Mediterranean flora in protecting small ruminants against endoparasites*”, **Saratsi K.**, Hadjigeorgiou I., Sotiraki, S., What is going on in the FAO-CIHEAM Mediterranean Pastures & Forages sub-network in 2021? Webinar, 3 June, 2021 (poster)
- “*Antiparasitic activity of tannin-rich Mediterranean plants against sheep gastrointestinal nematodes – in vitro studies*”, **Saratsi K.**, Parissi Z., Hadjigeorgiou I., Haroutounian S.A., Hoste H., Sotiraki S., 2nd COMBAR Working Groups Meeting “Anthelmintic resistance: past, present and future”, 26-27 September 2018, Leon, Spain (poster)
- “*Antiparasitic activity of tannin-rich Mediterranean plants against sheep gastrointestinal nematodes: in-vitro studies*”, **Saratsi K.**, Parissi Z., Hadjigeorgiou I., Sotiraki S., AgroEcology 2016, 3-4 October 2016, Athens, Greece (oral presentation).
- “*Comparative in-vitro study of the antiparasitic activity of tannin-rich Mediterranean plants in two gastrointestinal nematodes*”, **Saratsi K.**, Parissi Z., Hadjigeorgiou I., Sotiraki S., EMOP XII, 20-24 July 2016, Turku, Finland (oral presentation).
- “*Effects of carob pod (Ceratonia siliqua) meal fed in sheep against gastrointestinal nematodes*”, **Saratsi K.**, Voutzourakis N., Tzanidakis N., Saratsis A., Stefanakis A., Hoste H., Thamsborg S., Hadjigeorgiou I., Sotiraki S., WAAVP 2015, 16-21 August 2015, Liverpool (oral presentation)

ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- “*Μελέτη in vitro της ανθελμινθικής δράσης μεσογειακών φυτικών ειδών πλουσίων σε ταννίνες ενάντια στα γαστρεντερικά νηματώδη των προβάτων*”, **Σαράτση Κ.**, Παρίση Ζ., Χατζηγεωργίου Ι., Σωτηράκη Σ., Ελληνική Ζωοτεχνική Εταιρεία – 31^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο, 5-7 October 2016, Serres (προφορική παρουσίαση)
- “*Μελέτη Ανθελμινθικής Δράσης του Χαρουπιού στα πρόβατα*”, **Σαράτση Κ.**, Βουτζουράκης Ν., Σαράτσης Α., Τζανιδάκης Ν., Στεφανάκης Α., Hoste H., Thamsborg M.S., Χατζηγεωργίου

Ι., Σωτηράκη Σ., Ελληνική Ζωοτεχνική Εταιρεία, 30ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο, 14-16 Οκτωβρίου 2015, Γιαννιτσά (προφορική ανακοίνωση)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ABSTRACT	vi
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	ix
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	xi
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΔΙΑΡΘΡΩΣΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	5
2.1. ΜΙΚΡΑ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΧΝΟΤΕΡΕΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΣΕΙΣ	5
2.1.1. Γενικά Στοιχεία	5
2.1.2. Βιολογικός κύκλος νηματωδών παρασίτων	5
2.1.2.1. Βιολογικός Κύκλος του παρασίτου <i>Haemonchus contortus</i>	6
2.1.2.2. Βιολογικός Κύκλος του παρασίτου <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	8
2.1.3. Διάγνωση και ταυτοποίηση των γαστρεντερικών νηματωδών	8
2.1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την πρόκληση γαστρεντερικών παρασιτώσεων ..	10
2.1.4.1. Αβιοτικοί παράγοντες	11
2.1.4.2. Βιοτικοί παράγοντες	12
2.1.5. Επιπτώσεις στην Παραγωγή	13
2.1.6. Αντιμετώπιση Παρασιτώσεων -Προβλήματα	14
2.1.6.1. Αντιμετώπιση με ανθελμινθικά φάρμακα	14
2.1.6.2. Φαινόμενο ανθελμινθικοαντοχής.....	15
2.1.6.3. Αντιμετώπιση ανθελμινθικοαντοχής.....	15
2.1.6.4. Κατάλοιπα φαρμάκων στα παραγόμενα προϊόντα.....	18
2.1.7. Εναλλακτικοί τρόποι αντιμετώπισης παρασιτώσεων	20
2.2. ΒΙΟΕΝΕΡΓΑ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΑ ΦΥΤΑ	23
2.2.1. Μεσόγειος και Μεσογειακή Χλωρίδα	23
2.2.2. Βιοενεργά φυτά – Φυτά πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες	24
2.2.3. Ταξινόμηση δευτερογενών μεταβολιτών	27

2.2.3.1. Τερπένια/Τερπενοειδή	27
2.2.3.2. Αζωτούχες Βάσεις	27
2.2.3.3. Φαιολικές ενώσεις.....	27
2.2.3.3.1. Ταννίνες	28
2.2.3.3.1.1. Συμπυκνωμένες Ταννίνες.....	29
2.2.4. Βιοενεργά φυτά και ανθελμινθική δράση	31
2.2.5. Μηχανισμοί δράσης ταννινών.....	33
2.2.6. Αρνητικές Επιπτώσεις Δευτερογενών Μεταβολιτών	35
2.2.7. Εκτίμηση της ανθελμινθικής δράσης των βιοενεργών φυτών.....	36
2.2.7.1. Εντοπισμός φυτικού υλικού	37
2.2.7.2. Αξιολόγηση της αντιπαρασιτικής δράσης.....	38
2.2.7.2.1. <i>In vitro</i> επιλογή.....	38
2.2.7.2.1.1. <i>In vitro</i> δοκιμές που χρησιμοποιούνται.....	38
2.2.7.2.1.2. Παράμετροι που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τις <i>in vitro</i> δοκιμές.....	41
2.2.7.2.2. <i>In vivo</i> επιβεβαίωση πιθανών nutraceuticals υπό ελεγχόμενες συνθήκες.....	42
2.2.7.2.2.1. Αριθμός αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων	44
2.2.7.2.2.2. Δείκτης αναιμίας.....	45
2.2.7.2.2.3. Προσδιορισμός αριθμού ενηλίκων παρασίτων	46
2.2.7.2.2.4. Προσδιορισμός ωοτοκίας των θηλυκών ενηλίκων παρασίτων.....	46
2.2.7.2.2.4.1. Προσδιορισμός ωοτοκίας θηλυκών <i>H. contortus</i>	47
2.2.7.2.2.4.2. Προσδιορισμός ωοτοκίας θηλυκών <i>Tr. colubriformis</i>	47
2.2.7.2.3. <i>In vivo</i> μελέτες σε πραγματικές συνθήκες εκτροφών	47
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: <i>IN VITRO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΙ	50
4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	50
4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	52
4.2.1. Επιλογή Ειδών Παρασίτων	52

4.2.2 Επιλογή Φυτικών Ειδών	52
4.2.3. Περιγραφή Φυτών ανά Οικογένεια	54
4.2.3.1. Οικογένεια Fabaceae Lindl.	54
4.2.4. Τόπος/Χρόνος Συλλογής	55
4.2.5. Διαδικασία εκχύλισης	56
4.2.6. Παραγωγή υλικού Παρασίτων για τις <i>in vitro</i> δοκιμές	57
4.2.7. <i>In vitro</i> Πειραματισμός–Δοκιμή Έκδυσης Προνομφών (Larval Exsheathment Inhibition Assay-LEIA)	58
4.2.8. Προσδιορισμός Περιεχομένου των Εκχυλισμάτων	59
4.2.8.1. Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών – Μέθοδος Folin-Ciocalteu	59
4.2.8.1.1. Αρχή της Μεθόδου	59
4.2.8.1.2. Αναλώσιμα - Συσκευές	60
4.2.8.1.3. Πειραματική Διαδικασία	61
4.2.8.2. Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών	62
4.2.8.2.1. Αρχή της Μεθόδου	62
4.2.8.2.2. Αναλώσιμα - Συσκευές	62
4.2.8.2.3. Πειραματική διαδικασία	63
4.2.8.3. Προσδιορισμός περιεχομένου πολυφαινολών των εκχυλισμάτων	64
4.2.9. Στατιστική Επεξεργασία	66
4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	67
4.3.1. Χημική Ανάλυση των Εκχυλισμάτων	67
4.3.2. Αποτελέσματα Δοκιμής Έκδυσης Προνομφών	69
4.3.3. Αποτελέσματα προσδιορισμού Μέσης Αποτελεσματικής Δόσης	72
4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	74
4.5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: <i>IN VIVO</i> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΙ.....	80
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	80
5.2.ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	82
5.2.1. Σταβλισμός και ζώα.....	82

5.2.2. Μολύνουσες Προνύμφες L ₃	82
5.2.3. Φυτά πλούσια σε ταννίνες που χρησιμοποιήθηκαν	83
5.2.4. Συγκέντρωση και σύσταση σε ταννίνες	83
5.2.5. Πειραματικός Σχεδιασμός.....	83
5.2.5.1. Πείραμα 1	84
5.2.5.2. Πείραμα 2	84
5.2.5.3. Πείραμα 3	85
5.2.6. Παθοφυσιολογικές εξετάσεις.....	85
5.2.7. Παρασιτολογικές εξετάσεις	87
5.2.7.1. Προσδιορισμός αριθμού αυγών γαστρεντερικών παρασίτων (Faecal Egg Counts / FEC).....	87
5.2.7.2. Προσδιορισμός αριθμού ενήλικων παρασίτων <i>H. contortus</i> και <i>Tr. colubriformis</i>	87
5.2.7.3. Προσδιορισμός ωοτοκίας των θηλυκών ενήλικων παρασίτων	87
5.2.7.3.1. Προσδιορισμός ωοτοκίας θηλυκών <i>H. contortus</i>	88
5.2.7.3.2. Προσδιορισμός ωοτοκίας θηλυκών <i>Tr. colubriformis</i>	88
5.2.8. Στατιστική Επεξεργασία	88
5.2.9. Ηθικά Ζητήματα	89
5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	90
5.3.1. Αποτελέσματα Χημικής Ανάλυσης Ταννινών	90
5.3.2. Πείραμα 1.....	92
5.3.3. Πείραμα 2.....	95
5.3.4. Πείραμα 3.....	97
5.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
5.5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	107
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	108
6.1. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	108
6.2. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	110
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	111

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	147
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	151

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΔΙΑΡΘΡΩΣΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η εκτροφή προβάτων και αιγών αποτελεί παραδοσιακά μία από τις πιο σημαντικές αγροτικές δραστηριότητες στη χώρα μας, συμβάλλοντας κατά 18% περίπου στο συνολικό αγροτικό εισόδημα (ΥΠΑΑΤ, 2011). Η ανάπτυξη της αιγοπροβατοτροφίας στην Ελλάδα στηρίχθηκε σε μία σειρά παραγόντων, όπως είναι η ιδιαιτερότητα των κλιματολογικών συνθηκών, η γεωμορφολογία του εδάφους (π.χ. φυσική συνέχεια ορεινών βοσκοτόπων με καλλιεργήσιμη γη), η ύπαρξη εγκλιματισμένων εγχωρίων φυλών και η έντονη σύνδεσή της με την παράδοση. Όλα τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή υψηλής ποιότητας γαλακτοκομικών κυρίως προϊόντων, αφού στη χώρα μας οι εκτροφές είναι ως επί το πλείστον γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης (σύμφωνα με στοιχεία του ΥΠΑΑΤ το 95% των ζώων στην Ελλάδα αρμέγεται).

Η βόσκηση αποτελεί βασική παράμετρο στην εκτροφή των μικρών μηρυκαστικών, καθώς καλύπτει μεγάλο μέρος της διατροφής τους ιδιαίτερα στα εκτατικά και ημιεντατικά συστήματα εκτροφής που εφαρμόζονται στην χώρα μας. Στις εκτροφές αυτές οι ενδο-παρασιτικές μολύνσεις είναι ιδιαίτερα συχνές, γιατί η βόσκηση συνδέεται συνήθως και με την κατανάλωση προνυμφών γαστρεντερικών ελμίνθων από τα ζώα.

Η αντιμετώπιση του παρασιτισμού των προβάτων και των αιγών από τα γαστρεντερικά νηματώδη (νηματώδη παράσιτα της οικογένειας Trichostrongylidae), αποτελεί μία σημαντική πρόκληση, καθώς εντοπίζεται συχνά, τα παράσιτα έχουν μεγάλη εξάπλωση, απειλούν την υγεία και ευζωία των ζώων που προσβάλουν, ενώ ταυτόχρονα μειώνουν το αγροτικό εισόδημα των κτηνοτρόφων και την ποιότητα του γάλακτος (Perry & Randolph, 1999; Stear et al., 2007; Hoste et al., 2016). Μέχρι σήμερα, η αντιμετώπιση των παρασιτώσεων αυτών γίνεται με τη χρήση διαφόρων ευρέως φάσματος αντιπαρασιτικών φαρμάκων, πρακτική αποτελεσματική, αλλά και οικονομική, που μπορεί να συνοδεύεται όμως από προβλήματα. Συγκεκριμένα, η χρήση πολλών από τα εμπορικά διαθέσιμα ανθελμινθικά σκευάσματα σε εκτροφές αιγών και προβάτων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης απαγορεύεται κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής, λόγω των χημικών καταλοίπων των δραστικών ουσιών στο γάλα, περιορισμός που ενισχύεται από την ολοένα αυξανόμενη ανησυχία των καταναλωτών για πιθανά υπολείμματα χημικών στα παραγόμενα ζωικά προϊόντα και το περιβάλλον. Το πιο άμεσο πρόβλημα όμως είναι η σημαντική μείωση της αποτελεσματικότητας των ανθελμινθικών, λόγω της ανάπτυξης του φαινομένου της ανθελμινθικοαντοχής, που είναι αποτέλεσμα της μακροχρόνιας και συχνά ανεξέλεγκτης χορήγησής τους στα ζώα (McKellar, 1997; Torres-Acosta et al., 2012; Jackson et al., 2012; Kaplan & Vidyashankar, 2012; Geurden

et al., 2014; Keane et al., 2014; Kaplan, 2020). Όλα τα παραπάνω, οδήγησαν στην αναζήτηση εναλλακτικών ή συμπληρωματικών τρόπων αντιμετώπισης των παρασιτώσεων (Jackson, 2000; Waller, 2006), ανάμεσα στις οποίες σημαντική θέση κατέχει η ενσωμάτωση φυτικών υλικών με «βιοενεργή» δράση στη διατροφή των ζώων (Hoste & Torres-Acosta, 2011). Με τον χαρακτηρισμό αυτό (στα αγγλικά έχουν επικρατήσει οι όροι bioactive ή nutraceutical plants) αναφερόμαστε σε φυτικά είδη που ήδη χρησιμοποιούνται ή έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφές, αλλά παράλληλα εμφανίζουν και ειδικές φαρμακευτικές (π.χ. ανθελμινθικές) ή άλλες ευεργετικές για την υγεία του ζώου ιδιότητες (Waller and Thamsborg, 2004; Hoste et al., 2006; Alonso-Díaz et al., 2010; Hoste et al., 2015). Οι περισσότερες μελέτες, έχουν αναδείξει, ότι η δραστηριότητα των φυτών αυτών στην περίπτωση των παρασιτώσεων, οφείλεται στην παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών, κυρίως πολυφαινόλων, όπως είναι οι συμπυκνωμένες ταννίνες (Terrill et al., 2012; Hoste et al., 2015, 2016). Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, σε ό, τι αφορά τις συμπυκνωμένες ταννίνες για τον έλεγχο των γαστρεντερικών νηματωδών παρασίτων στα μηρυκαστικά είναι και η αιτία του ολοένα αυξανόμενου ενδιαφέροντος για την περαιτέρω αξιολόγηση των ανθελμινθικών ιδιοτήτων φυτών πλούσιων σε συμπυκνωμένες ταννίνες (Morgan et al., 2019). Η πρακτική που ακολουθείται για την αξιολόγηση της ανθελμινθικής δράσης των βιοενεργών φυτών είναι αρχικά η διενέργεια *in vitro* δοκιμών και σε δεύτερο χρόνο η *in vivo* διενέργεια μελετών της αντιπαρασιτικής τους δράσης (Jackson & Hoste, 2010).

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η *in vitro* και η *in vivo* διερεύνηση και αξιολόγηση της ανθελμινθικής δράσης φυτικών ειδών, πλούσιων σε δευτερογενείς μεταβολίτες, τα οποία έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά, α) αποτελούν μέρος της βασικής χλωρίδας των μεσογειακών οικοσυστημάτων, β) είναι αρκετά διαδεδομένα στην Ευρώπη ώστε να αποτελούν ή να έχουν την προοπτική να αποτελέσουν πηγή διατροφής των εκτρεφόμενων μικρών μηρυκαστικών, γ) διαθέτουν κατάλληλα διατροφικά χαρακτηριστικά, ώστε να ενσωματωθούν στα σιτηρέσια των μικρών μηρυκαστικών και δ) παρουσιάζουν δράση έναντι των γαστρεντερικών νηματωδών παρασίτων.

Η διατριβή χωρίζεται σε δύο μέρη, στο **Γενικό** και στο **Ειδικό**. Στο Γενικό μέρος, γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση των γαστρεντερικών νηματωδών των μικρών μηρυκαστικών και των τρόπων αντιμετώπισής τους με τη χρήση βιοενεργών φυτών, πλούσιων σε συμπυκνωμένες ταννίνες (Κεφάλαιο 2 και Κεφάλαιο 3). Στο Ειδικό μέρος, παρουσιάζεται η *in vitro* και *in vivo* έρευνα σε ό,τι αφορά τη διερεύνηση και αξιολόγηση της ανθελμινθικής δράσης φυτικών ειδών σε δύο ανεξάρτητα κεφάλαια (Κεφάλαια 4 και 5, αντίστοιχα), όπου περιγράφονται ξεχωριστά, οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, παρουσιάζονται και

συζητούνται τα αποτελέσματα, και διατυπώνονται τα κυριότερα συμπεράσματα, συναφή ερωτήματα και προτάσεις. Στο τελευταίο κεφάλαιο της διατριβής (Κεφάλαιο 6), διατυπώνονται τα γενικότερα συμπεράσματα και προτάσεις για μελλοντική έρευνα.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1. ΜΙΚΡΑ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΧΝΟΤΕΡΕΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΣΕΙΣ

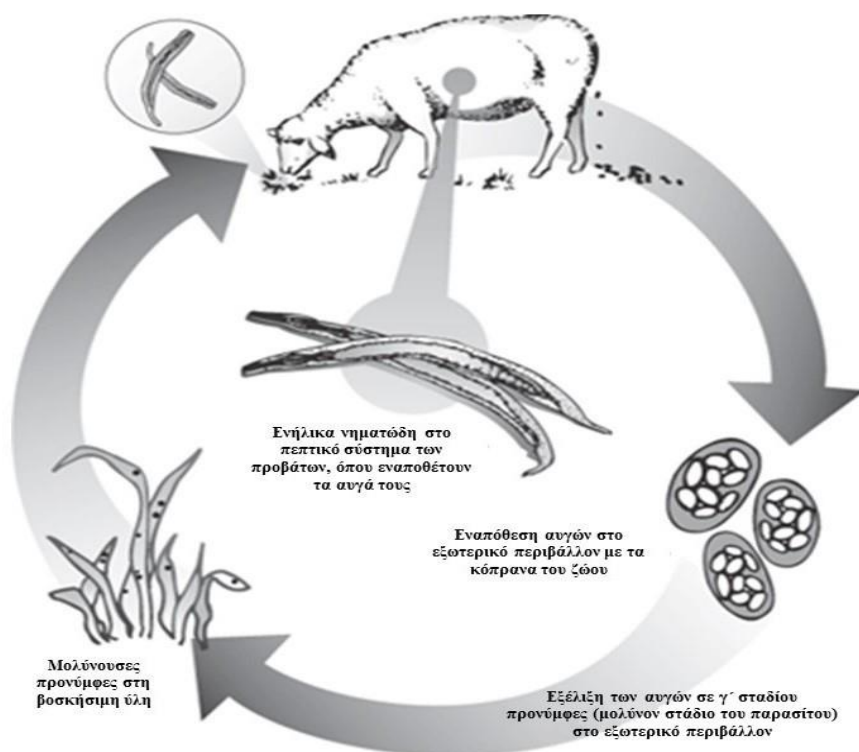
2.1.1. Γενικά Στοιχεία

Παγκοσμίως, ένα από τα σημαντικά προβλήματα στις εκτροφές των μικρών μηρυκαστικών είναι ο παρασιτισμός από γαστρεντερικά νηματώδη και πιο συγκεκριμένα από τα παράσιτα της οικογένειας Trichostrongylidae (Sykes, 1994). Ιδιαίτερα στα συστήματα εκτροφής που χρησιμοποιούν τη βόσκηση για την κάλυψη μέρους των θρεπτικών αναγκών των ζώων (όπως είναι τα ημiekτατικά, και τα ημικεντατικά συστήματα εκτροφής των μικρών μηρυκαστικών που επικρατούν στη χώρα μας), οι μολύνσεις από γαστρεντερικά νηματώδη είναι ένα από τα συχνότερα προβλήματα (Jackson et al., 2009; Preston et al., 2014), καθώς η έκθεση στα νηματώδη παράσιτα και η μόλυνση από αυτά κατά τη βόσκηση μπορεί να θεωρηθεί δεδομένη.

2.1.2. Βιολογικός κύκλος νηματωδών παρασίτων

Για την κατανόηση του μηχανισμού της μόλυνσης των ζώων από τα νηματώδη παράσιτα, απαιτείται η γνώση του βιολογικού τους κύκλου. Στην απλούστερη μορφή του, ο βιολογικός τους κύκλος περιλαμβάνει την αλληλουχία των εξελικτικών σταδίων αυγό - προνύμφη (4 προνυμφικά στάδια) - ενήλικο παράσιτο - αυγό, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 2.1**. Συγκεκριμένα, τα αυγά των παρασίτων αποβάλλονται με τα κόπρανα των μολυσμένων ζώων (τελικών ξενιστών) στο εξωτερικό περιβάλλον, όπου και εξελίσσονται, εντός συγκεκριμένης χρονικής περιόδου, ανάλογα με το είδος των παρασίτων και τις συνθήκες του περιβάλλοντος, σε α' (L₁), β' (L₂) και γ' σταδίου προνύμφες (L₃), οι οποίες και αποτελούν το μολύνον στάδιο τους (Rang et al., 1999). Οι L₃ ανάλογα με τις ειδικές συνθήκες του μακρο- και μικρο-περιβάλλοντος (εξαρτώνται κυρίως από τη σχετική υγρασία και τη θερμοκρασία) μπορούν να παραμείνουν ενεργές για αρκετό χρονικό διάστημα επιδεικνύοντας μάλιστα συγκεκριμένη συμπεριφορά, όπως για παράδειγμα κατακόρυφη κινητικότητα στην ποώδη βλάστηση, προκειμένου να αυξήσουν τις πιθανότητες να προσληφθούν από τον τελικό ξενιστή ή ακόμη να προστατευθούν από τις καιρικές συνθήκες (Waghorn et al., 2002; Wang et al., 2018). Οι L₃ προνύμφες μετά την κατάποσή τους από τα ζώα κατά τη βόσκηση, εγκαθίστανται στο στομάχι ή το έντερο του ξενιστή, ανάλογα με το είδος του παρασίτου. Αφού εξελιχθούν εντός του ξενιστή σε προνύμφες L₄ και στη συνέχεια σε ενήλικα παράσιτα, παράγουν αυγά, τα οποία

αποβάλλονται με τα κόπρανα στους βοσκοτόπους. Η διασπορά τους στο περιβάλλον γίνεται ως επί το πλείστον παθητικά συνήθως με το νερό της βροχής (Stromberg, 1997).



Εικόνα 2.1. Βιολογικός κύκλος γαστρεντερικών νηματώδων παρασίτων

(Πηγή: <https://pubs.ext.vt.edu/410/410-027/410-027.html>)

Στη συνέχεια περιγράφονται αναλυτικά οι βιολογικοί κύκλοι των συγκεκριμένων δύο ειδών που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής.

2.1.2.1. Βιολογικός Κύκλος του παρασίτου *Haemonchus contortus*

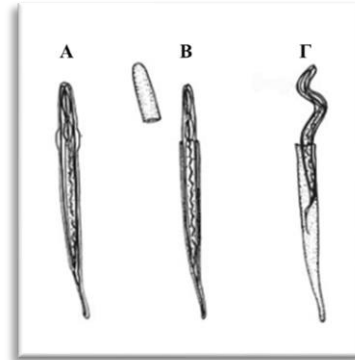
Το *H. contortus* είναι ένα ιδιαίτερα παθογόνο νηματώδες παράσιτο του γαστρεντερικού συστήματος, που παρασιτεί στο ήνυστρο των μικρών μηρυκαστικών. Λόγω της έντονης αιματοφαγίας των ενηλίκων, ο έντονος παρασιτισμός συνοδεύεται από κλινικά συμπτώματα, κυρίως αναιμία, ή ακόμη και θάνατο των προσβεβλημένων ζώων. Τα μικρά μηρυκαστικά, που είναι ξενιστές του παρασίτου, μολύνονται παθητικά έπειτα από την κατάποση των προνυμφών L₃ (Εικόνα 2.2.), κατά τη βόσκηση. Επομένως, η L₃ αποτελεί τη μολύνουσα μορφή του παρασίτου και όταν φτάσει στο ήνυστρο, αποβάλλει τη θήκη της και εισέρχεται στον βλεννογόνο, όπου εξελίσσεται σε L₄ (Εικόνα 2.3.). Δύο εβδομάδες αργότερα, επανέρχεται στον αυλό του ήνυστρου, όπου ενηλικιώνεται (Εικόνα 2.4.). Η ολοκλήρωση του βιολογικού

κύκλου του *H. contortus* επιτυγχάνεται με την παραγωγή αυγών από το παράσιτο, τα οποία αποβάλλονται με τα κόπρανα των μολυσμένων ζώων στο εξωτερικό περιβάλλον (Taylor et al., 2007).



Εικόνα 2.2. Προνύμφη *H. contortus* γ' σταδίου (L3)

(Πηγή: Εργαστήριο Παρασιτολογίας – Ι.Κ.Ε.Θ.
ΕΛ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ)



Εικόνα 2.3. Έκδυση προνυμφών γ' σταδίου (L3) και εξέλιξή τους σε δ' σταδίου (L4), εντός του ζώου

(Πηγή:

http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/Nematodes/nems_7.htm)



Εικόνα 2.4. Ενήλικα νηματώδη παράσιτα του είδους *H. contortus*

(Πηγή: Εργαστήριο Παρασιτολογίας – Ι.Κ.Ε.Θ. ΕΛ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ)

2.1.2.2. Βιολογικός Κύκλος του παρασίτου *Trichostrongylus colubriformis*

Το *Tr. colubriformis* παρασιτεί στο πρώτο τμήμα του λεπτού εντέρου των μικρών μηρυκαστικών. Ο βιολογικός του κύκλος είναι άμεσος (απαιτείται δηλαδή ένας μόνο ξενιστής για να ολοκληρωθεί) και η μόλυνση των ξενιστών πραγματοποιείται, με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που περιγράφηκε για το *H. contortus*, έπειτα από την κατάποση προνυμφών L₃ (Εικόνα 2.5.) κατά τη βόσκηση. Οι προνύμφες εισέρχονται στο βλεννογόνο της πρώτης μοίρας του λεπτού εντέρου, όπου αποβάλλουν τη θήκη τους, και εξελίσσονται σε προνύμφες L₄. Περίπου δυο εβδομάδες αργότερα, επανέρχονται στον αυλό του εντέρου, όπου ενηλικιώνονται και προκαλούν ερεθισμό και ατροφία του βλεννογόνου. Η κλινική εκδήλωση της μόλυνσης από το παράσιτο αυτό είναι ως επί το πλείστον ήπια. Εκεί παράγουν αυγά, τα οποία αποβάλλονται στο εξωτερικό περιβάλλον μαζί με τα κόπρανα. Ακολουθεί η εξέλιξη σε προνύμφες L₃ (μολύνουσα μορφή) εντός διαστήματος 10 ημερών, για να ακολουθήσει η είσοδος του παρασίτου (με τη μορφή L₃) στον ξενιστή και η ενηλικίωσή του 3 εβδομάδες αργότερα (Taylor et al., 2007).



Εικόνα 2.5. Προνύμφη *Tr. colubriformis* γ' σταδίου (L₃)

Πηγή: Εργαστήριο Παρασιτολογίας – Ι.Κ.Ε.Θ. ΕΛ.Γ.Ο. ΔΗΜΗΤΡΑ

2.1.3. Διάγνωση και ταυτοποίηση των γαστρεντερικών νηματώδων

Καθώς τα γαστρεντερικά νηματώδη δεν προκαλούν παθογνωμονικά συμπτώματα, η διάγνωσή τους βασίζεται σε εργαστηριακές δοκιμές, όπως στην εφαρμογή ειδικών κοπρανολογικών μεθόδων, βάσει των οποίων ανευρίσκονται, χαρακτηρίζονται και καταμετρώνται τα στοιχεία της προσβολής. Σε ό, τι αφορά τα ποσοτικά παρασιτικά στοιχεία, ο δείκτης που χρησιμοποιείται είναι ο αριθμός των αυγών των παρασίτων ανά γραμμάριο κοπράνων (EPG), που χρησιμοποιείται ευρέως τόσο για την εκτίμηση του παρασιτικού φορτίου, όσο και ως δείκτης αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Οι εν λόγω μέθοδοι στηρίζονται ως επί το πλείστον στην αρχή της επίπλευσης των αυγών και χρησιμοποιούν κυρίως διαλύματα αλάτων με ειδικό βάρος >1,0 (συνήθως 1,2-1,4). Η καταμέτρηση των αυγών γίνεται με μικροσκοπική εξέταση εναιωρήματος δείγματος κοπράνων, που προέρχεται από γνωστό όγκο δείγματος (Nicholls & Obendorf, 1994).

Η τεχνική που έχει επικρατήσει για πάρα πολλά χρόνια σε παγκόσμιο επίπεδο είναι η τεχνική McMaster, που αναπτύχθηκε και βελτιώθηκε στο εργαστήριο McMaster του Πανεπιστημίου του Sidney ([Gordon & Whitlock, 1939](#); [Whitlock, 1948](#)). Στη μέθοδο αυτή, το δείγμα αναμειγνύεται με ένα υγρό επίπλευσης και τοποθετείται στην ειδική πλάκα McMaster, που αποτελείται από δύο διαγραμμισμένους θαλάμους συγκεκριμένου όγκου. Τα αυγά καταμετρούνται με τη χρήση μικροσκοπίου. Έκτοτε, η τεχνική αυτή τροποποιήθηκε, λαμβάνοντας υπόψη διάφορους εργαστηριακούς παράγοντες, όπως το διάλυμα και ο χρόνος επίπλευσης, η αραίωση και ο όγκος του δείγματος που πρέπει να εξεταστεί, με αποτέλεσμα στη βιβλιογραφία σήμερα να συναντώνται πολλές παραλλαγές της συγκεκριμένης τεχνικής ([Raynaud, 1970](#); [MAFF, 1986](#); [Roepstorff & Nansen, 1998](#)). Αντίστοιχης φιλοσοφίας είναι και η μέθοδος Cornell-Wisconsin ([Egweg & Slocombe, 1981, 1982](#)), η οποία βασίστηκε στις ίδιες αρχές, αλλά χρησιμοποίησε τη φυγοκέντρηση του εναιωρήματος κοπράνων με το υγρό επίπλευσης, για να βελτιώσει την επίπλευση των αυγών.

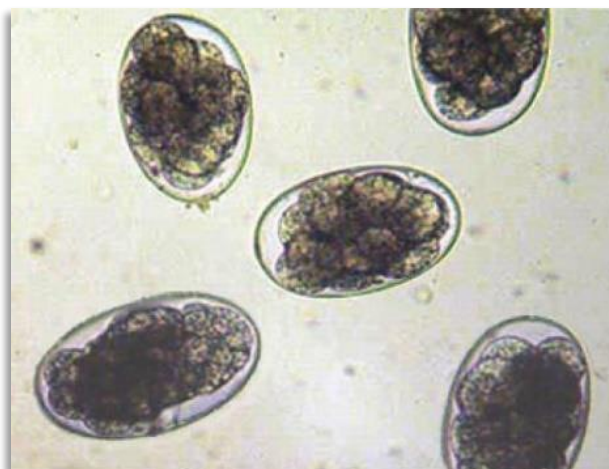
Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνικές, που αξιοποιούν σύγχρονες τεχνολογίες για να βελτιώσουν την ακρίβεια και την ευαισθησία των παραπάνω μεθόδων, απλουστεύοντας ταυτόχρονα τη διαδικασία. Η τεχνολογία FLOTAC ([Cringoli, 2006](#); [Cringoli et al., 2010](#)) βασίζεται στην ομόνυμη πλάκα FLOTAC που αποτελείται από δύο θαλάμους επίπλευσης 5 mL που πληρούνται με το εναιώρημα κοπράνων και με το υγρό επίπλευσης και στη συνέχεια η πλάκα φυγοκεντρείται ως έχει. Το σύστημα επιτρέπει την ανάλυση του υλικού κοπράνων μέχρι 1 g. Οι κύριοι περιορισμοί της τεχνικής FLOTAC είναι η πολυπλοκότητα της εφαρμογής και η προϋπόθεση πρόσβασης σε φυγόκεντρο με ειδικές κεφαλές, η οποία σε πολλά εργαστήρια δεν είναι διαθέσιμη. Για να ξεπεραστεί το εμπόδιο αυτό, οι κατασκευαστές ανέπτυξαν μία απλοποιημένη έκδοση της πρωτογενούς τεχνολογίας, τη mini-FLOTAC και τον περιέκτη fill-FLOTAC. Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα αυτής της νέας μεθόδου είναι η κατάργηση της φυγοκέντρησης, επιτρέποντας ευκολότερη μεταφορά και απλούστερη εφαρμογή ακόμη και σε συνθήκες εκτροφής ([Barda et al., 2013a, b](#); [Cringoli et al., 2013](#); [Silva et al., 2013](#); [Rinaldi et al., 2014](#)). Ωστόσο, παραλείποντας το στάδιο φυγοκέντρησης και μειώνοντας τον όγκο του εξεταζόμενου τελικού δείγματος, μειώθηκε και η ευαισθησία της μεθόδου από 1 σε 5 EPG ([Rinaldi et al., 2011](#)).

Τα αποτελέσματα όλων των μεθόδων που περιγράφονται παραπάνω, βασίζονται στη τελική εξέταση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο από ειδικούς επιστήμονες. Τα τελευταία χρόνια, όμως, γίνονται προσπάθειες αυτοματοποίησης της όλης διαδικασίας (αναγνώρισης και καταμέτρησης των παρασιτικών στοιχείων), καθώς και ψηφιοποίησης των αποτελεσμάτων, έτσι ώστε να υπάρχει η δυνατότητα άμεσης μεταφοράς τους (π.χ. μέσω τεχνολογίας cloud)

στον τελικό χρήστη. Το μόνο ευρέως διαδεδομένο και εμπορικά διαθέσιμο σύστημα μέχρι σήμερα είναι το σύστημα FECPAK, το οποίο είναι μεν πολύ αποτελεσματικό, απαιτεί όμως την αγορά ειδικού εξοπλισμού (Godber et al., 2015; Rashid et al, 2018).

Σε όλες τις παραπάνω τεχνικές, το υγρό επίπλευσης που χρησιμοποιείται, καθώς και η διαδικασία συλλογής και συντήρησης των κοπράνων μέχρι την εξέταση, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία και την ακρίβεια που θα παρουσιάσουν (Cringoli et al., 2004, 2010).

Κατά την μικροσκοπική εξέταση των δειγμάτων κοπράνων όμως, είναι δύσκολη έως αδύνατη η ταυτοποίηση των παρασίτων σε επίπεδο γένους και είδους, εξαιτίας του ότι τα αυγά (Εικόνα 2.6.) των διαφόρων ειδών παρουσιάζουν μεγάλη μορφολογική ομοιότητα μεταξύ τους. Για αυτόν τον λόγο, απαιτείται η εφαρμογή ειδικής καλλιέργειας κοπράνων, η οποία στοχεύει στην εξέλιξη των αυγών σε προνύμφες L₃ (μολύνουσα μορφή του παρασίτου), οι οποίες στη συνέχεια ταυτοποιούνται με τη χρήση των κλειδών, που προτείνονται από το Central Veterinary Laboratory (MAFF, 1986). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί επίσης και σύγχρονες μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης των προνυμφών (Roeber et al., 2017).



Εικόνα 2.6. Αυγά γαστρεντερικών νηματωδών
(Πηγή: <http://www.luresext.edu/?q=Fecal%20Egg%20Counting>)

2.1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την πρόκληση γαστρεντερικών παρασιτώσεων

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την έκταση και την ένταση των γαστρεντερικών παρασιτώσεων, μπορούν να ταξινομηθούν σε αβιοτικούς και σε βιοτικούς. Οι αβιοτικοί

παράγοντες έχουν σχέση με τις μικροκλιματικές συνθήκες, τη διατροφή των εκτρεφόμενων ζώων, τη βόσκηση, το σύστημα διαχείρισης, αλλά και τις συνθήκες υγιεινής της εκτροφής, ενώ οι βιοτικοί παράγοντες αφορούν κυρίως στην ανοσολογική κατάσταση και στον γενότυπο του ξενιστή, αλλά και στην παθογένεια του παρασίτου. Ο τρόπος που επηρεάζουν οι παράγοντες αυτοί αναλύεται παρακάτω.

2.1.4.1. Αβιοτικοί παράγοντες

Από τη στιγμή που μέρος του βιολογικού κύκλου των γαστρεντερικών νηματωδών παρασίτων λαμβάνει χώρα στο εξωτερικό περιβάλλον, σε κάποια στάδια της εξέλιξής τους είναι εκτεθειμένα σε αβιοτικούς παράγοντες και για την ακρίβεια στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Έτσι, οι μετεωρολογικές συνθήκες επηρεάζουν άμεσα την διαθεσιμότητα των L₃ των παρασίτων (μέσω των άμεσων επιδράσεων στην επιβίωση και την ανάπτυξη/εξέλιξή τους στους βοσκοτόπους) και επομένως και τα ποσοστά μόλυνσης (O' Connor et al., 2006). Μάλιστα, σύμφωνα με τους Morgan & van Dijk (2012), η θερμοκρασία και η υγρασία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο στην επιβίωση, όσο και στην εξέλιξη των γαστρεντερικών νηματωδών. Πιο συγκεκριμένα, οι ακραίες θερμοκρασίες (ζέστης ή κρύου) είναι επιζήμιες για τα παράσιτα, ενώ η αύξηση της θερμοκρασίας, εντός ενός φάσματος που ποικίλει μεταξύ των διαφόρων παρασιτικών ειδών (O' Connor et al., 2006), επιταχύνει την εξέλιξη των αυγών σε προνύμφες. Τα περισσότερα αυγά των κοινών γαστρεντερικών νηματωδών της οικογένειας Trichostrongylidae, φαίνεται να εξελίσσονται σε προνύμφες L₃ σε θερμοκρασίες άνω των 4° C, ενώ άλλα είδη (όπως το *H. contortus*) απαιτούν υψηλότερες θερμοκρασίες (άνω των 8° C) για να εξελιχθούν (Kao et al., 2000; O' Connor et al., 2006). Οι υψηλές θερμοκρασίες, η υπερϊώδης ακτινοβολία και η αφυδάτωση των παρασίτων αυξάνει και τη θνησιμότητά τους (Barger et al., 1972; O' Connor et al., 2006; Kao et al., 2000; van Dijk et al., 2009). Ωστόσο, η υπεραπλούστευση των περιβαλλοντικών παραγόντων που επηρεάζουν τη βιολογία και την επιβίωση των νηματωδών παρασίτων μπορεί να οδηγήσει σε υποτίμηση άλλων παραγόντων (π.χ. γεωγραφικών), που παρότι μικρότερης σημασίας, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη (Domke et al., 2011).

Σήμερα, ήδη έχουν εμφανιστεί οι πρώτες ενδείξεις ότι η κλιματική αλλαγή έχει επηρεάσει τον πληθυσμό, την εποχικότητα, αλλά και τη χωρική κατανομή των γαστρεντερικών νηματωδών παρασίτων των προβάτων (van Dijk et al., 2008), τόσο άμεσα, όσο και έμμεσα. Με την αύξηση της θερμοκρασίας στις εύκρατες περιοχές (Stocker, et al., 2014), αναμένεται ότι θα αυξηθεί ο ρυθμός ανάπτυξης των αυγών και των πρώιμων προνυμφικών σταδίων, αλλά και η

θνησιμότητα των προνυμφών στο εξωτερικό περιβάλλον, επηρεάζοντας περισσότερο την επιβίωση των προνυμφών κατά τη διάρκεια του χειμώνα, ενώ κατά τις περιόδους έντονων βροχοπτώσεων που θα ακολουθούν μετά τις μεγάλες περιόδους ξηρασίας, θα παρατηρείται ξαφνικά μεγάλο παρασιτικό φορτίο στους βοσκοτόπους (van Dijk et al., 2010). Η έμμεση επίδραση της κλιματικής αλλαγής αφορά στην πιθανή επέκταση των περιόδων βόσκησης στις εύκρατες περιοχές (Phelan, et al., 2015), συνεπώς στην επέκταση των περιόδων έκθεσης των ξενιστών στις μολύνουσες μορφές των παρασίτων. Αυτό, σε συνδυασμό με την ενδεχόμενη αύξηση των γενεών των παρασίτων ανά περίοδο βόσκησης, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του παρασιτικού φορτίου των βοσκοτόπων (Skuce, et al., 2013).

Παράλληλα, πλήθος άλλων αβιοτικών παραγόντων, στους οποίους περιλαμβάνονται οι μέθοδοι εκτροφής και ιδιαίτερα η βόσκηση, εξαρτώνται άμεσα από τις κλιματικές συνθήκες, επηρεάζουν με τη σειρά τους την έκταση και την ένταση των γαστρεντερικών παρασιτώσεων (Morgan & van Dijk, 2012) και διαμορφώνουν μια εξαιρετικά πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ του ξενιστή, των παρασίτων και των στρατηγικών ελέγχου της μόλυνσης. Επίσης, οι ακατάλληλες συνθήκες υγιεινής στους στάβλους παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αύξηση του επιπολασμού και της επίπτωσης των παρασιτώσεων από νηματώδη γαστρεντερικά παράσιτα.

Ανάμεσα στους παράγοντες που επηρεάζουν τον παρασιτισμό από νηματώδη γαστρεντερικά παράσιτα, η διατροφή αποτελεί αδιαμφισβήτητα έναν από τους σημαντικότερους και μπορεί να επηρεάσει τόσο άμεσα (κατανάλωση L₃ κατά την βόσκηση), όσο και έμμεσα τη μόλυνση του ξενιστή από γαστρεντερικά παράσιτα (van Houtert & Sykes, 1996). Χαρακτηριστικά παραδείγματα της επίδρασης της διατροφής είναι α) η ανθεκτικότητα που εμφανίζουν τα πρόβατα και οι αίγες ενάντια στα νηματώδη παράσιτα, όταν βελτιώνεται η ποσότητα και η ποιότητα των πρωτεϊνών που καταναλώνουν στη διατροφή τους (Steel, 2003; Hoste et al., 2005; Knox et al., 2006; Kyriazakis & Houdijk, 2006) και β) η άμεση και έμμεση αντιπαρασιτική δράση που εμφανίζουν φυτά πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες όταν αυτά χρησιμοποιούνται για τη διατροφή των ζώων (Hoste et al., 2015, 2016). Πέραν όμως των παραπάνω, είναι γνωστό πως η ανεπαρκής πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, μπορεί να επηρεάσει έμμεσα την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή, η οποία και αποτελεί σημαντικό βιοτικό παράγοντα που επηρεάζει τις παρασιτώσεις.

2.1.4.2. Βιοτικοί παράγοντες

Όπως προαναφέρθηκε, οι βιοτικοί παράγοντες αφορούν κυρίως την ανοσολογική κατάσταση και τον γενότυπο του ξενιστή, αλλά και την παθογένεια του παρασίτου. Σε ανοσολογικούς μηχανισμούς άλλωστε οφείλεται και η ικανότητα του ξενιστή να επηρεάζει τη βιολογία των

νηματώδων παρασίτων, μέσω της παρεμπόδισης της εγκατάστασης των L₃ ή με την καθυστέρηση ανάπτυξης των παρασίτων, τη μείωση της γονιμότητας των θηλυκών παρασίτων και του αριθμού των αυγών που αποβάλλονται με τα κόπρανα, και με την αυξημένη αποβολή των ενήλικων παρασίτων. Η ανοσολογική ανεπάρκεια αυξάνει την ευαισθησία στις διάφορες παρασιτικές μολύνσεις. Για παράδειγμα, συνθήκες καταπόνησης στους ξενιστές μπορεί να προκαλέσουν ραγδαία αύξηση του αριθμού των αυγών των παρασίτων που αποβάλλονται με τα κόπρανα και επιβάρυνση του περιβάλλοντος με προνύμφες (Waller, 1993). Στους ξενιστές, η φυσική ανοσία εκφράζεται με απουσία κλινικών συμπτωμάτων, απέκκριση μικρού αριθμού αυγών παρασίτων ανά γραμμάριο κοπράνων και μικρό παρασιτικό φορτίο στα μολυσμένα ζώα. Τα δύο τελευταία συμβάλλουν στον περιορισμό της μόλυνσης των βοσκοτόπων και κατ'επέκταση των υπόλοιπων ζώων που βόσκουν σε αυτούς. Σύμφωνα με τον Stear et al. (2007), η παράμετρος που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ανοσίας των ζώων είναι ο αριθμός των αυγών των παρασίτων που εκκρίνονται με τα κόπρανά τους. Τέλος, στους βιοτικούς παράγοντες συγκαταλέγεται η ανθεκτικότητα των ξενιστών στα παράσιτα, η οποία ως ιδιότητα κληρονομείται (Gauly & Erhart, 2001; Gruner et al., 2004; Zvinorova et al., 2016; Greer et al., 2018; Hamie et al., 2019).

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με στοιχεία του ΥΠΑΑΤ (2011), οι εκτροφές προβάτων και αιγών περιλαμβάνουν κατά πλειονότητα ζώα που δεν έχουν υποστεί συστηματική γενετική επιλογή και εκτρέφονται σε εκτατικά και ημικτατικά συστήματα. Έτσι, έρχονται αντιμέτωπα με πλήθος περιβαλλοντικών προκλήσεων (όπως για παράδειγμα διακυμάνσεις σε ό,τι αφορά τη διαθεσιμότητα τροφής, το μικροκλίμα κ.α.), με αποτέλεσμα να υπάρχει ετερογένεια στην ανοσολογική και φυσιολογική αντίδραση στις μολύνσεις από γαστρεντερικά παράσιτα (Fekete & Kellems, 2007).

2.1.5. Επιπτώσεις στην Παραγωγή

Οι παρασιτώσεις από γαστρεντερικά νηματώδη συγκαταλέγονται ανάμεσα στα σημαντικά προβλήματα των εκτροφών μικρών μηρυκαστικών. Η ιδιαίτερη σημασία τους οφείλεται στην υποβάθμιση του επιπέδου υγείας και ευζωίας των ζώων, στη μείωση του προσδόκιμου επιβίωσης και στην αύξηση του ρυθμού αντικατάστασής τους, καθώς και στη μείωση της παραγωγικότητας των ζώων που προσβάλλουν. Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το κόστος των αποπαρασιτώσεων και της απόρριψης των προϊόντων (γάλα και κρέας), για όσο διαρκεί ο χρόνος αναμονής μετά την εφαρμογή της αντιπαρασιτικής αγωγής, συμβάλλουν στις οικονομικές επιπτώσεις των παρασιτώσεων (Sykes, 1994).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση των [Charlier et al. \(2014\)](#), οι περισσότερες μελέτες που αφορούν στις οικονομικές απώλειες εξαιτίας των γαστρεντερικών νηματώδων στα πρόβατα, αναφέρουν μειώσεις στην αύξηση του σωματικού βάρους της τάξης 10-47% και στην εριοπαραγωγή από 10 έως 21%, εξαρτώμενες πάντα από την ένταση της μόλυνσης των ζώων ([Coop et al., 1976, 1982](#); [Steel et al., 1980](#); [Albers et al., 1989](#); [Cobon & O' Sullivan, 1992](#)). Αντίθετα, μετά από αντιπαρασιτική θεραπεία, έχει παρατηρηθεί αύξηση του παραγόμενου γάλακτος από 9 έως 40% ([Cringoli et al., 2009a,b](#)).

Η μόλυνση των ζώων από τα γαστρεντερικά νηματώδη συνήθως εκδηλώνεται με υποκλινική μορφή και σταδιακά εξαπλώνεται ανάμεσα στα ζώα της εκτροφής. Από τα πιο συχνά συμπτώματα είναι η χρόνια απώλεια βάρους, η οποία όμως δεν είναι παθολογική ([Hoste & Chartier, 1998](#)).

2.1.6. Αντιμετώπιση Παρασιτώσεων -Προβλήματα

2.1.6.1. Αντιμετώπιση με ανθελμινθικά φάρμακα

Τόσο η προληπτική όσο και η θεραπευτική αντιμετώπιση των μολύνσεων από γαστρεντερικά παράσιτα στα μικρά μηρυκαστικά επιτυγχάνεται ως επί το πλείστον με τη χρήση ευρέως φάσματος αντιπαρασιτικών φαρμάκων. Για πολλά χρόνια, η προσέγγιση αυτή αποδείχθηκε αποτελεσματική, ασφαλής, και οικονομικά αποδοτική, μέχρι την εμφάνιση ανθεκτικών στα ανθελμινθικά στελεχών παρασίτων (φαινόμενο γνωστό ως ανθελμινθικοαντοχή) ([Jackson & Coop, 2000](#)).

Η ταξινόμηση των ανθελμινθικών φαρμάκων σε ομάδες, πραγματοποιείται με βάση την χημική δομή τους, τον τρόπο και το εύρος της δράσης τους. Στα μικρά μηρυκαστικά, τα ανθελμινθικά φάρμακα που χορηγούνται συχνότερα ανήκουν στην ομάδα των:

- i) βενζιμιδαζολών και προβενζιμιδαζολών,
- ii) ιμιδαζοθειαζολών και
- iii) μακροκυκλικών λακτονών. ([Sager et al., 2009](#))

Οι προϋποθέσεις που επιβάλλεται να πληροί κάθε ανθελμινθικό φάρμακο είναι συγκεκριμένες και είναι αυτές που το καθιστούν κατάλληλο για να χορηγηθεί στα ζώα και ιδιαιτέρως στα μικρά μηρυκαστικά. Αναλυτικότερα, πρέπει να χαρακτηρίζεται από ισχυρή ανθελμινθική δράση έναντι όλων των σταδίων του βιολογικού κύκλου των παρασίτων, να διαθέτει ευρύ δείκτη ασφαλείας (τουλάχιστον 1:6) και συμβατότητα με άλλα φάρμακα, να αφήνει μόνο για

μικρό χρονικό διάστημα κατάλοιπα στα παραγόμενα προϊόντα (γάλα και κρέας), που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, και να μην έχει παρενέργειες (Riviere & Papich, 2009). Η ευκολία χορήγησης του φαρμάκου σε μεγάλο αριθμό ζώων, όπως και το να είναι προσιτό από άποψη κόστους και απαιτούμενου εξοπλισμού στον παραγωγό, θεωρούνται επίσης ως απαραίτητα χαρακτηριστικά (Barragry, 1984; Britt, 1984; Marriner, 1986; Barragry, 1987; Μούζουρας, 1996).

2.1.6.2. Φαινόμενο ανθελμινθικοαντοχής

Σήμερα, η ανθελμινθικοαντοχή αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα, σε πολλές περιοχές του κόσμου, καθιστώντας την καταπολέμηση αυτών των παρασίτων ιδιαίτερα δύσκολη (Torres-Acosta et al., 2012; Jackson et al., 2012; Kaplan & Vidyashankar, 2012; Geurden et al., 2014; Keane et al., 2014). Η εξέλιξη της ανθελμινθικοαντοχής επηρεάζεται σημαντικά από εγγενείς (ευαισθησία που σχετίζεται με τα φάρμακα και τα είδη, πληθυσμός παρασίτων, γενετική μεταβλητότητα) και εξωγενείς παράγοντες (συχνότητα και ένταση θεραπείας, παρουσία και μέγεθος πληθυσμού εντός και εκτός ξενιστή, συστήματα διαχείρισης, άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες) (Wolstenholme et al., 2004). Παράλληλα, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και η «φυσική κατάσταση» των ανθεκτικών παρασίτων, δηλαδή η παραγωγή αυγών, η μολυσματικότητα, η ικανότητα επιβίωσής τους στο εξωτερικό περιβάλλον, όπως και το στάδιο εξέλιξης του βιολογικού τους κύκλου (Coles et al., 2005).

Εκτός από την αντοχή σε ένα ανθελμινθικό φάρμακο, υπάρχουν και επιμέρους μορφές αντοχής των παρασίτων, όπως η πλευρική (side-resistance), η διασταυρούμενη (cross-resistance) και η πολλαπλή (multiple-resistance) (Rang et al., 1999). Η γονιδιακή μετάλλαξη στην οποία οφείλεται η αντοχή των παρασίτων στα φάρμακα κληρονομείται και αναπτύσσεται απέναντι σε ένα ή περισσότερα φάρμακα, με όμοιο ή διαφορετικό τρόπο δράσης (Waller, 1985; Conder & Campbell, 1995).

2.1.6.3. Αντιμετώπιση ανθελμινθικοαντοχής

Από τα παραπάνω είναι φανερό η ανάγκη ανάσχεσης/μείωσης του ρυθμού ανάπτυξης της ανθελμινθικοαντοχής, ώστε όλες αυτές οι χημικές/φαρμακευτικές ουσίες να συνεχίσουν να είναι αποτελεσματικές. Για το σκοπό αυτό έχουν μελετηθεί διάφορες στρατηγικές, όμως επικρατέστερη όλων, μέχρι σήμερα, είναι αυτή της δημιουργίας πληθυσμών «refugia» που

αναφέρεται στη διατήρηση ενός ποσοστού ευαίσθητων στα ανθελμινθικά παρασίτων σε ένα πληθυσμό. Τα «ευαίσθητα» αυτά παράσιτα βρίσκονται στη βοσκή (κυρίως αυγά και προνύμφες) ή σε ξενιστές που δεν λαμβάνουν θεραπεία και αποτελούν ουσιαστικά ένα μέσο αραίωσης των ανθεκτικών γενοτύπων (Jackson & Waller, 2008). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη στρατηγική χορήγηση φαρμάκων για παράδειγμα είτε σε όλα τα ζώα της εκτροφής, αλλά σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους (*στοχευμένη αγωγή/targeted treatment*) (Besier & Love, 2003), ή μόνο σε επιλεγμένα ζώα, βάσει διαφόρων κριτηρίων (*επιλεκτική αγωγή/targeted selective treatment*) (Jackson & Waller, 2008; Greer et al., 2020).

Παράλληλα, η **αραίωση και αντικατάσταση των ανθεκτικών γενοτύπων των παρασίτων από ευαίσθητα στελέχη**, είναι δυνατό να μειώσει την πίεση επιλογής και να επιβραδύνει σταδιακά την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας (van Wyk & Schalkwyk, 1990; Sissay et al., 2006; Moussavou-Boussougou et al., 2007). Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη νεαρών ζώων, που έχουν τεχνητά μολυνθεί με ευαίσθητα στελέχη παρασίτων, τα οποία θα διασπείρουν τα ευαίσθητα παράσιτα μέσα στον λειμών (Moussavou-Boussougou et al., 2007). Η ανάγκη όμως τήρησης υψηλών επιπέδων ευζωίας σε συνδυασμό με τη δυσκολία εξασφάλισης ικανής ποσότητας ευαίσθητων προνυμφών για την τεχνητή μόλυνση των ζώων, αποτελούν σημαντικά μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής (Sissay et al., 2006) κάνοντάς την πρακτικά μη εφαρμόσιμη.

Σε ό, τι αφορά την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας, αποτελεσματική μπορεί να αποδειχθεί και η **προσωρινή απομόνωση των νεοεισαχθέντων ζώων** μέχρι την ολοκλήρωση του προγράμματος αποπαρασιτισμού τους, αφού η εξάπλωση των ανθεκτικών παρασίτων ευνοείται ιδιαίτερα από την μετακίνηση των ζώων (Leathwick et al., 2009).

Τέλος, υπό την προϋπόθεση της επαρκούς γνώσης των περιβαλλοντικών συνθηκών της περιοχής, όπως και των φυτικών ειδών που ευδοκιμούν στη συγκεκριμένη ζώνη βλάστησης (O' Connor et al., 2006), η **σωστή διαχείριση των βοσκοτόπων**, σε συνδυασμό με τις άλλες μεθόδους μπορεί επίσης να περιορίσει την χρήση των ανθελμινθικών, επιβραδύνοντας την εμφάνιση της ανθελμινθικοαντοχής (Stromberg, 1997). Συνοπτικά οι τρόποι διαχείρισης ενός λιβαδικού οικοσυστήματος ή ακόμη και των λειμώνων προς τον σκοπό αυτό αφορούν:

1. στη **μείωση του αριθμού των ζώων που βόσκουν σε μία περιοχή** (βοσκοφόρτωση) με στόχο να περιοριστεί το παρασιτικό φορτίο στο εξωτερικό περιβάλλον και κατ' επέκταση η μόλυνση/επαναμόλυνση των ζώων. Βέβαια, αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα ότι η μείωση των αυγών των παρασίτων στον βοσκότοπο συνεπάγεται και αναλογική μείωση των

αντίστοιχων προνυμφών. Η συγκεκριμένη πρακτική απαιτεί την συνεργασία των κτηνοτρόφων στην περιοχή αυτή (Stromberg, 1997).

- στην **εναλλασσόμενη βόσκηση**, όπου η βόσκηση διαφορετικών ειδών ζώων (που παρασιτούνται από διαφορετικά είδη παρασίτων) γίνεται διαδοχικά ανά περίοδο βόσκησης με στόχο και σε αυτή την περίπτωση την μείωση της μόλυνσης του περιβάλλοντος από τα παράσιτα. Η ταυτόχρονη ή εναλλασσόμενη βόσκηση διαφορετικών ειδών ζώων φαίνεται να εμποδίζει την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου των παρασίτων (Sayers & Sweeney, 2005). Μάλιστα, όσον αφορά την μόλυνση από το παράσιτο *H. contortus* έχει αποδειχθεί η αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης πρακτικής (Bairden et al., 1995; Hoste et al., 2003; Marley et al., 2006a). Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται αρκετά εκτεταμένα σε χώρες της Βόρειας και Κεντρικής Ευρώπης μεταξύ προβάτων και βοοειδών, δεν είναι όμως δυνατό να λειτουργήσει μεταξύ προβάτων και αιγών, επειδή προσβάλλονται από τα ίδια είδη παρασίτων, γεγονός που περιορίζει την εφαρμογή της τεχνικής αυτής στη χώρα μας. Περιορισμένη εφαρμογή όμως θα μπορούσε να έχει σε ημιορεινές/ορεινές περιοχές, όπου κρεοπαραγωγά βοοειδή εκτρέφονται στην ίδια περιοχή με αίγες και πρόβατα.
- στην **περιτροπική βόσκηση**, όπου τα ζώα βόσκουν ένα τμήμα του βοσκότοπου για περιορισμένο χρονικό διάστημα, με στόχο οι μολύνουσες μορφές των παρασίτων στα υπόλοιπα τμήματα να μην μπορέσουν να ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο, έως ότου τα ζώα επανέλθουν για βόσκηση στο τμήμα αυτό. Σημαντικό ρόλο στην επιτυχία της διαχείρισης αυτής φαίνεται να παίζουν η έκταση του βοσκότοπου, οι κλιματολογικές συνθήκες και η ικανότητα των προνυμφών να επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Callinan & Arundel, 1982, O' Connor et al., 2006).
- στην **επιλογή βοσκότοπου με φυτικά είδη, που δεν συνδέονται με μεγάλους αριθμούς προνυμφών**, καθώς η ικανότητα των μολυνουσών προνυμφών που προσβάλλουν τους ξενιστές φαίνεται ότι επηρεάζεται από τη μίξη των φυτικών ειδών, όπως για παράδειγμα έχει αποδειχτεί ότι η αυξημένη πυκνότητα ενός λειμώνα σε λευκό τριφύλλι (*Trifolium repens*) είναι ικανή να μειώσει τον παρασιτισμό στα ζώα (Niezen et al., 1998c, 2002a).

Μία άλλη πρακτική, η οποία παρόλο που δεν μπορεί να εφαρμοστεί στα λιβαδικά οικοσυστήματα, όπως είναι σήμερα στην Ελλάδα, αλλά μπορεί να βρει εφαρμογή στους τεχνητούς λειμώνες, είναι η **μετακίνηση των ζώων σε απαλλαγμένο από παράσιτα (καθαρό) ή με μικρό παρασιτικό φορτίο λειμώνα**, αφού προηγουμένως έχει χορηγηθεί η κατάλληλη ανθελμινθική αγωγή. Η τακτική αυτή όμως, μπορεί να φέρει αντίθετα αποτελέσματα από τα επιθυμητά, καθώς δύναται να επιταχύνει την ανθελμινθικοαντοχή (Stafford et al., 2009), αφού όλα τα αυγά και οι προνύμφες που θα μολύνουν τον λειμώνα θα προέρχονται από παράσιτα

που επιβίωσαν από την αγωγή, δηλαδή ανθεκτικά στην ανθελμινθική ουσία όπου έχει ήδη χορηγηθεί (Sutherland et al., 2002). Εναλλακτικά, προτείνεται αρχικά η μετακίνηση στον καθαρό λειμών και στη συνέχεια η αντιπαρασιτική θεραπεία (van Wyk et al., 2006, Torres-Acosta & Hoste, 2008).

2.1.6.4. Κατάλοιπα φαρμάκων στα παραγόμενα προϊόντα

Στις σύγχρονες μεθόδους εκτροφής συγκαταλέγεται και η προληπτική χορήγηση κάποιων φαρμακευτικών ουσιών (όπως τα ανθελμινθικά φάρμακα), οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως. Εξαιτίας της εκτεταμένης χρήσης τους στη ζωική παραγωγή, είναι δυνατό, τα ίδια ή οι μεταβολίτες τους να εμφανισθούν υπολειμματικά στα εδώδιμα ζωικά προϊόντα, εφόσον δεν τηρείται ο ενδεδειγμένος χρόνος αναμονής. Παρόλο που είναι ελάχιστες διεθνώς οι καταγεγραμμένες περιπτώσεις τοξικών σε στον άνθρωπο, μετά από τη κατανάλωση κρέατος ή άλλων ζωοκομικών προϊόντων από ζώα που τους είχαν χορηγηθεί αντιπαρασιτικά φάρμακα, η δυνητική τοξικότητα αρκετών από αυτά έχει περιγραφεί και σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να παραβλέπεται (Baynes et al, 1999).

Πιο συγκεκριμένα, η χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων πρέπει να γίνεται μετά από κτηνιατρική γνωμάτευση για συγκεκριμένη εφαρμογή και να ακολουθεί η συνταγογράφηση τους και σαφείς οδηγίες για τη σωστή εφαρμογή και τήρηση του χρόνου αναμονής. Η παρουσία ή απουσία των ουσιών αυτών από τα προϊόντα που καταλήγουν στον άνθρωπο για κατανάλωση, εξαρτάται αποκλειστικά από την ορθή χρήση τους από τους κτηνιάτρους, οι οποίοι πρέπει να προασπίζουν την υγεία του ζωικού κεφαλαίου και τη Δημόσια Υγεία (Crawford & Kugler, 1986). Η χρήση των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των γαστρεντερικών παρασιτώσεων, όπως για παράδειγμα οι βενζιμιδαζόλες, διέπεται από τους κανόνες της Ορθής Κτηνιατρικής Πρακτικής (Ο.Κ.Π. – Good Veterinary Practice/GVP) (Αρβανιτογιάννης & Τζούρος, 2006).

Κατάλοιπα των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι δυνατό να εμφανίζονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο κρέας και το γάλα και οι επιπτώσεις που έχουν καταγραφεί στον άνθρωπο αφορούν κυρίως σε αλλεργικές αντιδράσεις και δεν σχετίζονται με την ποσότητα του καταλοίπου (Botsoglou & Fletouris, 2000). Όταν όμως δεν τηρούνται οι χρόνοι αναμονής και πραγματοποιείται αλόγιστη χρήση των φαρμάκων, οι συγκεντρώσεις στους εδώδιμους ιστούς και τα προϊόντα εμφανίζονται σημαντικά αυξημένες, σε σημείο που μπορεί να γίνουν ακόμη και επικίνδυνες για την υγεία του ανθρώπου (Botsoglou & Fletouris, 2000).

Όσον αφορά τις τοξικές επιπτώσεις, η πιθανότητα εμφάνισης καρκινογένεσεων είναι το κυρίως ζήτημα που απασχολεί τους ερευνητές. Ωστόσο, στη διεθνή βιβλιογραφία οι αναφορές για διαπιστωμένη ή πιθανή καρκινογένεση, σχετίζονται με δραστικές ουσίες που δεν χρησιμοποιούνται στην Ελλάδα ως ανθελμινθικά φάρμακα (Hiraku et al., 2004; Berendsen et al., 2010; Liu et al., 2010; Ye et al., 2011; ΕΟΦ 2011).

Παρόλα αυτά, οι βενζιμιδαζόλες, όπως και πλήθος άλλων χημικών συνθετικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία, την γεωργία (εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, λιπάσματα) και την βιομηχανία, ρυπαίνουν σοβαρά το περιβάλλον και κατ' επέκταση επηρεάζουν δυσμενώς την υγεία του ανθρώπου (Σμοκοβίτης, 1985). Κατά την παρασκευή τους, είναι δυνατό να διοχετευτούν στο περιβάλλον, ως ρυπαντές, κατά τη διαδικασία καθαρισμού της ενεργού φαρμακευτικής ουσίας (Velagaleti et al., 2002), ενώ μετά τη χορήγησή τους στα ζώα για θεραπευτικούς λόγους, καταλήγουν στα χερσαία και τα υδάτινα οικοσυστήματα, και είτε καταναλώνονται άμεσα από τον άνθρωπο, ως κατάλοιπα ή οι μεταβολίτες τους, σε τρόφιμα φυτικής ή ζωικής προέλευσης (El-Makawy et al., 2006, Boxall et al., 2009) ή έμμεσα με την είσοδό τους στην τροφική αλυσίδα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε ότι αφορά τις επιπτώσεις των ανθελμινθικών στο περιβάλλον παρουσιάζει η ομάδα των μακροκυκλικών λακτονών (ιβερμεκτίνη, επρινομεκτίνη, ντοραμεκτίνη και μοξιδεκτίνη). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι εκτός από ενδοπαρασιτοκτόνο δράση, η συγκεκριμένη ομάδα διαθέτει και εντομοκτόνο δράση. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι δραστικές ουσίες που ανήκουν στην ομάδα αυτή, ανεξάρτητα από την οδό χορήγησής τους στα ζώα, εκκρίνονται σε μεγάλο βαθμό αναλλοίωτες στα κόπρανα, όπου και πιθανά ασκούν την εντομοκτόνο δράση τους στα ωφέλιμα έντομα που βρίσκονται στην κοπριά (κολεόπτερα, σκαθάρια κ.α.), διαταράσσοντας το βιολογικό τους κύκλο (Campbell, 1985; Wardhaugh & Rodriguez-Menendez, 1988; Sommer et al., 1992; Steel, 1993; Strong 1993; Gavalchin & Katz, 1994; Loke et al., 2000).

Παρόλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο η διαδικασία αδειοδότησης των σκευασμάτων αυτών, όσο και η χρήση τους στα ζώα, υπόκεινται σε αυστηρούς περιβαλλοντολογικούς ελέγχους από κανονισμούς και οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (VICH, 2004; EMA/CVMP/ERA/430327/2009, 2011; Κανονισμός (ΕΕ) 2019/6, 2018; COM128, 2019).

2.1.7. Εναλλακτικοί τρόποι αντιμετώπισης παρασιτώσεων

Η αυξανόμενη ανθελμινθικοαντοχή, σε συνδυασμό με την ανησυχία των καταναλωτών για πιθανά υπολείμματα των αντιπαρασιτικών χημειοθεραπευτικών ουσιών στα παραγόμενα προϊόντα, οδήγησε σταδιακά στην αναζήτηση εναλλακτικών τρόπων αντιμετώπισης των παρασιτώσεων.

Η **επιλογή ανθεκτικών ξενιστών** είναι μια από τις εναλλακτικές προσεγγίσεις που δυνητικά μπορούν να περιορίσουν τη χρήση των ανθελμινθικών φαρμάκων. Σύμφωνα με αυτήν την προσέγγιση επιλέγονται ζώα με γενετικά καθορισμένη ανθεκτικότητα στα παράσιτα. Η επιλογή αυτή για αρκετά χρόνια βασίστηκε σε δείκτες όπως η απέκκριση αυγών των νηματωδών παρασίτων ανά γραμμάριο κοπράνων, ο αιματοκρίτης και τα κλινικά συμπτώματα. Η ανθεκτικότητα των ξενιστών κληρονομείται με δείκτη κληρονομησιμότητας 0,2 έως και 0,4 (Gauly & Erhardt, 2001; Gruner et al., 2004; Safari et al., 2005; Bishop & Morris, 2007; Silva et al., 2011; de la Chevrotière et al., 2012; Pickering et al., 2012) και αξιολογείται κυρίως με βάση τον αριθμό των αυγών νηματωδών παρασίτων στα κόπρανα φυσικώς ή πειραματικώς μολυσμένων ζώων (Stear et al., 2007). Έχουν αναγνωριστεί μάλιστα και συγκεκριμένες φυλές ζώων που εμφανίζουν ανθεκτικότητα (Mugambi et al., 1996; Amarante et al., 2004; Good et al., 2006; Greer et al., 2018; Hamie et al., 2019). Με την επιλογή ανθεκτικών ζώων, επιτυγχάνεται χαμηλό παρασιτικό φορτίο και επαγωγικά, περιορισμένη μόλυνση των βοσκοτόπων και διασπορά της μόλυνσης σε άλλα ζώα (Eady et al., 2003; Kahn et al., 2003).

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές ερευνητικές προσπάθειες για την χαρτογράφηση των γονιδιακών τόπων ποσοτικών ιδιοτήτων (QTL) υπευθύνων για την ανθεκτικότητα στα παράσιτα με τη χρήση μοριακών γενετικών δεικτών μικροδορυφόρων (Beh et al., 2002; Davies et al., 2006; Gutiérrez-Gil et al., 2009; Marshall et al., 2009). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται αρκετοί QTL σε διαφορετικές περιοχές και χρωμοσώματα (OARs) για τα πρόβατα, επιβεβαιώνοντας ότι η ανθεκτικότητα/ευαισθησία στις παρασιτικές μολύνσεις είναι ένα γενετικό χαρακτηριστικό που δεν καθορίζεται από ένα μόνο γονίδιο, αλλά από ένα σύνθετο μηχανισμό και αλληλεπιδράσεις πολλών γονιδίων (OAR1, 3, 6, 14 and 20) (Beh et al., 2002; Dominik, 2005; Crawford et al., 2006; Davies et al., 2006; Matika et al., 2011; Salle et al., 2012). Σε κάποιες άλλες μελέτες, πιθανά γονίδια αναφέρθηκαν στις θέσεις OAR8 (Crawford et al., 2006), OAR13 (Beraldi et al., 2007), και OAR22 (Silva et al., 2012). Σε γενικές γραμμές έχει γίνει αποδεκτό ότι το φαινόμενο είναι πολύπλοκο και τα αποτελέσματα, επιλογής με βάση γονοτυπήσεις, αμφιλεγόμενα γι' αυτό και δεν έχει εφαρμοστεί σε μεγάλο βαθμό στην πράξη ιδιαίτερα σε χώρες όπου εφαρμόζονται συστήματα χαμηλών εισροών και ημικτατικά

συστήματα όπως στη χώρα μας (Zvinorova et al., 2016). Μελλοντικά, με τη χρήση μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) σε μελέτες γονιδιακής σάρωσης (GWAS), αλλά και τη χρήση τεχνικών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) και ανοσογενετικής είναι πολύ πιθανό η μέθοδος της γενετικής επιλογής να είναι ευρέως εφαρμόσιμη (Atlija et al. 2016; Sweeney et al., 2016; Al Kalaldehy et al., 2019a; Al Kalaldehy et al., 2019b).

Ένας εναλλακτικός τρόπος αντιμετώπισης των παρασιτώσεων, που είναι δυνατό να ενισχύσει τους αμυντικούς μηχανισμούς των ξενιστών ενάντια στα γαστρεντερικά νηματώδη παράσιτα και πιο συγκεκριμένα την ανοσολογική αντίδραση ενάντια στα *H. contortus* και *Tr. colubriformis*, είναι **μέσα από την αύξηση της ποσότητας και βελτίωση της ποιότητας των πρωτεϊνών που παρέχονται στο σιτηρέσιο των ζώων** (Kambara et al., 1993; Kahn et al., 2000; Strain & Stear, 2001; Kyriazakis & Houdijk, 2006). Η παρουσία παρασίτων στο γαστρεντερικό σύστημα των ζώων, προκαλεί μείωση της όρεξης και ανεπαρκή απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών (Roy & Sukhla, 2003), η οποία συνεπάγεται μειωμένη ανάπτυξη και παραγωγικότητα, ωστόσο, η αύξηση της περιεκτικότητας του σιτηρεσίου σε πρωτεΐνες υψηλής ποιότητας στο σιτηρέσιο των προβάτων (Steel, 2003; Knox et al., 2006; Kyriazakis & Houdijk, 2006) και των αιγών (Hoste et al., 2005), μπορεί να αυξήσει την ανθεκτικότητα των ζώων έναντι των παρασίτων. Θετικά στην ανάπτυξη αποτελεσματικής ανοσίας από τους ξενιστές, φαίνεται να επιδρούν και ιχνοστοιχεία όπως ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το μολυβδαίνιο, το σελήνιο και ο φώσφορος (Koski & Scott, 2003). Για παράδειγμα, η χορήγηση σωματιδίων χαλκού βραδείας αποδέσμευσης (Copper Oxide Wire Particles, COWP), παρουσίασαν μεγάλη αποτελεσματικότητα έναντι του *H. contortus* στα πρόβατα (Burke et al., 2004, 2006, 2007a,b; Burke & Miller, 2020), και μικρότερη, λόγω του διαφορετικού μεταβολισμού, αλλά εξίσου σημαντική και στις αίγες (Burke et al., 2006; Luginbuhl et al., 2006; Martínez-Ortiz-de Montellano et al., 2007). Τα σκευάσματα αυτά για αποφυγή τοξίκωσης στα ζώα είναι βραδείας αποδέσμευσης (Waller & Chandrawathani, 2005). Σε αυτό το σημείο, πρέπει να αναφερθεί ότι τα πρόβατα είναι περισσότερο ευαίσθητα στην τοξίκωση από χαλκό σε σχέση με τις αίγες και η χορήγηση των σκευασμάτων αυτών θα πρέπει να περιορίζεται μόνο σε περιοχές με χαλκοπενικά εδάφη.

Στο πλαίσιο της βιολογικής καταπολέμησης των παρασίτων, η **χρήση νηματοδοφάγων μυκήτων**, μπορεί να θεωρηθεί μια άλλη εναλλακτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση των παρασιτώσεων. Πρόκειται για μύκητες που «τρέφονται» με τις προνύμφες των παρασίτων, αποτελώντας με αυτόν τον τρόπο τους φυσικούς τους εχθρούς. Για παράδειγμα, ο μύκητας *Duddingtonia flagrans*, παγιδεύει τις προνύμφες των νηματωδών παρασίτων στα κόπρανα των ζώων και εν συνεχεία «τρέφεται» με αυτές (Githigia et al., 1997; Larsen, 2000; Peña et al.,

2002; Chandrawathani et al., 2004; Waller et al., 2004; Burke & Miller, 2020; Canhão-Dias et al., 2020). Συνεπώς, η καθημερινή χορήγηση, στο σιτηρέσιο των ζώων, συμπληρώματος που περιέχει σπόρια του μύκητα, τα οποία αναπτύσσονται στα κόπρανα και στις υφές του εγκλωβίζονται οι προνύμφες που εκκολάπτονται αργότερα, μπορεί να μειώσει δραστικά το παρασιτικό φορτίο (Larsen, 2000; Waller & Thamsborg, 2004; Canhão-Dias et al., 2020).

Τέλος, η χρήση βιοενεργών φυτών, πλούσιων σε δευτερογενείς μεταβολίτες, αποτελεί τον περισσότερο υποσχόμενο τρόπο αντιμετώπισης των παρασιτώσεων, ειδικά των μικρών μηρυκαστικών. Η ερευνητική δραστηριότητα τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται ιδιαίτερα έντονη στο θέμα αυτό, το οποίο και αναπτύσσεται στο επόμενο κεφάλαιο.

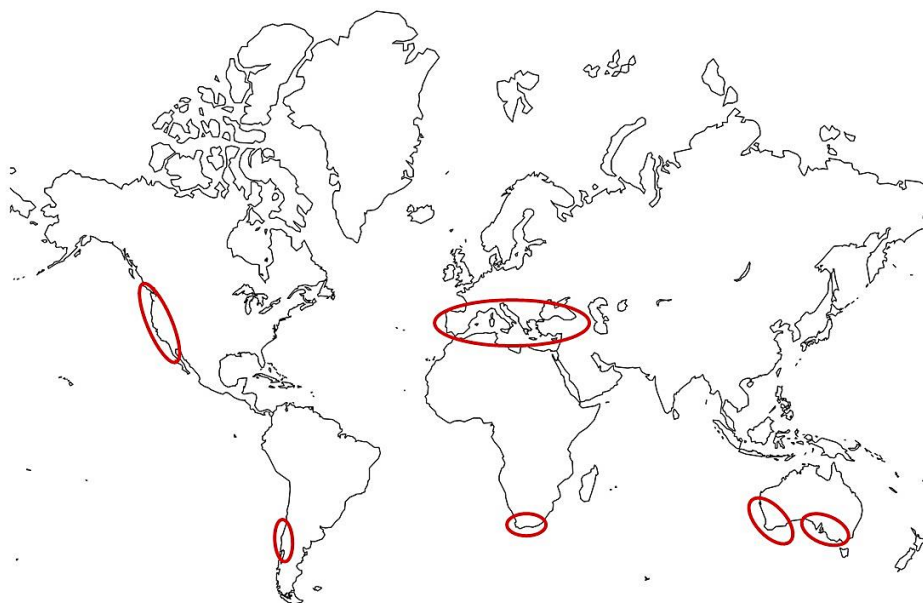
2.2. ΒΙΟΕΝΕΡΓΑ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΑ ΦΥΤΑ

2.2.1. Μεσόγειος και Μεσογειακή Χλωρίδα

Η φυσική κληρονομιά της περιοχής της Μεσογείου, την κατατάσσει σε μία από τις 200 οικολογικά πιο σημαντικές περιοχές στον κόσμο (Olson & Dinnerstein, 1998), αλλά και ένα από τα μόλις 34 παγκόσμια «κρίσιμα σημεία» (“Hot Spots”) προτεραιότητας της βιοποικιλότητας (Mittermeier et al., 2004). Και ενώ, όσον αφορά την πανίδα, πουλιά και θηλαστικά που βρίσκονται στην περιοχή της Μεσογείου, ζουν και σε άλλα γειτονικά μέρη της Ευρώπης, της Αφρικής και της Ασίας, τα περισσότερα από τα φυτικά είδη της εντοπίζονται αποκλειστικά στη Μεσόγειο. Ο εν λόγω χλωριδικός πλούτος της Μεσογείου είναι αποτέλεσμα της επίδρασης ποικίλων παραγόντων, όπως το ανάγλυφο του εδάφους, ο διαμελισμός της σε μικρότερες λεκάνες, η ιδιαιτερότητα και η ποικιλία των πετρωμάτων της, αλλά και η μακρόχρονη και έντονη παρουσία του ανθρώπου. Ο μεγάλος αριθμός των νησιών που καλύπτουν μεγάλο υψομετρικό εύρος, φαίνεται να αποτέλεσε επίσης σημαντικό παράγοντα, καθώς επέτρεψε σε νέα είδη να εξελιχθούν, ενώ παράλληλα προσέφερε καταφύγιο σε άλλα, δίνοντάς τους τη δυνατότητα επιβίωσης (Montmollin & Strahm, 2007).

Πιο συγκεκριμένα, η Μεσόγειος θεωρείται ένα από τα πιο ενδιαφέροντα σημεία του κόσμου από πλευράς βιοποικιλότητας, καθώς μόνο στη λεκάνη της Μεσογείου απαντώνται 25.000 φυτικά είδη, τη στιγμή που σε ολόκληρη την υπόλοιπη Ευρώπη (περιοχή τετραπλάσια σε έκταση), εμφανίζονται μόλις 6.000. Μάλιστα, από τα 25.000 είδη, τα μισά σχεδόν είναι ενδημικά (Vogiatzakis et al., 2006).

Βέβαια, σε αυτό το σημείο επιβάλλεται να τονιστεί ότι το μεσογειακό κλίμα, όπως είναι γνωστό με τους ήπιους βροχερούς χειμώνες, τα ξηρά, θερμά και μακρά καλοκαίρια, τις μεγάλες περιόδους ηλιοφάνειας και τις απότομες μεταβολές του καιρού, εκτός από την Μεσογειακή λεκάνη εμφανίζεται σε άλλες 4 περιοχές της γης, τα γεωγραφικά πλάτη των οποίων κατανέμονται μεταξύ 30^{ου} και 45^{ου} εκατέρωθεν του ισημερινού (Εικόνα 2.7). Η λεκάνη της Μεσογείου όμως αποτελεί την μεγαλύτερη σε έκταση των εν λόγω περιοχών, αντιπροσωπεύοντας το 60% του συνόλου τους.



Εικόνα 2.7. Εξάπλωση Μεσογειακών οικοσυστημάτων στον κόσμο

2.2.2. Βιοενεργά φυτά – Φυτά πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες

Τη στιγμή που μόνο ένα μικρό ποσοστό των φυτών έχει μελετηθεί φυτοχημικά και θεραπευτικά, φαρμακολογικές μελέτες αποδεικνύουν τη βιοδραστικότητα ορισμένων συστατικών τους και περίπου το 40% αυτών αποτελούν συστατικά εγκεκριμένων φαρμάκων (Newman & Cragg, 2007). Παράλληλα, στατιστικές μελέτες δείχνουν ότι τα συστατικά των φυτικών προϊόντων συνιστούν μια σημαντική πηγή εύρεσης νέων φαρμάκων (Henkel et al., 1999, Butler, 2004). Ιδιαίτερα σήμερα, στόχος των ερευνητών στον τομέα των φυτικών προϊόντων είναι η ανακάλυψη νέων βιοδραστικών συστατικών από φυτικά εκχυλίσματα, με προοπτική την ανακάλυψη ουσιών με φαρμακολογική αξία.

Τα φυτά, εκτός των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών, περιέχουν και πλήθος ενώσεων με πολύπλοκη μοριακή δομή, προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού τους. Στο παρελθόν, επικρατούσε η άποψη ότι αυτά τα προϊόντα, γνωστά και ως δευτερογενείς μεταβολίτες, είναι απόβλητα ή παραπροϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού των φυτών, χωρίς λειτουργικό ρόλο (Paech, 1950; Mothes, 1955; Haslam, 1986) και χρησιμότητα για την κανονική αύξηση και ανάπτυξη του φυτού. Σήμερα, όμως, έχει επιβεβαιωθεί ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον οργανισμό που τους εκκρίνει, καθώς λειτουργούν ως σημειοχημικές ή τοξικές ουσίες, ή ακόμη και ως ρυθμιστές συγκεκριμένων βιολογικών λειτουργιών (Ιγνατιάδου-Ραγκούση, 1998).

Η παραγωγή τους, συνδέεται στενά με τις μηχανικές ιδιότητες των φυτικών ιστών, καθώς και την ύπαρξη και λειτουργία αμυντικών μηχανισμών απέναντι σε έντομα / ζώα / μικρόβια / μύκητες / ιούς (Appel, 1993, Harborne & Williams, 2000). Επίσης, φαίνεται να προστατεύουν τα φυτά από την επιβλαβή υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ παράλληλα συνδέονται άρρηκτα και με πλήθος οικολογικών ρόλων, όπως η εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων, ο ανταγωνισμός με άλλα είδη και η προσέλκυση εντόμων για λόγους γονιμοποίησης (επικονίαση) (Harborne, 1998; Seigler, 1998; Harborne & Williams, 2000; Parr & Boldwell, 2000, Webb, 2006).

Πέρα όμως από το σημαντικό προστατευτικό ρόλο (φυσική προστασία μέσω αισθητηριακής απώθησης, χημική προστασία κ.α.) των δευτερογενών μεταβολιτών για το ίδιο το φυτό, ορισμένοι από αυτούς παρουσιάζουν ευεργετική (ενίοτε όμως και τοξική) δράση για τα ζώα και τον άνθρωπο. Αναφορικά με τον άνθρωπο, ορισμένες από τις ενώσεις αυτές, εξαιτίας της χημικής δομής τους, έχουν την ιδιότητα να ασκούν προστατευτική δράση έναντι πλήθους ασθενειών. Αναφέρονται ενδεικτικά, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος (Kinsella et al., 1993; Rise-Evans et al., 1996; Lionis et al., 1998; Trichopoulou et al., 2000; Moure et al., 2001; Oleszek, 2003; Dekker, 2004). Τέτοιου είδους ικανότητες των βιοενεργών φυτών, ή αλλιώς των πλούσιων σε δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών, αποδίδονται στην αντιοξειδωτική και όχι μόνο δράση των φαινολικών συστατικών και των τερπενοειδών ενώσεων (Pokorný, 1991; Rice-Evans et al., 1997), που οι άνθρωποι εδώ και εκατοντάδες χρόνια χρησιμοποιούν εμπειρικά (Gurib-Fakim, 2006). Αυτά τα ευεργετικά για την υγεία συστατικά καλούνται συχνά **λειτουργικά συστατικά** (*functional ingredients*), **“nutraceuticals”** (από τις λέξεις *nutrients* και *pharmaceuticals*) και **βιοδραστικές ενώσεις** (*bioactive compounds*) και συνήθως συναντώνται στα φυτά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Παρ’ όλα αυτά, υπάρχουν και ενώσεις που όταν εισέρχονται στον οργανισμό σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικές και συμβάλουν ενίοτε και στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων (Dekker, 2004).

Όσον αφορά τη συγκέντρωση των δευτερογενών μεταβολιτών στα διάφορα φυτικά είδη, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι έχει παρατηρηθεί μεγάλη μεταβλητότητα α) μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών του ίδιου φυτικού είδους, β) μεταξύ ατόμων της ίδιας ποικιλίας και γ) ανάμεσα στα διαφορετικά μέρη του ίδιου φυτού (Ryan et al., 1999b; Malisch et al., 2015; Yahia et al., 2020). Οι παράγοντες που επηρεάζουν αυτές τις συγκεντρώσεις σχετίζονται με τη φυσιολογία των φυτών, το στάδιο ανάπτυξης του φυτού και το περιβάλλον (Kotze et al., 2009; Theodoridou et al., 2011; Azuhwi et al., 2013; Grabber et al., 2014). Τα επίπεδα των δευτερογενών μεταβολιτών εν γένει αυξάνονται καθώς το φυτό ωριμάζει (Barry, 1989, Kozukue & Friedman, 2003, Nair et al., 2006, Siskos et al., 2007). Σε κάποιες περιπτώσεις βέβαια, η εποχική μεταβολή σχετίζεται με παράγοντες όπως η θερμοκρασία και όχι τόσο με το

στάδιο ανάπτυξης του φυτού (Mathams & Sutherland, 1952, Salem 2005, Assefa et al., 2008). Για παράδειγμα το θερμικό στρες, σύμφωνα με τους Rivero et al. (2001) ενεργοποιεί τους μηχανισμούς βιοσύνθεσης φαινολικών και αναστέλλει την οξείδωσή τους. Μάλιστα οι τιμές αυτές φαίνεται να μεταβάλλονται ακόμη και ημερησίως (Wink, 1992). Διαφορές στην φαινολική σύνθεση έχουν παρατηρηθεί και μεταξύ γεωγραφικών περιοχών (Yahia et al., 2020), καθώς το έδαφος, η ρύπανση, η βόσκηση και οι πρόσφατες βλάβες από έντομα επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά (Barry & Manley, 1986, Barry 1989, Olson & Roseland 1991, Edwards 1999, Nair et al., 2006, Staudt & Lhoutellieer, 2007, Figueiredo et al., 2008). Τέλος, όσον αφορά την παραλλακτικότητα στα επίπεδα αυτών των ουσιών εντός του ίδιου φυτού, έχει παρατηρηθεί, τα υψηλότερα ποσοστά φαινολικών ενώσεων να εμφανίζονται στα εκχυλίσματα φύλλων (Yahia et al., 2020). Σύμφωνα με τους Malisch et al. (2015) μάλιστα, οι προανθοκυανιδίνες στα φύλλα είδους ονοβρυχίδας (*Onobrychis viciifolia*), φάνηκε να είναι σχεδόν τριπλάσιες από αυτές στα στελέχη της. Βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ανάλογα με τα θρεπτικά στοιχεία που βρίσκονται σε περίσσεια σε ένα φυτό, παράγονται και οι αντίστοιχοι δευτερογενείς μεταβολίτες. Στην περίπτωση δηλαδή ανεπάρκειας διαθέσιμου άνθρακα (συνθήκες σκιάς), η περίσσεια αζώτου οδηγεί προς την κατεύθυνση σύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχουν άζωτο στο μόριό τους (αλκαλοειδή). Αντίθετα, η έλλειψη αζώτου φαίνεται να οδηγεί στην σύνθεση φαινολικών ουσιών, οι οποίες περιέχουν στο μόριό τους αποκλειστικά άνθρακα (Gershenzon, 1984).

Παρότι όλα τα φυτικά είδη περιέχουν ενεργούς δευτερογενείς μεταβολίτες σε μικρές ή μέτριες ποσότητες, μονάχα ένα μικρό ποσοστό αυτών περιέχει τέτοιες ενώσεις σε μεγάλες ποσότητες, γι' αυτό και χαρακτηρίζονται ως **φυτά πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες** (Gershenzon, 2002). Μάλιστα, μέχρι στιγμής περισσότεροι από 80.000 δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν περιγραφεί και πάνω από 100.000 πιστεύεται ότι υπάρχουν στα φυτά, γεγονός που συνεπάγεται μεγάλη ποικιλομορφία ενώσεων (Acamovic & Brooker, 2005). Η συνήθης κατάταξή τους βασίζεται στα βιοσυνθετικά μονοπάτια από όπου προέρχονται, και βάσει αυτού χαρακτηρίζονται ως **τερπένια/τερπενοειδή, αζωτούχες βάσεις, φαινολικές ενώσεις και ταννίνες** (Seigler et al., 1998).

2.2.3. Ταξινόμηση δευτερογενών μεταβολιτών

2.2.3.1. Τερπένια/Τερπενοειδή

Σύμφωνα με τους [Trapp & Croteau \(2001\)](#), τα τερπένια συνιστούν τη μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών του φυτικού βασιλείου. Είναι μόρια αδιάλυτα στο νερό, καθώς είναι λιπιδιακής φύσης και σε αυτά περιλαμβάνονται τα *αιθέρια έλαια*, τα οποία αποτελούνται από πτητικά μόρια που προσδίδουν στα φυτά το χαρακτηριστικό τους άρωμα, τα *στεροειδή* ([Ncube, et al., 2008](#)), με ρόλο ορμονικό ή ρυθμιστικό του ενδοκρινικού συστήματος των ζώων ([Speranza, 2010](#)) και τα *καροτενοειδή* που διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και ως χρωστικές συμμετέχουν ενεργά στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης.

2.2.3.2. Αζωτούχες Βάσεις

Η ομάδα των αζωτούχων δευτερογενών μεταβολιτών, περιλαμβάνει κυρίως ενώσεις, οι οποίες προέρχονται από αμινοξέα. Είναι μια ετερογενής ομάδα, η οποία περιλαμβάνει τα *αλκαλοειδή* (ευδιάλυτες ενώσεις στο νερό, με αλκαλικές ιδιότητες, που εμπεριέχουν άζωτο σε έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο ποικίλων μορφών), τις *μπεταλαίνες* (χρωστικές που δίνουν χαρακτηριστικούς χρωματισμούς σε όργανα και ιστούς, όπως είναι η μπετανίνη των κονδύλων των τεύτλων), τα μη *πρωτεϊνικά αμινοξέα*, τις *αμίνες* (ουσίες με μια τουλάχιστον αμινομάδα στο μόριό τους, όπως η ισταμίνη και η πουτρεσκίνη), οι *θειογλυκοζίτες* (αζωτούχες ενώσεις που περιέχουν θείο, το οποίο υπό κατάλληλες συνθήκες, μπορεί να απελευθερωθεί ως ισοθειοκυανικό ή θειοκυανικό ιόν), τα *κνανογόνα γλυκοσίδια* (αζωτούχες ενώσεις, ενωμένες με ένα σάκχαρο, οι οποίες υπό την επίδραση κατάλληλων ενζύμων απελευθερώνουν –CN) και *αμυντικές πρωτεΐνες* (πολυπεπίδια – εξειδικευμένοι αναστολείς με αμυντικό προορισμό) ([Καραμπουρνιώτης, 2003](#)).

2.2.3.3. Φαινολικές ενώσεις

Ως προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού, οι φαινολικές ενώσεις δεν ακολουθούν τους γνωστούς μεταβολικούς δρόμους του πρωτογενούς μεταβολισμού, ούτε αποτελούν βασικά μοριακά δομικά συστατικά του φυτικού κυττάρου. Σχηματίζονται σε συγκεκριμένους ιστούς ή και όργανα, σε ποικίλα στάδια ανάπτυξης. Από βιοχημική άποψη, είναι οι ενώσεις που προέρχονται από τα μεταβολικά μονοπάτια του σικιμικού οξέος και του φαινυλοπροπανίου ([Strack, 1997; Ryan et al., 1999a](#)). Με τον όρο “φαινολικές ενώσεις”, εννοούμε συνήθως την

κατηγορία των μορίων που αποτελούνται από έναν βενζολικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Είναι ενώσεις υδατοδιαλυτές, όταν είναι υπό τη μορφή γλυκοζίτη (ενωμένη με σάκχαρα) και εντοπίζονται στο κενοτόπιο των φυτικών κυττάρων (Harborne, 1990).

Έχουν αναγνωρισθεί περισσότερες από 8.000 φαινολικές ενώσεις (Soobrette et al., 2005), των οποίων η κατηγοριοποίηση στη διεθνή βιβλιογραφία γίνεται με ποικίλους τρόπους (Harborne 1998; Urquiaga et al., 2000; Scalbert et al., 2002; Robbins 2003). Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τους Lee & Widmer (1996), τα φαινολικά συστατικά ομαδοποιούνται με βάση τα χαρακτηριστικά του ανθρακικού τους σκελετού, και ειδικότερα με τον αριθμό των βενζολικών τους δακτυλίων. Με βάση την κατάταξη αυτή, διακρίνονται σε *απλές φαινόλες* (1 αρωματικός δακτύλιος, π.χ. φαινολικά οξέα), *πολυφαινόλες με 2 αρωματικούς δακτυλίους* (π.χ. φλαβονοειδή) και *πολυφαινόλες με τρεις ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους*. Οι τελευταίες κατά κύριο λόγο σχηματίζονται ως προϊόντα πολυμερισμού απλών μορίων που φέρουν μια φαινολική ομάδα (π.χ. ταννίνες).

2.2.3.3.1. Ταννίνες

Ο όρος ταννίνες είναι κατά βάση λειτουργικός όρος, με συνέπεια να μην περιγράφει μια ευδιάκριτη ομάδα ενώσεων. Ετυμολογικά, η ονομασία “ταννίνη” προέρχεται από την κελτική λέξη “tan” που σημαίνει βελανιδιά, στα φύλλα της οποίας σχηματίζονται μεγάλες ποσότητες ταννινών. Αρχικά ο όρος χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τις ουσίες που διαθέτουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν τα ακατέργαστα ζωικά δέρματα σε κατεργασμένα άσηπτα με τη διαδικασία της δέψης, ως αποτέλεσμα της ικανότητάς τους να συνδέονται με τις πρωτεΐνες του κολλαγόνου του δέρματος των ζώων (Gustavson, 1956).

Από χημική άποψη, οι ταννίνες αποτελούν δευτερογενή φυτικά προϊόντα που απαντώνται στα κυτταρικά τοιχώματα ή εντός των κενοτοπίων των μίσχων, των φύλλων, των ανθέων, ή των σπόρων, κυρίως στα δικοτυλήδονα φυτά (Barry, 1989) και έχουν την ικανότητα να δίνουν σταθερές ενώσεις με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Ο σχηματισμός των συμπλόκων ταννινών-πρωτεϊνών και η κατακρήμνισή τους, εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις και των δύο συστατικών, όπως επίσης και από τη θερμοκρασία και το pH του διαλύματος. Όσον αφορά το σχηματισμό των αδιάλυτων συμπλόκων τους, σημαντικό ρόλο παίζει ο τύπος και το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες με υψηλή συγκέντρωση προλίνης επιδρούν σημαντικά στη διαλυτοποίηση των ταννινών (Hagerman et al., 1978). Βέβαια, για να

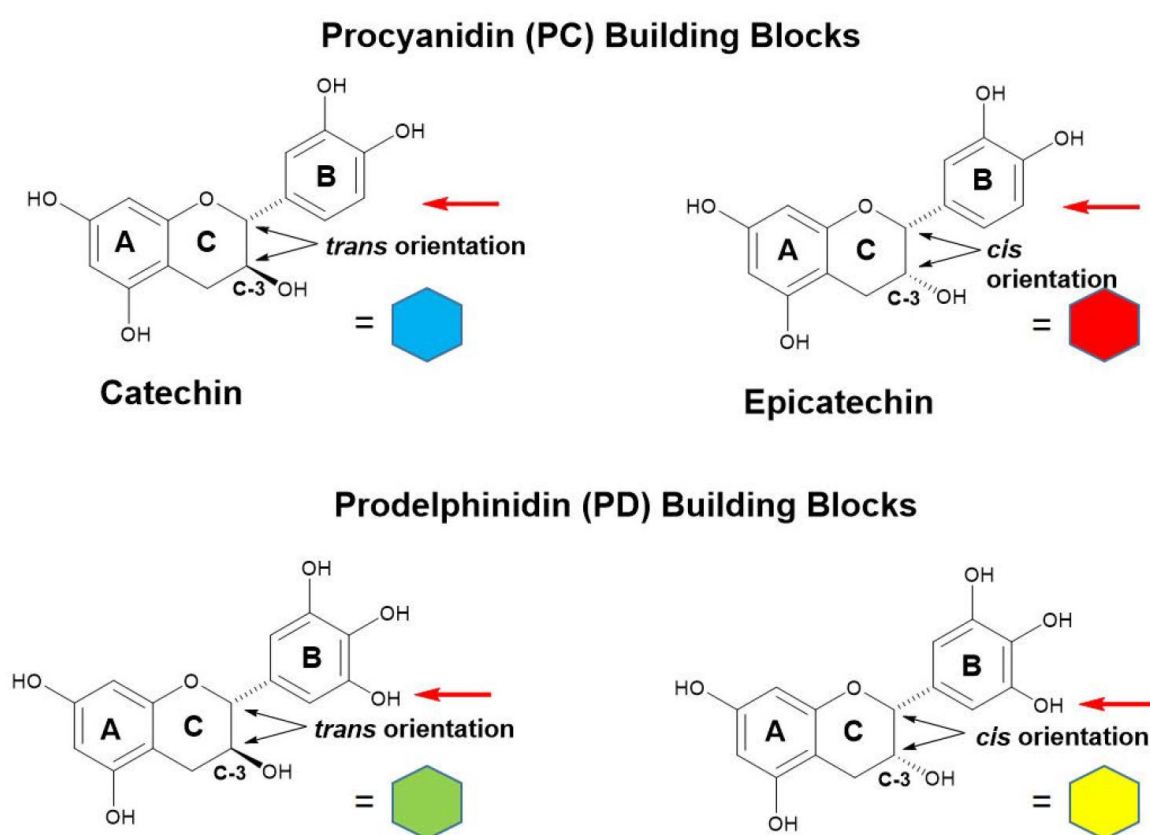
δώσουν σταθερές ενώσεις οι ταννίνες με τις πρωτεΐνες, πρέπει να είναι ογκώδεις μέχρι ενός σημείου, αφού τα μεγαλύτερα μόρια ενδέχεται να μη μπορούν να ενωθούν με τις δραστικές θέσεις των πρωτεϊνών. Το μοριακό βάρος των δραστικών ταννινών κυμαίνεται από 600 έως 3.500 μονάδες (Ribéreau-Gayon et al., 2000; Κοτσερίδης, 2005).

Οι ταννίνες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: τις *φλοροταννίνες*, τις *υδρολόμενες* και τις *συμπυκνωμένες*. Οι πρώτες (*φλοροταννίνες*) σχηματίζονται ολοκληρωτικά με πολυμερισμό της φλοροογλυκινόλης ή από μονάδες φλοροογλυκινόλης υποκατεστημένες από αλογόνα. (Haslam, 1979; Swain et al., 1979). Στις *υδρολόμενες* ταννίνες ανήκουν δυο τάξεις, οι εστέρες της γλυκόζης με το γαλλικό οξύ και οι εστέρες της γλυκόζης με ένα διμερές του γαλλικού οξέος. Με την υδρόλυση παράγεται ελλαγικό οξύ. Τέλος, οι *συμπυκνωμένες* αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα και προέρχονται από τον πολυμερισμό απλών κατεχινών ή γαλλοκατεχινών (εστέρων κατεχίνης με γαλλικό οξύ), δημιουργώντας διμερή και στη συνέχεια ανώτερα ολιγομερή με δεσμούς -C-C- 4-8 ή 6-8. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι σχηματίζουν αδιάλυτα ιζήματα γνωστά ως φλοιοβαφένια. Το μοριακό τους βάρος είναι μεγαλύτερο από 3.000, καθώς αποτελούνται από περισσότερα από δέκα μόρια φλαβονολών (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

2.2.3.3.1.1. Συμπυκνωμένες Ταννίνες

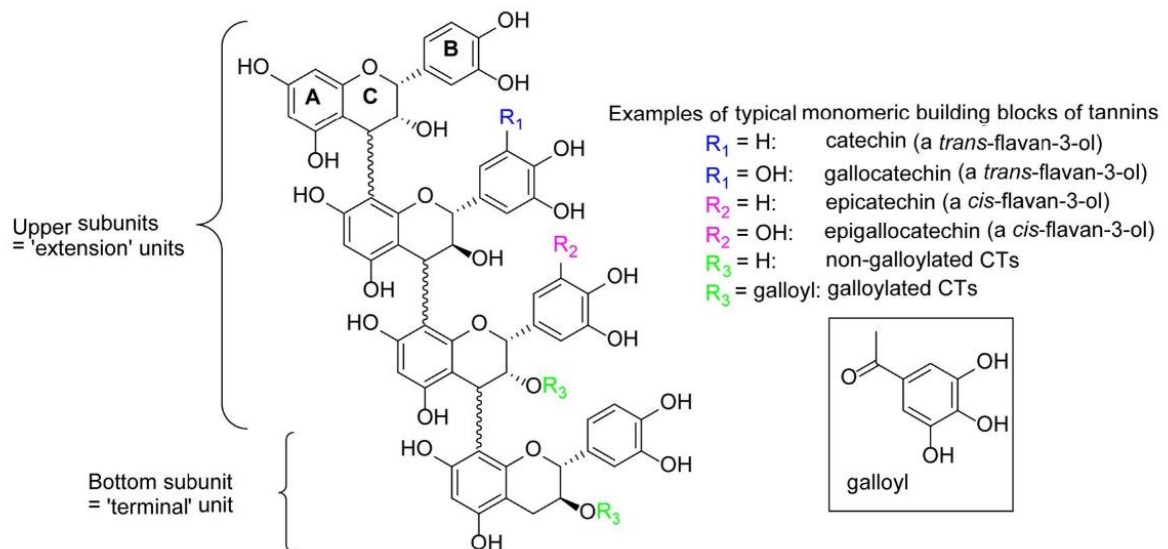
Παρά την ευρεία εξάπλωσή τους στο φυτικό βασίλειο, υπάρχουν μεγάλα κενά γνώσης όσον αφορά την δομή και τους μηχανισμούς δράσης των ταννινών της κατηγορίας αυτής. Από την έως τώρα γνώση, οι συμπυκνωμένες ταννίνες ή αλλιώς προανθοκυανιδίνες αποτελούνται από φλαβανο-3όλες, και όταν αποπολυμερίζονται σχηματίζουν κυανιδίνες ή δελφινιδίνες, που ταξινομούνται περαιτέρω σε προκυανιδίνες και προδελφινιδίνες (Bruneton, 1999; Hoste et al., 2006; Mueller-Harvey et al., 2019) και χαρακτηρίζονται με βάση το στοιχείο υδροξυλίωσης, τη στερεοχημεία τους, τις λειτουργικές ομάδες (functional groups) και τον τρόπο που συνδέονται (interflavan-3-ol linkages) (Haslam, 1998; Schofield et al., 2001; Hümmel & Schreier, 2008; Zeller, 2019). Οι περισσότερες από τις συμπυκνωμένες ταννίνες που εμφανίζονται στα πιο κοινά φυτικά είδη (*Lotus corniculatus* L., *Lotus pedunculatus*, *Onobrychis viciifolia*, *Lespedeza cuneata* κ.α.) συντίθενται από τέσσερις υπομονάδες φλαβανο-3όλων (**Εικόνα 2.8.**), κατεχίνες ή επικατεχίνες, που σχηματίζουν τις προκυανιδίνες και από γαλλοκατεχίνες ή επιγαλλοκατεχίνες που έχουν ένα επιπλέον OH στον C5 και σχηματίζουν τις προδελφινιδίνες (Zeller, 2019). Ένα παράδειγμα μορίου συμπυκνωμένης ταννίνης αποτελούμενο από τέσσερις υπομονάδες φλαβανο-3όλων (flavan-3-ol subunits) παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2.9.** όπως εμφανίζεται σε ανασκόπηση των Mueller et al. (2019).

Οι κατεχίνες με τις επικατεχίνες, όπως και οι γαλλοκατεχίνες με τις επιγαλλοκατεχίνες διαφέρουν μονάχα ως προς τη στερεοδομή τους, δηλαδή τον χωρικό προσανατολισμό (spatial orientation) της ομάδας του υδροξυλίου (OH) στον άνθρακα C3. Επίσης, η στερεοχημεία των C2 και C3 στον C-δακτύλιο αυτών των υπομονάδων παρουσιάζει ακόμη μια διαφορά, καθώς τα C2 και C3 στην επικατεχίνη και την επιγαλλοκατεχίνη έχουν προσανατολισμό *cis*, ενώ στην κατεχίνη και τη γαλλοκατεχίνη *trans* (Zeller, 2019).



Εικόνα 2.8. Υπομονάδες φλαβανο-3όλων – δομικών στοιχείων των συμπυκνωμένων ταννινών των πιο κοινών φυτικών ειδών που βόσκονται.

(Πηγή: Zeller, 2019)



Εικόνα 2.9. Παράδειγμα μορίου συμπυκνωμένων ταννινών που αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες φλαβανο-3όλων (μονομερή δομικά στοιχεία). Οι προκυανιδίνες αποτελούνται από κατεχίνες ή επικατεχίνες και οι προδελφινιδίνες από γαλλοκατεχίνες ή επιγαλλοκατεχίνες.

(Πηγή: [Mueller et al., 2019](#))

2.2.4. Βιοενεργά φυτά και ανθελμινθική δράση

Τα βιοενεργά φυτά χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως φυτοθεραπευτικές ουσίες εναντίον των παρασίτων. Η χρήση τους βασίζεται σε παραδοσιακές συνταγές καταπολέμησης νοσημάτων που απαντώνται σε πάρα πολλές χώρες ([Hammond et al., 1997](#); [Sandoval-Castro et al., 2012](#)). Από τα φυτά αυτά ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν όσα έχουν τη δυνατότητα της συνδυασμένης χρήσης τους τόσο ως συστατικά της διατροφής, όσο και ως φάρμακα. Είναι δε γνωστά με τον αγγλικό όρο «nutraceutical plants» ή απλώς «nutraceuticals» ([Waller and Thamsborg, 2004](#); [Hoste et al., 2006](#); [Alonso-Díaz et al., 2010](#); [Hoste et al 2015](#)). Σε σύγκριση με τα φυτικά και τα συνθετικά φάρμακα, τα nutraceuticals, δεν επιβάλλονται αλλά προσφέρονται στα ζώα για μεγάλα χρονικά διαστήματα και η δράση τους εξαρτάται από την εθελοντική πρόσληψή τους ([Hoste et al., 2015](#)). Η δραστηριότητα των φυτών αυτών οφείλεται στην παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών και κυρίως διαφόρων κατηγοριών των πολυφαινολών ([Terrill et al., 2012](#); [Hoste et al., 2015, 2016](#)).

Το πιο μελετημένο μοντέλο nutraceuticals στην κτηνιατρική παρασιτολογία αφορά στις περιεχόμενες ταννίνες των φυτικών ειδών και στη δράση τους ενάντια στα γαστρεντερικά νηματώδη των μικρών μηρυκαστικών ([Hoste et al., 2015](#)). Μάλιστα, τα πρώτα στοιχεία

προήλθαν από έρευνα στη Ν. Ζηλανδία, όπου αναφέρθηκε σημαντική μείωση των αυγών των γαστρεντερικών παρασίτων στα κόπρανα προβάτων που έβοσκαν σε λιβάδια, όπου φύονταν *Lotus corniculatus*, *L. pedunculatus*, *Hedysarum coronarium* και *Onobrychis viciifolia*, τα οποία και περιείχαν συμπυκνωμένες ταννίνες (Niezen et al., 1995, 1998, 2002b). Αυτά τα στοιχεία, οδήγησαν στην αναζήτηση νέων φυτικών ειδών που περιείχαν τους ίδιους δευτερογενείς μεταβολίτες και πιθανά εμφάνιζαν δράση έναντι των γαστρεντερικών νηματωδών των μικρών μηρυκαστικών. Ακολούθησαν εκτεταμένες μελέτες που στόχευαν στη διερεύνηση της χρήσης των nutraceutical-φυτών ενάντια σε άλλα είδη παρασίτων, με άλλους ξενιστές και στον εντοπισμό άλλων βοτανικών οικογενειών με παρόμοιες ιδιότητες (Sandoval-Castro et al., 2012).

Σχετικά πρόσφατες μελέτες (Osoro et al., 2009; Terrill et al., 2009; Celaya et al., 2010; Landau et al., 2010; Marie-Magdeleine et al., 2010; Hussain et al., 2011; Maphosa & Masika, 2012a, b; Moreno et al., 2012; Nery et al., 2012), αναδεικνύουν την ανθελμινθική δράση των πλούσιων σε ταννίνες φυτών και ζωοτροφών στα μικρά μηρυκαστικά. Η εν λόγω ανθελμινθική δράση αφορά στη μείωση του αριθμού των L₃ μολυνουσών προνυμφών ή στη μείωση της γονιμότητας των παρασίτων και της παραγωγής αυγών, σε φυσικά μολυσμένες αίγες που καταναλώνουν μέτριες συγκεντρώσεις φυτών πλούσιων σε δευτερογενείς μεταβολίτες (Min et al., 2005; Paolini et al., 2005; Hoste et al., 2006; Shaik et al., 2006; Moreno-Gonzalo et al., 2012).

Η ανθελμινθική δράση που παρουσιάζουν οι συμπυκνωμένες ταννίνες φαίνεται να είναι ανάλογη της συγκέντρωσής τους στα φυτά και κατ' επέκταση στα εκχυλίσματά τους. *In vitro* πειραματισμοί έδειξαν ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ταννινών στα εκχυλίσματα, παρουσιάζουν και την πιο αποτελεσματική δράση έναντι παρασίτων (Manolaraki et al., 2010; Moreno-Gonzalo et al., 2012, 2013a,b), ενώ και σε *in vivo* πειραματισμούς, προστίθεται πάντα στο σιτηρέσιο των ζώων η μέγιστη δυνατή ποσότητα ταννινών.

Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των συμπυκνωμένων ταννινών έναντι των παρασίτων ποικίλει και καθορίζεται όχι μόνο από τη συγκέντρωσή τους στα φυτά, αλλά και από την ποιότητά τους. Για παράδειγμα, συμπυκνωμένες ταννίνες με υψηλά ποσοστά προδελφινιδίων και υψηλές τιμές Μέσου Βαθμού Πολυμερισμού (mDP/mean Degree of Condensed Tannin Polymerization) εμφανίζουν καλύτερη ανθελμινθική δράση (Mueller et al., 2019). Σε σχετικές *in vitro* δοκιμές (Brunet & Hoste 2006; Quijada et al., 2015; Desrues et al., 2016; Ramsay et al., 2016) διερευνήθηκε η επίδρασή τους στη μετανάστευση προνυμφών L₃ και τη κινητικότητα των L₄ του παρασίτου *Ascaris suum*, καθώς και τη δυνατότητα πρόσληψης τροφής των L₁ και τη κινητικότητα των ενηλίκων *Ostertagia ostertagi* ή *Cooperia oncophora*, όπως επίσης και

την έκδυση των προνυμφών L₃ των *H. contortus* και *Tr. colubriformis*. Μάλιστα κατά τους [Mueller et al. \(2019\)](#) αυτή η ιδιότητα μπορεί να εξηγήσει και τα αποτελέσματα άλλων *in vivo* πειραματισμών σε πρόβατα και αίγες, όπου τους χορηγήθηκαν φυτικά είδη πλούσια σε συμπυκνωμένες ταννίνες με υψηλά ποσοστά προδελφινιδίων (*Lotus pedunculatus*, *Onobrychis viciifolia*, *Hedysarum coronarium*, *Corylus* spp), αλλά και υψηλές τιμές mPD (*Lespedeza cuneata*). Δυστυχώς όμως πολλές δημοσιεύσεις που αφορούν την επίδραση των βιοενεργών φυτών κατά των παρασίτων, περιέχουν ελλιπείς πληροφορίες σχετικά με το χημικό προσδιορισμό/σύσταση των βιοενεργών συστατικών τους, δυσχεραίνοντας την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και τον συσχετισμό των δευτερογενών μεταβολιτών με τις παρατηρούμενες αντιπαρασιτικές ιδιότητες ([Hoste et al., 2006](#)).

Επιπλέον, η κατανάλωση φυτών πλούσιων σε διάφορες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών (όπως είναι για παράδειγμα οι διάφορες φαινολικές ενώσεις), φαίνεται να βελτιώνει την ανθεκτικότητα των ζώων στα παράσιτα χωρίς να είναι σε βάρος της παραγωγικότητάς τους, όπως έχει προκύψει σε συγκριτικές μελέτες με μάρτυρες που λάμβαναν συμβατικό σιτηρέσιο ([Niezen et al., 1998b](#); [Marley et al., 2006b](#); [Athanasiadou et al., 2007](#)). Παρόλο που οι εν λόγω μηχανισμοί δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως, φαίνεται ότι μια πλούσια σε ενεργούς δευτερογενείς μεταβολίτες διατροφή μπορεί να αποδειχθεί ωφέλιμη.

Όλες αυτές οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν ως συνέχεια των πρώτων στοιχείων που προήλθαν από έρευνα στην Νέα Ζηλανδία και ανέφεραν σημαντική μείωση των αυγών στα κόπρανα ζώων που κατανάλωναν κατά τη βόσκηση φυτικά είδη πλούσια σε συμπυκνωμένες ταννίνες (*Lotus corniculatus*, *L. pedunculatus*, *Hedysarum coronarium*, *Onobrychis viciifolia*), ([Niezen et al., 1995, 1998b, 2002b c](#)), οδήγησαν α) στην ανάπτυξη *in vivo* και *in vitro* μεθόδων αξιολόγησης των φυτών ως πιθανά nutraceuticals που θα αναλυθεί σε επόμενο κεφάλαιο, όπως επίσης και β) στον καλύτερο ορισμό των διαφορών μεταξύ των δράσεων των nutraceuticals, των φυτοθεραπευτικών και των συνθετικών χημικών φαρμάκων ([Hoste et al., 2015](#)).

2.2.5. Μηχανισμοί δράσης ταννινών

Όσον αφορά τον τρόπο με τον οποίο οι ταννίνες επιδρούν στα παράσιτα, έχουν αναπτυχθεί αρκετές υποθέσεις. Οι δυο επικρατέστερες αφορούν την **άμεση** και την **έμμεση** δράση αυτών.

Η **άμεση** δράση των ταννινών, βασίζεται σε φαρμακολογικού τύπου αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διάφορων πολυφαινολών και των διαφορετικών σταδίων των γαστρεντερικών νηματωδών και συνδέεται με την πιθανότητα οι ταννίνες να επηρεάζουν βασικές βιολογικές λειτουργίες

των παρασίτων, όπως η αναστολή της κινητικότητας, της διατροφής, της ανάπτυξης και της επιβίωσης των παρασίτων (Taylor & Murant, 1966; Athanasiadou et al., 2001a; Molan et al., 2003c; Paolini et al., 2004). Η υπόθεση της άμεσης δράσης υποστηρίζεται από αποτελέσματα κυρίως *in vitro* πειραματισμών και μερικών *in vivo* μελετών (Athanasiadou et al., 2001a, 2005; Brunet et al., 2008). Για παράδειγμα, εκχυλίσματα από τα *Lotus corniculatus*, *Hedysarum coronarium* και *Onobrychis viciifolia* φαίνεται να μειώνουν το ποσοστό των αυγών που εξελίσσονται σε προνύμφες, την ικανότητα εκκόλαψης αυγών και την κινητικότητα των προνυμφών τρίτου σταδίου (Molan et al., 2000). Μάλιστα, με τον κατάλληλο πειραματικό σχεδιασμό, που επιτρέπει τη διερεύνηση της ανθελμινθικής επίδρασης στα παράσιτα των προβάτων, τα *in vitro* αποτελέσματα συχνά επαληθεύονται και από *in vivo* μελέτες (Athanasiadou et al., 2000a,b, 2001a; Tzamaloukas et al., 2005).

Από την άλλη πλευρά, οι ταννίνες θα μπορούσαν να δρουν *έμμεσα*, βελτιώνοντας την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή απέναντι στα παράσιτα (Kahn & Diaz-Hernandez, 2000). Η υπόθεση της έμμεσης δράσης των ταννινών, προϋποθέτει μια πιθανή βελτίωση της αντίστασης του ξενιστή (Hoste et al., 2015). Εξαιτίας της ικανότητας των ταννινών να δημιουργούν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες, έχουν τη δυνατότητα να τις προστατεύουν από τη διάσπασή τους στη μεγάλη κοιλία, με αποτέλεσμα την αύξηση του κλάσματος των by-pass πρωτεϊνών και την καλύτερη απορρόφηση αμινοξέων από το λεπτό έντερο (Min et al., 2003; Waghorn & McNabb, 2003). Με αυτόν τον τρόπο, βελτιώνεται η ομοιοστάση των ξενιστών και η ανοσολογική απόκριση ενάντια στα παράσιτα (Coop & Kyriazakis, 2001), ενώ παρατηρείται και καλύτερη απορρόφηση των πρωτεϊνών που λαμβάνονται από τους ξενιστές, συμβάλλοντας στη βελτίωση της υγείας των ζώων (Min et al., 2003; Waghorn & McNabb, 2003). Πιθανώς, αυτό να συμβαίνει και μέσω μείωσης της ευαισθησίας και αύξησης της ανοχής (resilience/tolerance) των ξενιστών στον παρασιτισμό (Hoste et al., 2006). Οι μελέτες που έχουν ασχοληθεί με τον έμμεσο τρόπο δράσης των ταννινών και τις παραμέτρους που σχετίζονται με την ανοσία των ξενιστών είναι λίγες και τα αποτελέσματά τους ασαφή (Athanasiadou et al., 2001b; Niezen et al., 2002b; Paolini et al., 2003; Athanasiadou et al., 2005; Tzamaloukas et al., 2005). Έχει επίσης παρατηρηθεί αυξημένη διήθηση του εντερικού βλεννογόνου από ανοσοκύτταρα [π.χ. σιτευτικά κύτταρα (mucosal mast cells), και σφαιριδιολευκοκύτταρα (globule leucocytes)] σε αρνιά πειραματικά μολυσμένα με *Teladorsagia circumcincta*, όταν αυτά διατρέφονταν με σιτηρέσιο πλούσιο σε συμπυκνωμένες ταννίνες (με τη χρήση των *Hedysarum coronarium* και *Cichorium intybus*). Η παρουσία των κυττάρων αυτών, στον εντερικό βλεννογόνο είχε αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό των

ενηλίκων παρασίτων που βρέθηκαν στη νεκροψία σε σχέση με τους μάρτυρες (Tzamaloukas et al., 2006). Όμως, η έμμεση δράση των ταννινών απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Είναι σαφές λοιπόν ότι το μεγαλύτερο μέρος των *in vitro* αποτελεσμάτων στηρίζουν την υπόθεση της άμεσης δράσης των ταννινών έναντι των γαστρεντερικών παρασίτων (Hoste et al., 2012). Νέα στοιχεία *in vitro* μελετών που προσπάθησαν να διασαφηνίσουν τον μηχανισμό δράσης των ταννινών αναδεικνύουν ότι εκτός από τους ποσοτικούς παράγοντες (συγκεντρώσεις ταννινών), τη βιοδραστικότητα επηρεάζουν και ποιοτικοί παράγοντες των ταννινών, που αφορούν στη δομή των ενώσεων και συνδέονται με το μέγεθος των ταννινών (μέσος βαθμός πολυμερισμού, mDP) (Gea et al., 2011) και την αναλογία προδελφινιδίων/προκυανιδίων (PD/PC) (Molan et al., 2003a). Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι οι ταννίνες όταν συνδυάζονται με άλλα φλαβονοειδή μπορεί να εμπλέκονται σε συνεργιστικές ή ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις (Vargas-Magãna et al., 2014a; Klongsiriwet et al., 2015). Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης των ταννινών, δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως.

2.2.6. Αρνητικές Επιπτώσεις Δευτερογενών Μεταβολιτών

Είναι αυτονόητο ότι οι παραπάνω μηχανισμοί δράσης των ταννινών πρέπει να αποσαφηνισθούν, καθώς αυτό θα βοηθήσει στην εξασφάλιση της αποτελεσματικής χρησιμοποίησης των PSM (πλούσιων σε δευτερογενείς μεταβολίτες) φυτών σε στρατηγικές ελέγχου των νηματωδών παρασίτων. Όμως, πρέπει να τονισθεί ότι η κατανάλωση φυτικών υλικών πλούσιων σε δευτερογενείς μεταβολίτες έχει συσχετιστεί και με διάφορες επιζήμιες επιπτώσεις στο ζωικό οργανισμό. Η σοβαρότητα των αρνητικών αυτών επιδράσεων εξαρτάται από τη συγκέντρωση, τον τύπο και τη δομή των δευτερογενών αυτών μεταβολιτών, καθώς και τη συγκέντρωση των υπολοίπων θρεπτικών συστατικών (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες) στο σιτηρέσιο των ζώων (Mueller-Harvey, 2006). Έτσι, η κατανάλωση των συγκεκριμένων φυτικών υλικών από τα μηρυκαστικά, μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη πρόσληψη τροφής, απώλεια βάρους, τοξίκωση και σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και στο θάνατο (Milgate & Roberts, 1995; Waghorn & McNabb, 2003).

Πιο συγκεκριμένα, η κατανάλωση συμυκνωμένων ταννινών έχει συσχετιστεί με μειωμένη πρόσληψη τροφής, μείωση πεπτικότητας, καθώς και διαταραχές σε μεταβολικές διεργασίες στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών (Barry & McNabb, 1999; Min et al., 2003). Επίσης, ορισμένοι τύποι συμυκνωμένων ταννινών φαίνεται να σχετίζονται με τοξικές επιδράσεις

στους βλεννογόνους του πεπτικού, με αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών (Reed, 1995; Dawson et al., 1999; Mueller-Harvey, 2006). Από την άλλη πλευρά, οι σαπωνίνες έχουν συσχετιστεί με αιμολυτική δράση και μετεωρισμό στα μηρυκαστικά, ενώ η κατανάλωση σημαντικών ποσοτήτων αλκαλοειδών, γλυκοζιτών και τερπενοειδών μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο νευρικό σύστημα (Conn, 1979; Mabry & Gill, 1979).

Τα φυτοφάγα ζώα αντίστοιχα, προκειμένου να αντιμετωπίσουν τους δευτερογενείς μεταβολίτες στη βλάστηση που καταναλώνουν, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς, με τη βοήθεια των οποίων τους αδρανοποιούν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έκκριση στο σάλιο πρωτεϊνών πλούσιων σε προλίνη (PRP) (salivary proline-rich proteins), οι οποίες μπορούν να εξουδετερώσουν την περίσσεια των ταννινών (dietary tannin) (Bernays et al., 1989). Για παράδειγμα, τα ελάφια παράγουν PRP, που έχουν μεγάλη συνδεσιμότητα με τις ταννίνες που λαμβάνουν από τη διατροφή τους (Robbins et al., 1991). Έτσι, οι ταννίνες σχηματίζουν αδρανή σύμπλοκα με τις PRP, τα οποία περνούν μέσω του πεπτικού σωλήνα και αποβάλλονται με τα κόπρανα (Mole et al., 1990).

2.2.7. Εκτίμηση της ανθελμινθικής δράσης των βιοενεργών φυτών

Από τις μέχρι τώρα μελέτες που αποσκοπούσαν στη διερεύνηση της αντιπαρασιτικής δράσης διαφόρων φυτών που περιείχαν ταννίνες, προέκυψε η παρακάτω μεθοδολογία εκτίμησης της αντιπαρασιτικής δράσης. Το πρώτο στάδιο είναι ο εντοπισμός του φυτικού υλικού που πιθανώς να εμφανίζει αντιπαρασιτική δράση. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται *in vitro* δοκιμές σε συνθήκες εργαστηρίου, που επιτρέπουν την αξιολόγηση της ανθελμινθικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων που πληρούν συγκεκριμένες προϋποθέσεις, όπως αναφέρονται παρακάτω (Κεφάλαιο 2.2.7.1.). Στη συνέχεια, και μετά από την εκτίμηση της διατροφικής αξίας των υπό-αξιολόγηση φυτικών ειδών, το επόμενο στάδιο είναι οι *in vivo* πειραματισμοί σε ελεγχόμενες συνθήκες, (δηλαδή σε πειραματικές συνθήκες και ελεγχόμενη μόλυνση των ζώων από συγκεκριμένο είδος και αριθμό παρασίτων), ώστε να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα των επιλεγμένων φυτικών ειδών ενάντια στα παράσιτα αυτά. Τέλος, πραγματοποιούνται μελέτες σε πραγματικές συνθήκες εκτροφής και σε ζώα με φυσική μόλυνση, οι οποίες εξετάζουν πως και πότε πρέπει να χορηγούνται στην πράξη τα βιοενεργά φυτικά υλικά.

2.2.7.1. Εντοπισμός φυτικού υλικού

Καθώς η ευεργετική δράση της κατανάλωσης ενός βιοενεργού (nutraceutical) φυτικού υλικού από τα ζώα εξαρτάται από πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις, η επιλογή των φυτών που πιθανά μπορούν να εμφανίζουν αντιπαρασιτική δράση απαιτεί την συνεργασία των επιστημονικών κλάδων της παρασιτολογίας, της διατροφής ζώων, της φυτοχημείας και της τοξικολογίας. Πάντα όμως το κλειδί για τον εντοπισμό αυτών των φυτικών ειδών είναι η παρουσία (σύσταση και ποσότητα) των δευτερογενών μεταβολιτών.

Σύμφωνα με τους [Hoste et al. \(2015\)](#), κατά την διαδικασία εντοπισμού αυτών των υλικών, οι πληροφορίες που πρέπει να συλλέγονται για τα φυτά, πριν ακόμη τους *in vitro* και τους *in vivo* πειραματισμούς, αφορούν στην διατροφική τους αξία και στην ελκυστικότητα. Συγκεκριμένα, είναι απαραίτητο το φυτικό είδος να παρουσιάζει ένα επιθυμητό προφίλ μακρο-θρεπτικών συστατικών, με ικανοποιητικά επίπεδα συγκεντρώσεων πρωτεϊνών και ενέργειας. Βέβαια, στις περιπτώσεις όπου τα φυτά επιλέγονται από τα ζώα κατά την βόσκηση, και περιέχουν δευτερογενείς μεταβολίτες (ταννίνες), δεν θα πρέπει να αποκλειστούν από την περαιτέρω μελέτη, επειδή δεν εμφανίζουν το ιδανικό προφίλ θρεπτικών συστατικών. Μία πληροφορία που θα βοηθούσε να αξιολογηθεί κατά πόσο ένα φυτό μπορεί να είναι χρήσιμο υπό *in vivo* συνθήκες είναι και ο προσδιορισμός του δείκτη IVDMD (In Vitro Dry Matter Digestibility) και σε μικρότερο βαθμό η ελκυστικότητα στην κατανάλωση του φυτού από τα ζώα. Πάντα πριν τους *in vivo* πειραματισμούς, είναι σημαντικό να πραγματοποιούνται δοκιμές σύντομης χορήγησής του σε ζώα, για να καταγραφεί η πρόσληψη/προτίμηση από αυτά.

Στις περιπτώσεις που ένα φυτό δεν καταναλώνεται από τα ζώα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν με άλλους τρόπους, οι οποίοι όμως εντάσσονται στην φυτοθεραπεία (χορήγηση στα ζώα εκχυλίσματος που περιέχει τους μεταβολίτες). Για κάθε φυτικό υλικό που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλες ποσότητες ή για μεγάλες χρονικές περιόδους, όπως τα γνωστά nutraceuticals, απαιτείται να έχει αξιολογηθεί η πεπτικότητα τους (DDM/πεπτή ξηρά ουσία και DOM/πεπτή οργανική ουσία), καθώς είναι απαραίτητο να έχει διασφαλιστεί ότι η χορήγησή του στα ζώα δεν θα προκαλέσει σοβαρή μείωση της πέψης. Τέλος, είναι σημαντικό η κατανάλωση του φυτού αυτού να μην επηρεάζει αρνητικά τους δείκτες παραγωγικότητας των ζώων (ανάπτυξη, γαλακτοπαραγωγή, αναπαραγωγή) και να μην σχετίζεται με την εμφάνιση κλινικής νόσου και συνοδών συμπτωμάτων όπως αποβολές, παραμορφώσεις εμβρύου και φωτοευαισθησία ([Hoste et al., 2015](#)).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, κατάλληλα φυτά φαίνεται να είναι τα ψυχανθή *On. viciifolia* στην Ευρώπη και *Lespedeza cuneata* για τις ΗΠΑ και την Ν. Αφρική. Αυτό οφείλεται στο ότι α)

καλλιεργούνται σχετικά εύκολα με ικανοποιητικές αποδόσεις, β) η καλλιέργειά τους παρουσιάζει σημαντικά περιβαλλοντικά οφέλη, λόγω του ότι εμπλουτίζουν το έδαφος με άζωτο βελτιώνοντας τη γονιμότητά του και μειώνοντας έτσι τη χρήση λιπασμάτων στις επόμενες καλλιέργειες γ) έχουν υψηλή ελκυστικότητα αλλά και θρεπτική αξία για τα ζώα, και δ) συμβάλλουν στην πρόληψη της εμφάνισης μετεωρισμού και στην αποτελεσματική αξιοποίηση του αζώτου από τη μικροβιακή χλωρίδα της μεγάλης κοιλίας (Mueller-Harvey, 2006; Rochfort et al., 2008; Waghorn, 2008).

2.2.7.2. Αξιολόγηση της αντιπαρασιτικής δράσης

2.2.7.2.1. *In vitro* επιλογή

Εξαιτίας της πληθώρας φυτικών ειδών που είναι πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες, υπάρχει η ανάγκη επιλογής τους αρχικά με την χρήση *in vitro* δοκιμών, ώστε σε δεύτερο χρόνο να εξεταστεί *in vivo* η αντιπαρασιτική δράση των πιο αποτελεσματικών από αυτά. Δεδομένου ότι ο τρόπος δράσης των nutraceuticals που περιέχουν ταννίνες διαφέρει από τον αντίστοιχο των συνθετικών ανθελμινθικών, είναι ενδιαφέρον αλλά και απαραίτητο να εξετάζεται η δράση κάθε φυτικού εκχυλίσματος στα διαφορετικά στάδια του βιολογικού κύκλου των νηματωδών (αυγά, L₃, ενήλικα). Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για τον *in vitro* εντοπισμό φυτικού υλικού με αντιπαρασιτική δράση, οι οποίες στηρίζονται στην επίδραση του φυτικού εκχυλίσματος στην εξέλιξη, την ανάπτυξη και την κινητικότητα των αυγών ή των προνυμφών των νηματωδών παρασίτων. Επιπλέον, είναι σημαντικό για την ευζωία των ζώων οι μέθοδοι αυτές να εφαρμόζονται κατά το πρώτο στάδιο επιλογής των φυτών, προστατεύοντας τα ζώα από *in vivo* πειραματισμούς που δεν θα επιβεβαιώσουν την αναμενόμενη αποτελεσματικότητα. Ωστόσο, είναι αδύνατη η εφαρμογή τους εκτός εργαστηρίου, διότι απαιτούν ειδικό εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό. Μάλιστα, οι περισσότερες από τις *in vitro* δοκιμές, έχουν τροποποιηθεί από αυτές που είχαν αρχικά αναπτυχθεί για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των συνθετικών φαρμάκων (Jackson & Hoste, 2010).

2.2.7.2.1.1. *In vitro* δοκιμές που χρησιμοποιούνται

Οι σημαντικότερες *in vitro* δοκιμές περιλαμβάνουν τις δοκιμές α) εκκόλαψης των προνυμφών (Egg Hatch Test/EHT), β) αναστολής μετανάστευσης των προνυμφών (Larval migration inhibition test/LMIT), γ) αναστολής σίτισης των προνυμφών (Larval feeding inhibition assay/LFIA), δ) έκδυσης προνυμφών (Larval exsheathment (inhibition) assay/LEIA), ε)

ανάπτυξης προνυμφών (Larval development assay/ LDA) και στ) κινητικότητας ενηλίκων παρασίτων (Adult motility assay/AMA) (Jackson & Hoste, 2010).

Όσον αφορά την *Δοκιμή εκκόλαψης των προνυμφών/EHT*, περιεγράφηκε πρώτη φορά από τους Le Jambre & Whitlock το 1976, και έκτοτε έχει τροποποιηθεί αρκετές φορές (Taylor et al., 2002; Jackson & Hoste, 2010). Η δοκιμή αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα των βενζιμιδαζολών να αναστέλλουν την εμβρυογένεση και την εκκόλαψη των προνυμφών. Τα αυγά των παρασίτων επωάζονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φυτικού εκχυλίσματος και το ποσοστό προνυμφών που εκκολάφθηκαν μετρείται με την βοήθεια διαλύματος ιωδίου (χρωματισμός). Στην συνέχεια, μπορεί να εκτιμηθεί η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκαλεί την αναστολή εκκόλαψης του 50% των νηματωδών ή αλλιώς η τιμή ED₅₀ ή EC₅₀ (effective dose ή effective concentration).

Η *Δοκιμή αναστολής μετανάστευσης των προνυμφών/LMIT* στηρίζεται στην μελέτη της κινητικότητας των προνυμφών και πιο συγκεκριμένα στην ικανότητά τους να διαπερνούν ή όχι ηθμό διήθησης 20μm, καθώς μετρά την επίδραση του φυτικού υλικού στην κίνηση των προνυμφών (Gill et al., 1991; Rabel et al., 1994; Barrau et al., 2005). Οι προνύμφες L₃ με ή χωρίς θήκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν και να επωαστούν σε μια σειρά συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας. Τέλος, προσδιορίζεται η ικανότητά τους να μεταναστεύουν, καθώς οι ζωντανές προνύμφες μπορούν να διαπερνούν τον ηθμό, ενώ οι νεκρές όχι. Οι νεκρές προνύμφες ξεπλένονται και καταμετρώνται, ώστε να εκτιμηθεί η τιμή LM₅₀ (συγκέντρωση όπου το 50% των προνυμφών απέτυχε να μεταναστεύσει). Η πολυπλοκότητα της μεθόδου την καθιστά δύσχρηστη με αποτέλεσμα να εφαρμόζεται σπάνια (Demeler et al. 2010).

Η *Δοκιμή αναστολής σίτισης των προνυμφών/LFIA* καθορίζει την επίδραση του φυτικού υλικού στην συμπεριφορά σίτισης των προνυμφών α' σταδίου (Geary et al., 1993; Alvarez-Sánchez et al., 2005). Αφού οι προνύμφες α' σταδίου (L₁) εκτεθούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του υπό δοκιμή φυτικού υλικού, προσφέρονται σε αυτές λυοφιλοποιημένες αποικίες *E. coli*, επισημασμένες με την φθορίζουσα χρωστική ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), που εκπέμπει πράσινο χρώμα. Οι προνύμφες που τρέφονται με αυτές, αναγνωρίζονται εύκολα χρησιμοποιώντας ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού και αφού υπολογιστεί το ποσοστό του 50% των προνυμφών που απέτυχε να σιτιστεί, υπολογίζεται η τιμή LF₅₀ (συγκέντρωση εκχυλίσματος, όπου το 50% των προνυμφών απέτυχε να σιτιστεί).

Η *Δοκιμή έκδυσης προνυμφών/LE(IA)* χρησιμοποιεί L₃, που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του υπό εξέταση φυτικού εκχυλίσματος. Στόχος της δοκιμής είναι η προοδευτική έκδυση των προνυμφών μετά από την έκθεσή τους σε αραιωμένο διάλυμα

υποχλωριώδους νατρίου. Για την ομάδα ελέγχου, αναμένεται έκδυση 100% στο σύνολο των L₃ μετά από 60 λεπτά. Επειδή όμως ο ρυθμός έκδυσης ποικίλει ανάλογα με το είδος ή τα διαφορετικά στελέχη του παρασίτου, είναι σημαντικό σε προκαταρκτικό στάδιο να προσδιοριστεί η καλύτερη δυνατή αραίωση στο υγρό έκδυσης (υποχλωριώδες νάτριο), ώστε να επιτυγχάνεται σταδιακή έκδυση εντός των 60 λεπτών. Πρόκειται για μια προσαρμογή της διαδικασίας ταχείας έκδυσης που περιγράφεται από τους [Bahuaud et al. \(2006\)](#). Στη συνέχεια, μετριοούνται οι προνύμφες που υποβλήθηκαν σε έκδυση για κάθε συγκέντρωση, με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνση 20X). Ο προσδιορισμός των προνυμφών που έχουν υποστεί έκδυση πραγματοποιείται ανά είκοσι λεπτά της ώρας και στη συνέχεια υπολογίζεται η τιμή EC₅₀ (μέση αποτελεσματική δόση), δηλαδή η μέση συγκέντρωση εκχυλίσματος που απαιτείται για να διακόψει τον βιολογικό κύκλο του 50% του πληθυσμού του παρασίτου ([Jackson & Hoste, 2010](#)).

Η **Δοκιμή ανάπτυξης των προνυμφών/LDA** είναι μια περισσότερο χρονοβόρα δοκιμή, που αξιολογεί την ικανότητα των αυγών του παρασίτου να εκκολάπτονται και να αναπτύσσονται σε προνύμφες L₃, παρουσία του υπό δοκιμή φυτικού υλικού ([Coles & Simpkin, 1977](#); [Taylor, 1990](#); [Hubert & Kerboeuf, 1992](#); [Amarante et al., 1997](#); [Varady & Corba, 1999](#)). Με αυτήν την δοκιμή υπολογίζεται η ποσοστιαία ανάπτυξη των προνυμφών σε κάθε συγκέντρωση και υπολογίζεται η τιμή LC₅₀ (συγκέντρωση στην οποία το 50% των παρασίτων δεν αναπτύσσονται). Δεδομένου ότι η δοκιμή απαιτεί την μακρά περίοδο επώασης των 7 ημερών και την ενσωμάτωση αντιβιοτικών και αντιμυκητιακών, δεν προτιμάται συχνά κατά την *in vitro* επιλογή φυτικών εκχυλισμάτων.

Η **Δοκιμή κινητικότητας ενήλικων παρασίτων/AMA**, χρησιμοποιεί πρόσφατα συλλεγμένα ενήλικα παράσιτα, που διατηρούνται σε μέσο καλλιέργειας ή μέσο που περιέχει το υπό εξέταση φυτικό εκχύλισμα, για αρκετές ημέρες ([O'Grady & Kotze, 2004](#); [Paolini et al., 2004](#)). Κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου, σε τακτά χρονικά διαστήματα μετριοούνται τα ενεργά ενήλικα παράσιτα, ενώ είναι απαραίτητη η εφαρμογή τόσο αρνητικού (π.χ. PBS) όσο και θετικού μάρτυρα, με ιβερμεκτίνη ή λεβαμιζόλη οι οποίες προκαλούν παράλυση των ενήλικων ελμίνθων ([Jackson & Hoste, 2010](#)).

Οι διαφορετικές *in vitro* δοκιμές που αρχικά είχαν χρησιμοποιηθεί, είχαν ως στόχο την καλύτερη κατανόηση του τρόπου δράσης των δευτερογενών μεταβολιτών στα γαστρεντερικά νηματώδη. Αυτό επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας:

- i) καθαρές ταννίνες, οι οποίες επιλέχθηκαν λόγω των διαφορετικών δομικών χαρακτηριστικών τους (Molan et al., 2004; Novobilsky et al., 2013; Quijada et al., 2015), ή
- ii) καθαρές φλαβονοειδείς ενώσεις (Molan et al., 2003a; Brunet & Hoste, 2006).

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν εκτενείς μελέτες που αφορούσαν τις λειτουργικές και δομικές αλλαγές που προκαλούνταν στα παράσιτα (Hoste et al., 2012). Αυτό οδήγησε στην υπόθεση της άμεσης δράσης των ταννινών (Hoste et al., 2015).

Βέβαια, η εκχύλιση των δευτερογενών μεταβολιτών, που στη συνέχεια χρησιμοποιούνταν στις *in vitro* δοκιμές, γινόταν με διαφορετικούς διαλύτες. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την εκχύλιση των δευτερογενών μεταβολιτών με διαφορετικό προφίλ και συνεπώς τα εκχυλίσματα έδειχναν διαφορετική ανθελμινθική δράση στο ίδιο στάδιο του βιολογικού κύκλου του ίδιου παρασίτου. Όταν υπάρχουν υποψίες ότι οι ταννίνες είναι οι κύριες βιοενεργές ενώσεις, τότε ο πιο αποτελεσματικός διαλύτης για καλύτερη απόδοση της εκχύλισης είναι η ακετόνη σε αναλογία με νερό 70:30. Επιπλέον, για την ξήρανση των φυτικών δειγμάτων συνιστάται η λυοφιλίωση (κρυοξήρανση) ή η ξήρανση σε θερμοκρασίες μικρότερες των 40° C, ώστε να διατηρούνται οι πολυφαινόλες και οι ταννίνες, καθώς σε υψηλότερες θερμοκρασίες εύκολα οξειδώνονται (Hoste et al., 2015).

2.2.7.2.1.2. Παράμετροι που πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν κατά τις *in vitro* δοκιμές

Σύμφωνα με την ανασκόπηση των Hoste et al. (2015) κατά τις *in vitro* δοκιμές πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν οι εξής παράμετροι:

α) Όπως και με τα συμβατικά ανθελμινθικά, (π.χ. η λεβαμιζόλη εμφανίζει δράση στην κινητικότητα των L₃, όχι όμως κατά την έκδυση L₃ και την έκκριση αυγών), έτσι και στην περίπτωση των φυτικών εκχυλισμάτων, το ίδιο εκχύλισμα μπορεί να εμφανίζει ανθελμινθική δράση έναντι ενός παρασίτου σε ένα στάδιο του βιολογικού κύκλου και όχι σε κάποιο/-α άλλο/-α (Paolini et al., 2004; Alonso-Díaz et al., 2011).

β) Όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικοί διαλύτες κατά την εκχύλιση, ακόμη κι αν είναι παρόμοιας πολικότητας (μεθανόλη και ακετόνη), μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα την εκχύλιση δευτερογενών μεταβολιτών με διαφορετική σύσταση, ώστε το ένα εκχύλισμα να εκδηλώνει διαφορετική ανθελμινθική δράση σε σύγκριση με το άλλο, ακόμη και στο ίδιο στάδιο του βιολογικού κύκλου του ίδιου παρασίτου (Castañeda-Ramírez et al., 2014).

γ) Μια *in vitro* δοκιμή δεν θα βοηθήσει/καθορίσει την δόση ή την συγκέντρωση που απαιτείται να καταναλωθεί από μολυσμένα ζώα, ώστε να ελεγχθεί η μόλυνση από νηματώδη. Ένα φυτικό εκχύλισμα περιέχει μια ποσότητα δευτερογενών μεταβολιτών, η οποία θα είναι παρούσα κατά την *in vitro* δοκιμή σε συγκεκριμένη ποσότητα και ποιότητα, αλλά τίποτα από τα παραπάνω δεν είναι συγκρίσιμα με τις *in vivo* συνθήκες. Οι συνολικές διεργασίες της πέψης, η μάσηση της τροφής, ο μηρυκασμός, και οι συνθήκες που επικρατούν στον γαστρεντερικό σωλήνα μπορεί να επηρεάσουν τόσο την απελευθέρωση των δευτερογενών μεταβολιτών από το φυτικό υλικό, όσο και την ποσότητα και την δομή τους. Επομένως, οι *in vitro* δοκιμές μπορούν να βοηθήσουν στον εντοπισμό των πιθανών βιοενεργών ενώσεων με ανθελμινθική δράση, αλλά δεν μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη δόση ή τη συγκέντρωση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε *in vivo* πειραματισμούς (Hoste et al., 2015).

Βέβαια, σε περιπτώσεις όπου πρόκειται να ελεγχθεί για την αντιπαρασιτική του δράση μικρός αριθμός φυτικών ειδών, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η καλύτερη προσέγγιση είναι η *in vivo* χορήγησή τους σε μολυσμένα ζώα. Λόγω φυσιοχημικών συνθηκών στο έντερο, κάποια εκχυλίσματα που εμφανίζουν αποτελεσματική δράση *in vitro*, θα εμφανίσουν μικρότερη ή καθόλου *in vivo* (Jackson and Hoste, 2010).

2.2.7.2.2. *In vivo* επιβεβαίωση πιθανών nutraceuticals υπό ελεγχόμενες συνθήκες

Η διαδικασία της *in vivo* αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας των nutraceuticals, όπως και στο στάδιο της *in vitro* επιλογής, προέρχεται σε κάποιο βαθμό από τις κατευθυντήριες οδηγίες για την αξιολόγηση των συνθετικών φαρμάκων (Wood et al., 1995). Σε αυτήν την περίπτωση, όμως, είναι απαραίτητο να ληφθούν υπόψη οι βασικές διατροφικές παράμετροι. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, ένα nutraceutical, είναι κατά βάση τροφή. Επομένως, είναι σημαντικό να αξιολογηθεί η θρεπτική του αξία [λαμβάνοντας υπόψη πληροφορίες για τις ολικές αζωτούχες ουσίες (crude protein/CP), τη μεταβολιστέα ενέργεια (metabolizable energy/ME), το κλάσμα NDF (neutral detergent fibre), το κλάσμα ADF (acid detergent fibre), τη λιγνίνη κλπ]. Πάντα όμως βασική προϋπόθεση είναι να επιτυγχάνονται ισοπρωτεϊνικά και ισοενεργειακά σιτηρέσια για τις ομάδες που λαμβάνουν μέρος στον πειραματισμό. Μονάχα έτσι μπορεί να αξιολογηθεί ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών και να αποφευχθεί η σύγχυση εξαιτίας της διαφορετικής ποσότητας των μακροθρεπτικών συστατικών που λαμβάνει ο ξενιστής (Coop & Kyriazakis, 1999). Ωστόσο, οι διαφορές στην ελκυστικότητα μπορούν να επηρεάσουν την διατροφή, οδηγώντας σε διαφορετικά επίπεδα κατανάλωσης τροφής στις περιπτώσεις που δεν ελέγχεται η ποσότητα τροφής που καταναλώνεται.

Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα των nutraceutical-φυτών, εξαρτάται από την εθελοντική κατανάλωσή τους από τα ζώα. Όμως, τα περισσότερα φυτικά υλικά που πιθανά παρουσιάζουν αντιπαρασιτική δράση δεν περιλαμβάνονται στα τυπικά σιτηρέσια των ζώων. Γι' αυτό είναι σημαντικό να υπάρχει μια περίοδος προσαρμογής των ζώων στη νέα διατροφή (10-15 ημέρες), ώστε αυτά να φτάσουν στην μέγιστη κατανάλωσή της. Όταν επιτευχθεί αυτή η προσαρμογή πρέπει συχνά να εκτιμάται η κατά βούληση κατανάλωση της τροφής Voluntary Feed Intake (VFI) (δηλαδή μέτρηση της ποσότητας του υλικού που προσφέρεται και εκείνης που απορρίπτεται, ώστε εκ διαφοράς να υπολογίζεται η προσληφθείσα ποσότητα εντός 24 ωρών) τόσο στα μολυσμένα, όσο και στα μη μολυσμένα ζώα (Martínez-Ortiz-De Montellano et al., 2010). Η κατανάλωση βέβαια μπορεί να ενισχυθεί με τη βοήθεια πρόσθετων, την επεξεργασία του υλικού ή την ενσωμάτωση σε μίγμα ελκυστικών ζωοτροφών, πρακτική η οποία δεν είναι εφικτή σε συνθήκες εκτατικών συστημάτων. Επιπλέον, απαραίτητος είναι και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των δευτερογενών μεταβολιτών στο υλικό που αξιολογείται δεδομένης της παραλλακτικότητάς της. Στην περίπτωση των πλούσιων σε συμπυκνωμένες ταννίνες φυτών, αρκεί μια χημική ή βιολογική δοκιμή (Makkar, 2003; Mueller-Harvey, 2006).

Στους *in vivo* πειρατισμούς απαιτείται προσαρμοσμένος πειραματικός σχεδιασμός (Hoste et al., 2015), καθώς η δράση των nutraceuticals διαφέρει από αυτή των συνθετικών φαρμάκων. Αφού ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τον χαρακτηρισμό της θρεπτικής αξίας και των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών, μπορούν να εφαρμοστούν *in vivo* πειρατισμοί υπό ελεγχόμενες συνθήκες, με πειραματικώς μολυσμένα ζώα. Ο κύριος παράγοντας που πρέπει να διερευνηθεί σε αυτή την περίπτωση είναι κατά πόσο το φυτικό υλικό που αξιολογείται είναι αποτελεσματικό απέναντι σε ένα εύρος γαστρεντερικών νηματωδών. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο κατά τους *in vivo* πειρατισμούς συστήνεται η μόλυνση από ένα είδος νηματωδών παρασίτων που παρασιτεί στο ήνυστρο και από ένα είδος που παρασιτεί στο λεπτό έντερο. Η επιλογή τους βασίζεται σε επιδημιολογικές μελέτες, που εντοπίζουν τα περισσότερο διαδεδομένα ή παθογόνα είδη. Όπως και στα συνθετικά ανθελμινθικά, έτσι και στα nutraceuticals, πιθανά να αναμένεται πολύδυναμος δράση ή μπορεί να παρατηρηθούν διαφορές έναντι των διαφορετικών ειδών γαστρεντερικών νηματωδών (Hoste et al., 2006, 2012). Επιπλέον, στον πειραματικό σχεδιασμό είναι σημαντικό να μελετηθεί η δράση έναντι των τριών σταδίων του βιολογικού κύκλου των παρασίτων (αυγά, L₃, ενήλικα). (Castañeda-Ramírez et al., 2014; Vargas-Magaña et al., 2014a,b).

Κατά την διάρκεια ολόκληρης της *in vivo* πειραματικής περιόδου είναι απαραίτητη η αξιολόγηση τόσο των παρασιτολογικών, όσο και των παθοφυσιολογικών δεικτών (Hoste et al., 2015). Οι παρασιτολογικές μετρήσεις αφορούν κυρίως την αποβολή των αυγών των

παρασίτων με τα κόπρανα του ζώου (αριθμός αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων/FEC), ενώ για τις παθοφυσιολογικές μετρήσεις που έχουν στόχο τον προσδιορισμό των επιπτώσεων στην ανθεκτικότητα του ξενιστή μπορούν να πραγματοποιούνται μετρήσεις που σχετίζονται με την εμφάνιση αναιμίας (δοκιμή FAMACHA) (van Wyk & Bath, 2002) ή διάρροιας (Cabaret, 2004).

Επίσης, κατά τις *in vivo* μελέτες υπό ελεγχόμενες συνθήκες πρέπει να εκτιμάται ο πληθυσμός των ενήλικων παρασίτων κατά την νεκροψία, έτσι ώστε να γίνεται σαφές εάν η δράση έναντι των αυγών οφείλεται στην αποτελεσματικότητα έναντι συγκεκριμένου είδους παρασίτου, στην μείωση των ενήλικων θηλυκών ή της γονιμότητάς τους (Martínez-Ortiz-De-Montellano et al., 2010; Galicia-Aguilar et al., 2012).

2.2.7.2.2.1. Αριθμός αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων

Ο αριθμός των αυγών των παρασίτων ανά γραμμάριο κοπράνων των ζώων είναι πολύ αξιόπιστο κριτήριο, αφού σχετίζεται άμεσα με το παρασιτικό φορτίο ιδιαίτερα για ζώα που είναι μολυσμένα με *H. contortus* (Coadwell & Ward, 1982) και *Tr. colubriformis* (Beriajaya & Copeman, 2006). Όμως, σε μεικτές μολύνσεις είναι δυνατό η αυξημένη ωοπαραγωγική ικανότητα του *H. contortus* να υπερκαλύψει τη μειωμένη ωοπαραγωγική ικανότητα άλλων ειδών όπως των *Tr. colubriformis* και *T. circumcincta*, γεγονός που προκαλεί δυσκολία στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η μέθοδος που συνήθως ακολουθείται για τον προσδιορισμό του αριθμού των αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων είναι η τεχνική McMaster (MAFF, 1986), ή μια τροποποιημένη εκδοχή της (Roepstorff & Nansen, 1998). Τα δείγματα κοπράνων και για τις δυο εκδοχές της μεθόδου, πρέπει να συλλέγονται ατομικά, από το απευθυσμένο των ζώων και να εξετάζονται άμεσα στο εργαστήριο.

Σύμφωνα με την τροποποιημένη εκδοχή της τεχνικής McMaster, αρχικά ζυγίζονται 4 g κοπράνων από το κάθε δείγμα και τοποθετούνται σε πλαστικό δοχείο μίας χρήσης. Στη συνέχεια, προστίθενται 56 mL νερού βρύσης και αναμιγνύονται καλά με τη βοήθεια ξύλινης σπάτουλας, ώστε να ομοιογενοποιηθεί το δείγμα (η αναλογία πρέπει να είναι πάντα 14 mL νερού για κάθε 1 g κοπράνων, διότι αυτή η αναλογία διασφαλίζει ότι τα 15 mL του εναιωρήματος αντιστοιχούν σε 1 g κοπράνων.) Μετά από αναμονή 30 λεπτών, επαναλαμβάνεται ανάδευση με χρήση ξύλινης σπάτουλας. Η καλή ανάδευση και η αναμονή των 30 λεπτών διασφαλίζουν ότι ακόμη και τα πιο σκληρά κομμάτια κοπράνων θα διαλυθούν.

Ακολουθεί φιλτράρισμα του εναιωρήματος με τη χρήση 2 φύλλων βαμβακερής γάζας και ταυτόχρονη μεταφορά του σε δεύτερο καθαρό πλαστικό δοχείο, προκειμένου να απομακρυνθούν τα χονδροειδή στοιχεία. Αμέσως μετά την διαδικασία φιλτραρίσματος, 10 mL του εναιωρήματος μεταφέρονται σε σωληνάριο φυγοκέντρησης αντίστοιχου όγκου. (Τα 10 mL αντιπροσωπεύουν τα 2/3 g κοπράνων). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1500 RPM (στροφές/λεπτό) για 5 λεπτά της ώρας. Το υπερκείμενο υγρό αναρροφάται με τη χρήση πιπέτας ή συσκευής κενού, χωρίς να ανακινηθεί το ίζημα. Το ίζημα εξακολουθεί να αντιπροσωπεύει τα 2/3 g κοπράνων. Λίγο πριν την καταμέτρηση των αυγών με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου προστίθεται υγρό επίπλευσης (κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου) έως την σήμανση των 4 mL του σωληναρίου φυγοκέντρησης. Το εναιώρημα αναμιγνύεται προσεκτικά με τη χρήση πλαστικής πιπέτας, έτσι ώστε όλα τα παρασιτικά στοιχεία να έρθουν σε επαφή με το υγρό επίπλευσης. Ποσότητα του εναιωρήματος αναρροφάται με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας και με αυτή γεμίζονται οι δύο ειδικοί χώροι της πλάκας McMaster. Μετά από 3 λεπτά της ώρας, αναμονή που επιτρέπει στα αυγά των παρασίτων την επίπλευση, το παρασκεύασμα εξετάζεται στο μικροσκόπιο, σε 10x10 μεγέθυνση. Το άθροισμα των αυγών από τους δύο ειδικούς χώρους της πλάκας McMaster πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 20 και έτσι προκύπτει σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή ο αριθμός των αυγών των παρασίτων ανά γραμμάριο κοπράνων (Eggs Per Gram/ EPG).

2.2.7.2.2. Δείκτης αναιμίας

Το σύστημα FAMACHA έχει καθιερωθεί για τον εντοπισμό των μικρών μηρυκαστικών που παρασιτούνται έντονα από το αιματοφάγο παράσιτο *H. contortus*, καθώς βασίζεται στην αξιολόγηση του βαθμού αναιμίας των ζώων, ως αποτέλεσμα της παρασίτωσής τους από το παράσιτο αυτό.

Το σύστημα αυτό χρησιμοποιεί μία κλίμακα πέντε διαβαθμίσεων (από το 1 έως το 5) για την αξιολόγηση της απόχρωσης του επιπεφυκότα του κάτω βλεφάρου των ζώων, που σχετίζεται άμεσα με το βαθμό αναιμίας τους ([van Wyk & Bath, 2002](#)). Τα αναιμικά ζώα που βρίσκονται στην 4η και 5η κατηγορία της κλίμακας FAMACHA θεωρούνται ασθενή και συστήνεται να λάβουν θεραπεία. Τα ζώα που βρίσκονται στην 1η και 2η κατηγορία του FAMACHA δεν χρειάζεται να λάβουν θεραπεία. Ωστόσο, συστήνεται να χορηγείται ανθελμινθική αγωγή σε όλα τα ζώα της εκτροφής, όταν υπάρχουν ενδείξεις αυξημένου ποσοστού ζώων με αναιμία ([Besier, 2008](#)).

Έχει αποδειχθεί πως η εφαρμογή του συστήματος FAMACHA έχει σαν αποτέλεσμα:

- i) την επιτυχημένη αναγνώριση των ζώων που πραγματικά επωφελούνται από τη χορήγηση ανθελμινθικού, και
- ii) τη σημαντική μείωση του αριθμού των επαναληπτικών χορηγήσεων ανθελμινθικών σε μια εκτροφή (Kenyon et al., 2009).

Έτσι, με την εφαρμογή του συστήματος αυτού, μειώνεται και το κόστος της ανθελμινθικής θεραπείας και ο βαθμός έκθεσης των παρασίτων στα ανθελμινθικά φάρμακα. Το κυριότερο ωστόσο μειονέκτημα του συστήματος FAMACHA είναι η αδυναμία αξιοποίησής του σε ζώα παρασιτούμενα από μη αιματοφάγα παράσιτα ή σε περιπτώσεις που ο *H. contortus* δεν είναι το κυρίαρχο παράσιτο (Παπαδόπουλος και συν., 2011).

2.2.7.2.2.3. Προσδιορισμός αριθμού ενήλικων παρασίτων

Ο προσδιορισμός του αριθμού των ενήλικων παρασίτων είναι ο πιο ασφαλής τρόπος, ώστε να εκτιμηθεί εάν η δράση που εμφάνισε η πειραματική διατροφή έναντι του δείκτη EPG οφείλεται στην αποτελεσματικότητα έναντι στα ενήλικα παράσιτα, ή στην ωτοκία των θηλυκών. Μάλιστα, στις περιπτώσεις που η πειραματική μόλυνση έγινε με δυο είδη παρασίτων (ένα που παρασιτεί στο ήνυστρο και ένα το λεπτό έντερο), φαίνεται εάν η δράση έναντι των αυγών οφείλεται στην αποτελεσματικότητα έναντι σε συγκεκριμένο είδος παρασίτου.

Για να επιτευχθεί η συλλογή των ενήλικων ελμίνθων από το περιεχόμενο του αυλού μετά την νεκροψία, το ήνυστρο και τα 12 πρώτα μέτρα του λεπτού εντέρου πρέπει να διαχωριστούν, να δεθούν και να απομακρυνθούν ταχέως, ώστε να επεξεργαστούν. Όσον αφορά την καταμέτρηση των προνυμφών εντός του βλεννογόνου, σε αυτή την περίπτωση εφαρμόζεται πέψη με πεψίνη τόσο στο ήνυστρο όσο και στον εντερικό βλεννογόνο (MAFF, 1986). Μετά από επώαση τεσσάρων ωρών στους 37°C, μπορούν να συλλεχθούν και να αποθηκευτούν σε 10% αιθανόλης, έως ότου πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις των ελμίνθων με τη μέθοδο του 10% (MAFF, 1986).

2.2.7.2.2.4. Προσδιορισμός ωτοκίας των θηλυκών ενήλικων παρασίτων

Ανάλογα με το είδος του παρασίτου, ακολουθούνται διαφορετικά πρωτόκολλα για τον προσδιορισμό της ωτοκίας των θηλυκών ενήλικων παρασίτων. Συνήθως αυτή μετριέται σε 10 έλμινθες ανά ζώο. Κατά τη διάρκεια της παραπάνω διαδικασίας του προσδιορισμού του αριθμού των ενήλικων παρασίτων, συλλέγονται 10 θηλυκά ενήλικα παράσιτα ανά είδος για

κάθε ζώο, τα οποία και φυλάσσονται σε Eppendorf σε διάλυμα αιθανόλης 70%, έως ότου εφαρμοστεί σε αυτά η συνιστώμενη μεθοδολογία.

2.2.7.2.2.4.1. Προσδιορισμός ωοτοκίας θηλυκών *H. contortus*

Για τα ενήλικα θηλυκά του είδους *H. contortus*, η ωοτοκία προσδιορίζεται με την μέθοδο που περιγράφεται από τους Kloosterman et al. (1978). Εν συντομία, τα ενήλικα ένα προς ένα ενυδατώνονται για 5' σε 1.000μl αποσταγμένου νερού, πριν τοποθετηθούν σε 1.000μl υποχλωριώδους διαλύματος 0,125% για 20' σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των ελμίνθων, επιτρέποντας την άμεση μέτρηση των αυγών με τη βοήθεια στερεοσκοπίου, χρησιμοποιώντας το 10% του συνολικού όγκου (100μl από τα 1.000μl). Τέλος εύκολα υπολογίζεται με επαγωγή η ωοτοκία στο 100%.

2.2.7.2.2.4.2. Προσδιορισμός ωοτοκίας θηλυκών *Tr. colubriformis*

Όσον αφορά τον αριθμό των αυγών των θηλυκών *Tr. colubriformis*, αυτός προσδιορίζεται με τον εξής τρόπο: ολόκληρο το ενήλικο παράσιτο εμβαπτίζεται σε διάλυμα γαλακτικού οξέος 85% για λίγα δευτερόλεπτα, έως ότου επιτευχθεί διαύγαση και τα αυγά μετριούνται απευθείας στη μήτρα του έλμινθα. Όλες οι μετρήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν σε οπτικό μικροσκόπιο ρυθμισμένο στον φακό μεγέθυνσης 10 (100x).

2.2.7.2.3. *In vivo* μελέτες σε πραγματικές συνθήκες εκτροφών

Τα περισσότερα δεδομένα για τα nutraceutical φυτά, προέρχονται από μελέτες *in vitro* και *in vivo*, υπό ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες, ενώ οι πληροφορίες που έχουμε από αντίστοιχες μελέτες σε πραγματικές συνθήκες εκτροφής είναι περιορισμένες. Σύμφωνα με τους Hoste et al. (2015), συνήθως, η διαθεσιμότητα του υπό μελέτη φυτικού υλικού και η ύπαρξη πιθανών πρόσθετων ζωοτροφής είναι ο κύριος περιοριστικός παράγοντας για την χρήση του σε τέτοιου είδους μελέτες. Εάν το φυτικό υλικό δεν είναι ευρέως διαθέσιμο, ή το κόστος παραγωγής ή/και προμήθειάς του είναι υψηλό, τότε και οι παραγόμενες ποσότητες πιθανώς να μην είναι επαρκείς και να μην επιλέγεται από τους κτηνοτρόφους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανής ανθελμινθικής δράσης ειδών της Μεσογειακής χλωρίδας. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε μια σειρά από *in vitro* δοκιμές εκχυλισμάτων μιας ποικιλίας φυτικών ειδών της χώρας μας, που είναι πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες, με στόχο: α) να διερευνηθεί η εκδήλωση ή μη ανθελμινθικής δράσης αυτών έναντι των γαστρεντερικών νηματωδών, β) να υπολογιστεί η μέση αποτελεσματική συγκέντρωση (EC₅₀), δηλαδή η μέση δόση της συγκέντρωσης που απαιτείται για να διακοπεί ο βιολογικός κύκλος στο 50% του πληθυσμού του εκάστοτε μελετώμενου παρασίτου και γ) να συσχετιστεί η ανθελμινθική δράση με το προφίλ των βιοδραστικών φαινολικών συστατικών τους.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν *in vivo* πειραματισμοί με τη χρήση καρπών χαρουπιάς (*Ceratonia siliqua*) και συμπήκτων (pellets) ονοβρυχίδας (*Onobrychis viciifolia*), για τα οποία είναι γνωστό ότι περιέχουν σημαντικά επίπεδα ταννινών. Τα υλικά αυτά ενσωματώθηκαν σε σιτηρέσια αρνιών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και συνδυασμούς, με σκοπό να διαπιστωθεί η ανθελμινθική τους δράση και να επιλεγεί η κατάλληλη δοσολογία χορήγησής τους. Στους πειραματισμούς αυτούς επίσης διερευνήθηκε εάν η ανθελμινθική δράση τους οφείλεται όντως στην παρουσία των ταννινών (μέσω της χρήσης αναστολέα των ταννινών), όπως επίσης και η ενδεχόμενη συνεργική δράση των ταννινών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: *IN VITRO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΙ

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως αναφέρθηκε στο Γενικό μέρος, ο παρασιτισμός από τα γαστρεντερικά νηματώδη στα μικρά μηρυκαστικά αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική απειλή (Perry & Randolph, 1999; Stear et al., 2007), η οποία παραδοσιακά αντιμετωπίζεται με τη χρήση ευρέως φάσματος ανθελμινθικών φαρμάκων. Όμως, η εφαρμογή της πρακτικής αυτής συνδέεται με δύο σημαντικά προβλήματα: 1) την εμφάνιση του φαινομένου της ανθελμινθοαντοχής και 2) τον περιορισμό της χρήσης τους στις εκτροφές των αιγών και των προβάτων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης μόνο κατά την περίοδο που δεν αρμέγονται, εξαιτίας του χρόνου αναμονής που πρέπει να τηρείται ώστε να αποφευχθεί η παρουσία καταλοίπων τους στο γάλα (Torres-Acosta et al., 2012; Jackson et al., 2012; Kaplan & Vidyashankar, 2012; Geurden et. al., 2014; Keane et al., 2014). Κατά συνέπεια, η αναζήτηση εναλλακτικών ή συμπληρωματικών τρόπων αντιμετώπισης των παρασιτώσεων αποτελεί, εδώ και αρκετά χρόνια, σημαντικό ερευνητικό πεδίο (Jackson, 2000; Waller, 2006; Hoste & Torres-Acosta, 2011) στο οποίο μάλιστα σημαντική θέση κατέχει η διερεύνηση της χρήσης στη διατροφή των ζώων διαφόρων «βιοενεργών» φυτικών υλικών που διαθέτουν ανθελμινθικές ιδιότητες (Rochfort et al., 2008).

Από τα φυτά αυτά ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν όσα έχουν τη δυνατότητα της συνδυασμένης χρήσης τους τόσο ως συστατικά της διατροφής, όσο και ως φάρμακα. Αυτά είναι γνωστά με τον αγγλικό όρο «nutraceutical plants» (Waller & Thamsborg, 2004; Hoste et al., 2006; Alonso-Díaz et al., 2010; Hoste et al., 2015). Η πρακτική που ακολουθείται για την αξιολόγηση της ανθελμινθικής δράσης των βιοενεργών φυτών είναι σε πρώτη φάση, διενέργεια *in vitro* δοκιμών στο εργαστήριο, όπου βάσει των αποτελεσμάτων γίνεται η αρχική επιλογή των υπό διερεύνηση φυτών και στη συνέχεια η διενέργεια δοκιμών στα ζώα (*in vivo*) όπου και επιβεβαιώνεται ή μη, η δράση αυτή (Jackson & Hoste, 2010). Η προσέγγιση αυτή έχει επικρατήσει για δύο κυρίως λόγους: α) για την ανάγκη μείωσης διεξαγωγής πειραμάτων σε ζώα, σύμφωνα με την πολιτική της ΕΕ που βασίζεται στην θεωρία των 3Rs (Replacement / Reduction / Refinement) Αντικατάσταση / Μείωση / Βελτίωση (https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/3r/alternative_en.htm) και β) λόγω οικονομικών και χρονικών περιορισμών εξαιτίας της πληθώρας των φυτικών ειδών που πιθανά παρουσιάζουν αντιπαρασιτική δράση.

Οι *in vitro* δοκιμές στηρίζονται στην αξιολόγηση της επίδρασης των εκχυλισμάτων των υπό μελέτη φυτών στις διάφορες φάσεις εξέλιξης των παρασίτων, όπως για παράδειγμα στην εκκόλαψη των αυγών τους, ή την ανάπτυξη των προνυμφών, ή την εγκατάστασή τους στον

ξενιστή κ.α. (Jabbar et al., 2006). Οι σημαντικότερες από τις μεθόδους αυτές, (περιγράφονται αναλυτικότερα στο **Κεφάλαιο 2.2.7.2.1.1.**) είναι: α) η δοκιμή εκκόλαψης των προνυμφών (Egg hatch test/EHT), β) η δοκιμή αναστολής σίτισης των προνυμφών (Larval feeding inhibition/LFIT), γ) η δοκιμή ανάπτυξης προνυμφών (Larval development assay/ LDA), δ) η δοκιμή έκδυσης προνυμφών (Larval exsheathment (inhibition) assay/LEIA), ε) η δοκιμή της αναστολής της μετανάστευσης των προνυμφών (Larval migration inhibition test/LMIT) και στ) η δοκιμή κινητικότητας των ενηλίκων παρασίτων (Adult motility test/AMT). Από τις παραπάνω δοκιμές, οι LEIA, LDA και AMT χρησιμοποιούνται σε φυτικά εκχυλίσματα για τα οποία υπάρχουν ήδη ενδείξεις ότι εμφανίζουν αντιπαρασιτική δράση, επειδή έχουν αυξημένο κόστος εφαρμογής και είναι πιο χρονοβόρες (Jackson & Hoste, 2010). Στο σημείο αυτό, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα φυτικά εκχυλίσματα που παρουσιάζουν *in vitro* δραστηριότητα, είναι δυνατόν να εμφανίσουν μικρότερη ή και καμία δράση όταν δοκιμάζονται *in vivo* (Jackson & Hoste, 2010).

Οι στόχοι της έρευνας που παρουσιάζεται στο παρόν κεφάλαιο είναι: α) η *in vitro* διερεύνηση και αξιολόγηση της ανθελμινθικής δράσης 31 φυτικών εκχυλισμάτων, β) ο υπολογισμός της μέσης αποτελεσματικής συγκέντρωσης (EC_{50}), δηλαδή της μέσης δόσης του εκάστοτε εκχυλίσματος που απαιτείται για να διακοπεί ο βιολογικός κύκλος στο 50% του πληθυσμού του εκάστοτε υπό μελέτη παρασίτου και γ) η διερεύνηση του περιεχομένου των σε ολικές πολυφαινόλες (TPC), ολικά φλαβονοειδή (TFC) και τις επιμέρους πολυφαινόλες. Τα φυτικά εκχυλίσματα παραλήφθηκαν από μέρη (φύλλα, καρποί, βλαστοί) 25 φυτικών ειδών που ανήκουν σε τρεις σημαντικές φυτικές οικογένειες (Fabaceae, Oleaceae και Rosaceae) και οι προσδιορισμοί δραστηριότητας έγιναν έναντι των γαστρεντερικών νηματωδών παρασίτων *Haemonchus contortus* και *Trichostrongylus colubriformis*.

4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1. Επιλογή Ειδών Παρασίτων

Για τη παρούσα μελέτη ως παράσιτα-μοντέλα επιλέχθηκαν τα νηματώδη παράσιτα *H. contortus* και *Tr. colubriformis* επειδή: α) είναι τα πιο συχνά παράσιτα των προβάτων και των αιγών σε παγκόσμιο επίπεδο, β) επηρεάζουν σημαντικά την υγεία και ευζωία των ζώων στα οποία παρασιτούν, γ) το *H. contortus* εντοπίζεται στο ήνυστρο, ενώ το *Tr. colubriformis* στο λεπτό έντερο των ξενιστών τους, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα να μελετηθούν οι εκάστοτε διαφορές που παρατηρούνται στη δράση των υπό μελέτη βιοενεργών συστατικών και δ) χρησιμοποιούνται συχνά σε παρόμοιες μελέτες αποτελεσματικότητας φυτών με ανθελμινθική δράση, γεγονός που δίνει και τη δυνατότητα της συγκριτικής αξιολόγησης των ερευνητικών ευρημάτων μιας νέας έρευνας με αυτά παρόμοιων μελετών (Manolaraki et al., 2010; Morgan & van Dijk, 2012; Moreno-Gonzalo et al., 2012, 2013a,b; Arroyo-Lopez et al., 2014; Barone et al., 2018, 2019; Zajac & Garza, 2020).

4.2.2 Επιλογή Φυτικών Ειδών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο γενικό μέρος, για τους πειραματισμούς της παρούσας διατριβής επελέγησαν φυτά της Ελληνικής χλωρίδας που: α) αποτελούν μέρος της βασικής χλωρίδας των μεσογειακών οικοσυστημάτων, β) είναι βιβλιογραφικά γνωστό ότι εμπεριέχουν ικανές ποσότητες δευτερογενών μεταβολιτών και γ) είναι αρκετά διαδεδομένα στην Ευρώπη ώστε να είναι διαθέσιμα για κατανάλωση από τα αιγοπρόβατα. Με βάση το σκεπτικό αυτό επιλέχθηκαν τα φυτικά είδη τριών μεγάλων και σημαντικών Οικογενειών, όπως φαίνονται στον **Πίνακα 4.1**. Κοινό χαρακτηριστικό των επιλεγέντων φυτών, είναι η σχετικά υψηλή περιεκτικότητά τους σε ταννίνες (Bravo et al., 1994; Batlle & Tous, 1997; Marais et al., 2000; Gudej & Tomczyk, 2004; Martín-García & Molina-Alcaide, 2008; Tomczyk & Latté, 2009).

Πίνακας 4.1. Φυτικά είδη των οποίων η δράση εξετάστηκε έναντι των γαστρεντερικών παρασίτων *H. contortus* και *Tr. colubriformis*

<i>Οικογένεια</i>	<i>Γένος</i>	<i>Είδος</i>	<i>Μέρος φυτού που χρησιμοποιήθηκε</i>
<i>Fabaceae</i> (Lindl)	Ceratonia L.	<i>C. siliqua</i> L.	Καρποί
	Onobrychis Mill.	<i>On. alba subsp. laconica</i> (Orph ex Boiss.)	Υπέργειο
		<i>On. peloponnesiaca</i>	Υπέργειο
<i>Oleaceae</i> (Hoffmanns. & Link)	Olea L.	<i>O. europaea</i> L.	Φύλλα
			Νωπή πούλπα
			Ξηρή πούλπα
<i>Rosaceae Juss</i>	Alchemilla L.	<i>Al. bulgarica</i> Rothm.	Υπέργειο
		<i>Al. xanthochlora</i> Rothm.	Υπέργειο
	Aremonia Neck. ex Nestl.	<i>Ar. agrimonoides</i> (L.) DC	Υπέργειο
	Crataegus L.	<i>C. orientalis</i> Pall. ex M.Bieb.	Υπέργειο
	Fragaria L.	<i>F. vesca</i> L.	Υπέργειο
	Geum L.	<i>G. urbanum</i> L.	Υπέργειο
	Potentilla L.	<i>P. haynaldiana</i>	Υπέργειο
		<i>P. pedata</i> Willd. ex Hornem.	Υπέργειο
		<i>P. recta</i> L.	Υπέργειο
		<i>P. speciosa</i> Willd.	Υπέργειο
	Prunus L.	<i>Pr. mahaleb</i> L.	Υπέργειο
		<i>Pr. prostrata</i> Labill.	Υπέργειο
		<i>Pr. webbii</i> (Spach) Vierh.	Υπέργειο
	Pyracantha M. Roem.	<i>P. coccinea</i> M. Roem.	Υπέργειο Σπόρος
	Pyrus L.	<i>P. spinosa</i> Forssk.	Υπέργειο
			Σπόρος
	Rosa L.	<i>R. canina</i> L.	Υπέργειο Καρπός
		<i>R. pulverulenta</i> M. Bieb.	Υπέργειο
		<i>R. sempervirens</i> L.	Υπέργειο Καρπός
	Rubus L.	<i>R. idaeus</i> L.	Υπέργειο
<i>R. sanctus</i> Schreb. (= <i>R. creticus</i> L.)		Υπέργειο	
Sorbus L.	<i>S. umbellata</i> (Desf.) Fritsch (= <i>Aria umbellata</i> Desf)	Υπέργειο	

4.2.3. Περιγραφή Φυτών ανά Οικογένεια

4.2.3.1. Οικογένεια Fabaceae Lindl.

Η οικογένεια των Fabaceae αποτελείται από 764 περίπου γένη και χιλιάδες είδη ξυλωδών (δενδρωδών ή θαμνωδών) και ποωδών φυτών ([Plants of the world online, 2020](#)).

Από τα ξυλώδη είδη της οικογένειας, επιλέχθηκε η χαρουπιά (*Ceratonia siliqua* L.), η οποία απαντάται στις παραμεσόγειες περιοχές και στη Νότια Πορτογαλία. Στην Ελλάδα φύεται κυρίως κοντά στις ακτές, σε πετρώδεις και προσήλιες θέσεις. Για πολλούς αιώνες οι καρποί της χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή, κυρίως σε μηρυκαστικά, πτηνά και χοίρους. Επειδή αποτελούν πλούσια πηγή κυτταρινών, θεωρούνται ως καταλληλότερη τροφή για τα μηρυκαστικά σε σύγκριση με τα μονογαστρικά ([Priolo et al., 1998](#); [Karabulut et al., 2006](#)). Επιπλέον, σύμφωνα με τους [Bravo et al. \(1994\)](#) και [Batlle & Tous \(1997\)](#), η συγκέντρωση των συμπυκνωμένων ταννινών στους ώριμους καρπούς της χαρουπιάς κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα (16-20 % w/w DM), ενώ σύμφωνα με τους [Priolo et al. \(2000, 2002\)](#), οι καρποί της έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε συμπυκνωμένες ταννίνες, οι οποίες όμως παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλή βιολογική δραστηριότητα. Η υψηλή περιεκτικότητα των υποπροϊόντων των καρπών του χαρουπιού σε συμπυκνωμένες ταννίνες, δικαιολογεί τη διερεύνηση της προστιθέμενης αξίας του ως ζωοτροφή, τόσο κατά τους *in vivo* όσο και για τους *in vitro* πειραματισμούς όσον αφορά την ανθελμινθική τους δράση ενάντια ορισμένων ειδών γαστρεντερικών νηματωδών.

Από τα ποώδη φυτά της συγκεκριμένης οικογένειας, επιλέχθηκαν οι ονοβρυχίδες (πολυετή ποώδη της τάξης Magnoliopsida), φυτά που ήδη θεωρούνται κτηνοτροφικά, καθώς παράγουν ζωοτροφές υψηλής πρωτεϊνικής αξίας. Για παράδειγμα, το είδος *Onobrychis viciifolia* καλλιεργείται εδώ και πολλά χρόνια σε διάφορες περιοχές της Ευρώπης και έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης για τη δράση του ενάντια σε γαστρεντερικά παράσιτα και κοκκίδια τόσο σε μηρυκαστικά, όσο και σε κουνέλια ([Hayot Carbonero et al., 2011](#); [Arroyo-Lopez et al., 2014](#); [Hoste et al., 2015](#); [Legendre et al., 2017, 2018](#)). Επειδή το συγκεκριμένο είδος δεν καλλιεργείται στη χώρα μας, επιλέχθηκαν δύο είδη ονοβρυχίδας που φύονται αυτοφυή στην Ελλάδα, η *On. alba subsp. laconica* και η *On. peloponnesiaca*, ώστε να εξεταστεί η ανθελμινθική τους δράση.

4.2.3.2. Οικογένεια Oleaceae Hoffmanns. & Link

Από την οικογένεια των ελαϊδων, η οποία περιλαμβάνει 27 γένη ([Plants of the world online, 2020](#)), η ελιά (*Olea europaea* - Ελιά, ευρωπαϊκή), θεωρείται ως το πλέον χαρακτηριστικό είδος

του μεσογειακού τοπίου (Zohary 1995; Zohary & Hopf 2000; Margaritis & Jones 2008). Είναι αείφυλλο αιωνόβιο δένδρο, με πολύ μεγάλη ανθεκτικότητα και ικανότητα να καρποφορεί υπό τις πλέον αντίξοες συνθήκες, ενώ εύκολα προσαρμόζεται σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Rugini, 1986). Αυτοφύεται στις παραμεσόγειες περιοχές, κοντά στις ακτές, ενώ στην Ελλάδα αποτελεί το κοινότερο είδος της ευμεσογειακής ζώνης βλάστησης (Αθανασιάδης, 1986). Παρόλο που η οικονομική και οικολογική σημασία της ελιάς είναι μεγάλη, τα απόβλητα των ελαιοτριβείων, που είναι πλούσια σε απλές και πολύπλοκες φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή, ανθοκυάνες και ταννίνες (Visioli et al., 1995), μένουν κατά το μεγαλύτερο τους μέρος αναξιοποίητα, ενώ θα μπορούσαν να έχουν ποικιλία βιομηχανικών χρήσεων και πιθανή ένταξή τους στη διατροφή των ζώων. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αφενός τα φύλλα του φυτού και αφετέρου τα υποπροϊόντα που προκύπτουν κατά την παραγωγή του ελαιολάδου (ελαιοπυρήνας, υπόλοιπα σάρκας καρπού και φύλλα), η νωπή πούλπα (προϊόν διφασικής επεξεργασίας) και η ξηρή πούλπα (προϊόν τριφασικής επεξεργασίας).

4.2.3.3. Οικογένεια Rosaceae

Η οικογένεια των Ροδοειδών ή ροδιδών (Rosaceae), θεωρείται μια μεσαίου μεγέθους οικογένεια, που περιλαμβάνει 105 γένη και 4.828 ποώδη και ξυλώδη είδη (The Plant List, 2013; Plants of the World, 2020), τα οποία παρουσιάζουν μια ιδιαίτερα σημαντική οικολογική, αλλά και οικονομική σημασία. Κοινό χαρακτηριστικό των ειδών αυτής της οικογένειας είναι ότι περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις πολυφαινόλων (Haslam, 1989).

Από τα ξυλώδη μέλη της οικογένειας αυτής επιλέχθηκαν τα *Crataegus orientalis* Pall. (κράταιγος, πολυσχίδης), *Prunus mahaleb* (Προύνος, μαχαλέβιος, κ. αγριοκερασιά), *Pr. prostrata* (Προύνος, κατακλινής) *Pr. webbii* (κ. Πικραμυγδαλιά), *Pyracantha coccinea* M. roem. (ερυθρή πυράκανθος), *Pyrus spinosa* (γκορτσιά), *Rosa canina* (Ροδή κυνοροδή), *R. pulverulenta* (Αγριοτριανταφυλλιά η κονιορτώδης), *R. sempervirens* (Ροδή, αειθαλής), *R. idaeus* L. (βάτος ο ιδάιος) και *Sorbus umbellata* (Σορβιά, σκιαδώδης). Από τα ποώδη είδη της οικογένειας, επιλέχθηκαν η *Alchemilla bulgarica*, *Al. xanthochlora*, *Aremonia agrimonoides*, *Fragaria vesca*, *Geum urbanum*, *Potentilla haynaldiana*, *P. pedate*, *P. recta*, *P. speciosa* και *Rubus sanctus*.

4.2.4. Τόπος/Χρόνος Συλλογής

Όλα τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονται από τον Ελλαδικό χώρο. Το φυτικό υλικό (δείγματα) συλλέχθηκε την περίοδο Μαΐου-Ιουνίου (όταν τα φυτά είναι στο βλαστικό ή στάδιο

ανθοφορίας) κατά τα έτη 2014 και 2015, όπως αναλυτικά παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5.2**. Οι καρποί του χαρουπιού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από την ίδια ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε και στους *in vivo* πειραματισμούς

4.2.5. Διαδικασία εκχύλισης

Μετά τη συλλογή τους, τα φυτικά δείγματα αφέθηκαν προς ξήρανση σε σκιερό-δροσερό σημείο. Στη συνέχεια, μια ποσότητα (5g-500g) από κάθε είδος ζυγίστηκε και αλέσθηκε (με σίτα οπής 1mm) και εκχυλίστηκε υπό ανάδευση σε διάλυμα αλκοόλης (ακετόνης/μεθανόλης). Το διήθημα συμπυκνώθηκε σε θερμοκρασία μικρότερη των 35°C με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα κενού (rotary evaporator), καταψύχθηκε για 2 ημέρες στους -20°C και λυοφιλοποιήθηκε στους -50°C. Από την διαδικασία αυτή προέκυψε το φυτικό εκχύλισμα υπό μορφή σκόνης, το οποίο και διατηρήθηκε σε ξηρό θάλαμο, έως την τελική του χρήση.

Πίνακας 4.2. Τόπος/Χρόνος Συλλογής Φυτικού Υλικού.

<i>Είδος</i>	<i>Τοποθεσία</i>	<i>Υψόμετρο</i>	<i>Ημερομηνία</i>
<i>Ceratonia siliqua</i> L.			
<i>Onobrychis alba subsp. laconica</i> Orph ex Boiss	Πάρνωνας	1940	Ιούνιος 2015
<i>On. peloponnesiaca</i> Iatrou & Kit Tan	Πάρνωνας	1940	Ιούνιος 2015
<i>Olea europaea</i> L.	Πύργος Ηλείας	15	Ιούνιος 2015
<i>Alchemilla bulgarica</i> Rothm.	Οίτη	1806	Ιούνιος 2015
<i>Al. xanthochlora</i> Rothm.	Οίτη	1571	Ιούνιος 2015
<i>Aremonia agrimonoides</i> (L.) DC	Οίτη	1777	Ιούνιος 2015
<i>Crataegus orientalis</i> Pall. ex M.Bieb.	Γκιώνα	1386	Ιούνιος 2014
<i>Fragaria vesca</i> L.	Τύμφη	1018	Ιούνιος 2015
<i>Geum urbanum</i> L.	Οίτη	1245	Ιούνιος 2015
<i>Potentilla haynaldiana</i>	Τύμφη	1081	Ιούνιος 2015
<i>P. pedata</i> Willd. ex Hornem.	Οίτη	1614	Ιούνιος 2015
<i>P. recta</i> L.	Χελμός	1621	Ιούνιος 2015
<i>P. speciosa</i> Willd.	Οίτη	1765	Ιούνιος 2015
<i>Prunus mahaleb</i> L.	Χελμός	1675	Ιούνιος 2015
<i>Pr. prostrata</i> Labill.	Τύμφη	1130	Ιούνιος 2015
<i>Pr. webbii</i> (Spach) Vierh.	Πάρνηθα	1006	Απρίλιος 2014
<i>Pyracantha coccinea</i> M. Roem.	Πάρνηθα	1048	Ιούνιος 2014
<i>Pyrus spinosa</i> Forssk.	Πάρνηθα	530	Απρίλιος 2014
<i>Rosa canina</i> L.	Πάρνηθα	1013	Μάιος 2014
<i>R. pulverulenta</i> M. Bieb.	Γκιώνα	1360	Ιούνιος 2014
<i>R. sempervirens</i> L.	Πάρνηθα	1047	Ιούνιος 2014
<i>Rubus idaeus</i> L.	Γράμμος		Ιούνιος 2015
<i>R. sanctus</i> Schreb. (= <i>R. creticus</i> L.)	Γκιώνα	948	Ιούνιος 2014
<i>Sorbus umbellata</i> Fritsch (= <i>Aria umbellata</i> Desf)	Χελμός	1587	Ιούνιος 2015

4.2.6. Παραγωγή υλικού Παρασίτων για τις *in vitro* δοκιμές

Οι *in vitro* πειραματισμοί για τη μελέτη της ανθελμινθικής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκαν σε προνύμφες L₃ δύο ειδών γαστρεντερικών παρασίτων, των *H. contortus* και *Tr. colubriformis*. Η συλλογή των απαραίτητων προνυμφών των παρασίτων αυτών που απαιτούνταν για τη διενέργεια των δοκιμών επιτεύχθηκε με την πειραματική μόλυνση 2 αρνιών (με ένα είδος παρασίτου ανά ζώο). Τα παραπάνω ζώα μολύνθηκαν με στελέχη των παρασίτων που συντηρούνται στο Εργαστήριο Παρασιτολογίας του ΙΚΕΘ. Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, τα ζώα-δότες παρέμειναν χωριστά, σε ειδικά διαμορφωμένους κλωβούς, για να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση από διαφορετικό είδος. Δύο εβδομάδες μετά τη πειραματική αυτή μόλυνση και για διάστημα δύο περίπου μηνών γίνονταν σε καθημερινή βάση συλλογή κοπράνων από τα ζώα, για τον έλεγχο της παρουσίας αυγών των εν λόγω παρασίτων και στη συνέχεια καλλιέργεια και απομόνωση των αυγών αυτών, με τη μέθοδο της κοπρανοκαλλιέργειας και την τεχνική Baermann αντίστοιχα (MAFF, 1986). Σκοπός της καλλιέργειας ήταν η συλλογή ικανού αριθμού προνυμφών των παρασίτων, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή ανθελμινθικής δράσης των εκχυλισμάτων των υπό μελέτη φυτών.

Αναλυτικότερα, τα κόπρανα των μολυσμένων ζώων τοποθετούνταν σε δοχείο, διαβρέχονταν με νερό βρύσης, αναδεύονταν με σπάτουλα και τοποθετούνταν σε κλίβανο με σταθερές συνθήκες (27° C) για 14 ημέρες, ώστε να εξελιχθούν τα αυγά σε L₃ προνύμφες. Κάθε 2 ημέρες ελέγχονταν η υγρασία, διαβρεχόταν η μάζα των κοπράνων και αναδεύονταν με ξύλινη σπάτουλα.

Μετά το πέρας των 14 ημερών και την καλλιέργεια των κοπράνων σύμφωνα με το πρωτόκολλο MAFF (1986), ακολουθήθηκε η τεχνική Baermann, ώστε να συλλεχθούν οι L₃ προνύμφες των παρασίτων σε φιαλίδια και να διατηρηθούν στους 4°C, έως την τελική χρήση τους για τον *in vitro* πειραματισμό. Σύμφωνα με την τεχνική Baermann, τα κόπρανα τοποθετήθηκαν σε σουρωτήρι (μέσα στο οποίο είχε προσαρμοστεί διηθητικό χαρτί-μονό φύλλο και διπλό φύλλο γάζας), το οποίο τοποθετούνταν στο στόμιο γυάλινης κωνικής φιάλης, γεμάτης με νερό βρύσης σε θερμοκρασία δωματίου, για 12 ώρες. Μετά από την παρέλευση 12 ωρών, οι ζωντανές προνύμφες που έχουν την ιδιότητα να κατευθύνονται στον πάτο της κωνικής, αναρροφήθηκαν με τη χρήση πιπέτας και τοποθετήθηκαν σε πλαστικά φιαλίδια των 50mL. Ακολούθησαν 3 πλύσεις με νερό βρύσης και φυγοκεντρήσεις τους στις 1500 στροφές/λεπτό, για πέντε λεπτά και αναρρόφηση των υπερκειμένων υγρών έως τα 10mL. Στα 10mL που παρέμειναν στο φιαλίδιο εμπεριέχονταν οι προνύμφες, οι οποίες για να διατηρηθούν ζωντανές μεταφέρθηκαν

σε επίπεδες φιάλες με πώμα φίλτρου (τύπου κυτταροκαλλιέργειας), ώστε να είναι δυνατός ο αερισμός τους και τοποθετήθηκαν σε θαλάμους ψύξης των 4°C έως την τελική χρήση τους. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις προνυμφών, αυτές αραιώθηκαν σε διάλυμα PBS (ουδέτερο φωσφορικό διάλυμα το οποίο αποτελείται από 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄ και 1.4 mM KH₂PO₄), ώστε η συγκέντρωσή τους να μην υπερβαίνει τις 5.000 προνύμφες ανά mL. Η ηλικία των προνυμφών έως τη χρήση τους δε ξεπερνούσε τους 6 μήνες.

Για προστασία από τις επιμολύνσεις, οι χειρισμοί στα διαφορετικά παράσιτα πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές ημέρες και σε συγκεκριμένα σκεύη, τα οποία κάθε φορά αποστειρώνονταν.

4.2.7. *In vitro* Πειραματισμός–Δοκιμή Έκδυσης Προνυμφών (Larval Exsheathment Inhibition Assay-LEIA)

Αφού προετοιμάστηκαν τα φυτικά εκχυλίσματα και οι L₃, εφαρμόστηκε η Δοκιμή Έκδυσης των Προνυμφών (Larval Exsheathment Inhibition Assay/LEIA) (Alvarez-Sanchez et al., 2005), για να προσδιοριστεί η ανθελμινθική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων (σε διαφορετικές συγκεντρώσεις). Η συγκεκριμένη δοκιμή στοχεύει στην προοδευτική έκδυση των προνυμφών L₃ που έχουν εκτεθεί σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φυτικού εκχυλίσματος, εντός 60 min, για να είναι εφικτή η μικροσκοπική παρατήρηση της διαδικασίας. Σύμφωνα με τους Jackson & Hoste (2010), για να πιστοποιηθεί η αξιόπιστη λειτουργία της δοκιμασίας, θα πρέπει μετά το πέρας των 60 min οι προνύμφες στην ομάδα του μάρτυρα να έχουν υποστεί έκδυση σε ποσοστό 100%. Στην πράξη, όλα τα ποσοστά άνω του 99% θεωρούνται ως αποδεκτά. Με αυτή την διαδικασία υπολογίζονται τα ποσοστά προνυμφών L₃ που υπέστησαν έκδυση, δηλαδή συνέχισαν το βιολογικό τους κύκλο.

Η δοκιμή LEIA επιλέχθηκε να εφαρμοστεί γιατί, εκτός των άλλων, επιτρέπει τον υπολογισμό της Μέσης Αποτελεσματικής Δόσης (EC₅₀-value) (Jackson & Hoste, 2010).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η επώαση των προνυμφών σε περιέκτες των 15mL, όπου τοποθετήθηκαν διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (1200μg/mL, 600μg/mL, 300μg/mL, 150μg/mL, μάρτυρας) των υπό διερεύνηση εκχυλισμάτων, αραιωμένα σε PBS. Ακολούθησαν 3 πλύσεις με PBS με τις αντίστοιχες φυγοκεντρήσεις (1000rpm/20° C/3min) και οι προνύμφες υποβλήθηκαν σε τεχνητή έκδυση με τη βοήθεια υποχλωριώδους διαλύματος 2% w/v, αραιωμένο σε PBS (1/300 για τις προνύμφες *H. contortus* και 1/150 για τις *Tr. colubriformis*).

Στη συνέχεια, για κάθε συγκέντρωση μετρήθηκαν οι προνύμφες που υποβλήθηκαν σε έκδυση, με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (μεγέθυνση 20X). Ο προσδιορισμός των προνυμφών που είχαν υποστεί έκδυση πραγματοποιήθηκε ανά είκοσι λεπτά της ώρας τόσο για τις προνύμφες του *Tr. colubriformis*, όσο και του *H. contortus*.

Στο σύνολό τους, για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις ανά δείγμα.

4.2.8. Προσδιορισμός Περιεχομένου των Εκχυλισμάτων

Ο προσδιορισμός του περιεχομένου των εκχυλισμάτων ως προς τις παραμέτρους των ολικών πολυφαινολών (TPC), των ολικών φλαβονοειδών (TFC) και των επιμέρους πολυφαινολών, πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως & Διατροφής, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

4.2.8.1. Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών – Μέθοδος Folin-Ciocalteu

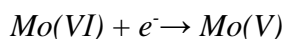
4.2.8.1.1. Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (F-C), η οποία χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του περιεχομένου σε ολικές φαινολικές ενώσεις, είναι μια φωτομετρική μέθοδος που αναπτύχθηκε το 1927 αρχικά για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Βασίζεται στο γεγονός ότι το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται αντιδρά με το φαινολικό δακτύλιο της τυροσίνης, σχηματίζοντας ένα έγχρωμο παράγωγο. Στη συνέχεια, οι [Singleton & Rossi \(1965\)](#) βελτίωσαν τη μέθοδο και τη χρησιμοποίησαν για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών σε οίνους. Σήμερα, η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου διαφόρων φυσικών προϊόντων.

Παρά το γεγονός ότι η κύρια χρήση της μεθόδου F-C αφορά τον προσδιορισμό περιεχομένου σε φαινολικές ουσίες, στην πραγματικότητα ταυτόχρονα υπολογίζει και την αναγωγική ικανότητα του δείγματος, αφού η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι μια οξειδοαναγωγή. Ως εκ τούτου, η παραπάνω μέθοδος έχει γίνει ευρέως αποδεκτή και ως μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης ανήκει στην κατηγορία της μεταφοράς ηλεκτρονίων, γι' αυτό δεν πρέπει να ξαφνιάζει το γεγονός ότι το «πολυφαινολικό προφίλ» που προσδιορίζεται με αυτή τη μέθοδο παρουσιάζει πολύ καλή γραμμική συσχέτιση με την αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίζεται με άλλες μεθόδους προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας που περιλαμβάνουν και αυτές μεταφορά ηλεκτρονίων, όπως για παράδειγμα η μέθοδος FRAP.

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu παρασκευάζεται με ανάμιξη $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, HCl , 85% H_3PO_4 σε νερό και βράσιμο για 10 ώρες. Κατόπιν προστίθεται $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, το οποίο δίνει στο αντιδραστήριο ένα χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Η ακριβής χημική σύσταση του αντιδραστηρίου δεν είναι γνωστή, η αντίδραση όμως που λαμβάνει χώρα είναι η αναγωγή του Mo(VI) σε Mo(V) με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου.



Προφανώς η παραπάνω αντίδραση δεν είναι επιλεκτική μόνο για τις φαινόλες, αφού μπορεί να πραγματοποιηθεί και με την παρουσία και άλλων αναγωγικών παραγόντων (βιταμίνη C, Cu(I) , κ.τ.λ.). Οι φαινόλες αντιδρούν με το αντιδραστήριο F-C μόνο σε βασικό περιβάλλον. Έτσι, πριν από την προσθήκη του αντιδραστηρίου F-C το pH του δείγματος γίνεται βασικό ($\text{pH} \approx 10$) με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3). Η απόσπαση ενός φαινολικού πρωτονίου οδηγεί στο σχηματισμό ενός φαινολικού ανιόντος, που ανάγει το αντιδραστήριο F-C σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο χρώματος βαθέως κυανού, το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 745-750 nm.

Η πειραματική διαδικασία που αναπτύχθηκε από τους [Singleton & Rossi \(1965\)](#) είναι η εξής: 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος, αναμειγνύεται με 60 mL ύδατος και 5mL αντιδραστηρίου F-C. Στη συνέχεια προστίθενται 15 mL διαλύματος Na_2CO_3 και ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 100 mL με προσθήκη ύδατος. Μετά από επώαση για 2 ώρες απουσία φωτός, μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 765 nm. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιείται το γαλλικό οξύ ως πρότυπο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η μέθοδος F-C είναι απλή, επαναλήψιμη και εύκολη. Έτσι έχει εξελιχθεί σε μια μέθοδο ρουτίνας τόσο για την μέτρηση των ολικών φαινολικών ουσιών, όσο και για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

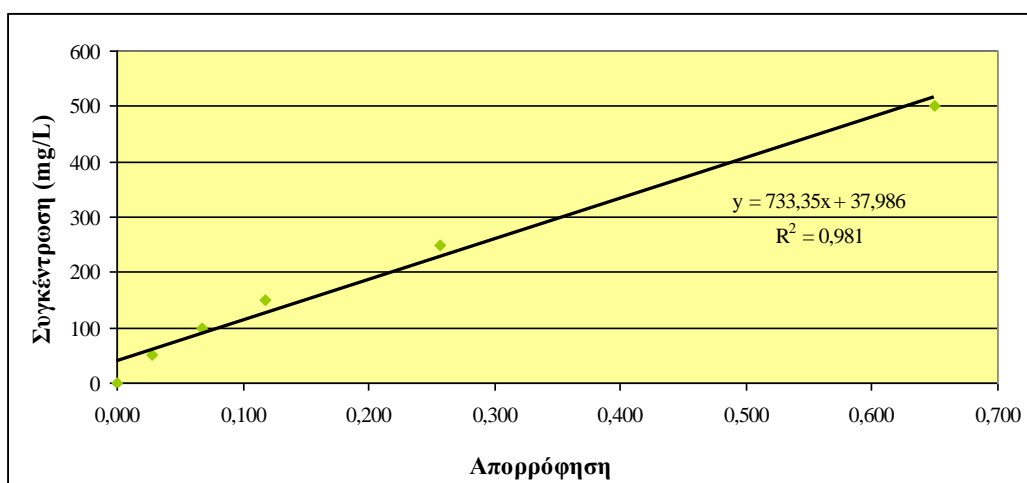
4.2.8.1.2. Αναλώσιμα - Συσκευές

Για τον προσδιορισμό ολικών φαινολικών, με την μέθοδο Folin-Ciocalteu, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC, 2N), κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) 20% w/v, αιθανόλη (EtOH), γαλλικό οξύ, απιονισμένο νερό και ογκομετρικές φιάλες των 10 mL. Οι διαλύτες ήταν αναλυτικής καθαρότητας και η προμήθειά τους, μαζί με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και το γαλλικό οξύ, έγινε από την εταιρεία Sigma Aldrich. Η απορρόφηση μετρήθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου διπλής δέσμης Hitachi U-1500.

4.2.8.1.3. Πειραματική Διαδικασία

Τα στερεά δείγματα διαλυτοποιήθηκαν με μίγμα H₂O / EtOH (85:15) σε συγκέντρωση 1 mg/mL. Για την παρασκευή του διαλύματος βάσης (stock solution) του γαλλικού οξέος, ζυγίστηκαν 0,125 g πρότυπης ουσίας σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL που στη συνέχεια συμπληρώθηκε με μίγμα H₂O / EtOH (90:10). Από το διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution) παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις πέντε πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος σε περιοχή συγκεντρώσεων μεταξύ 50-500 mg/L προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς (**Γράφημα 4.1**). Οι αραιώσεις έγιναν προκειμένου η απορρόφηση να είναι στα όρια ανίχνευσης του οργάνου και παράλληλα να ισχύει ο νόμος του Beer-Lambert.

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL τοποθετήθηκαν 100 μL δείγματος (ή προτύπου για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 6 mL απεσταγμένου νερού και 0,5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (2N). Ακολούθησε ανάδευση και μετά από 3 λεπτά (min) προστέθηκαν 1,5 mL διαλύματος Na₂CO₃. Μετά προστέθηκε νερό στις φιάλες για να επιτευχθεί όγκος 10 mL. Όλες οι ογκομετρικές φιάλες καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και φυλάχθηκαν σε σκιερό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h, προκειμένου να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Η απορρόφηση των δειγμάτων καταγράφηκε στα 725 nm και η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών προσδιορίστηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς και εκφράστηκε σε mg γαλλικού οξέος ανά g ξηρού δείγματος. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.



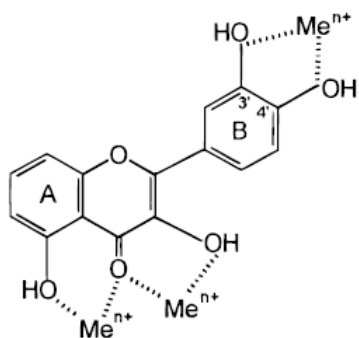
Γράφημα 4.1. Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης γαλλικού οξέος σε σχέση με την απορρόφηση στα 725 nm, $y = 733,35x + 37,986$ και $R^2 = 0,981$

4.2.8.2. Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών

4.2.8.2.1. Αρχή της Μεθόδου

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των ολικών φλαβονοειδών που εμπεριέχονται σε ένα φυτικό εκχύλισμα αναφέρονται σε πρωτόκολλα που περιλαμβάνουν αντιδράσεις συμπλοκοποίησης των φλαβονοειδών με μέταλλα, οι οποίες δίνουν έγχρωμα προϊόντα, τα οποία μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν χρωματομετρικά (Gunes et al., 2002, Nacz & Shahidi, 2004, Malešev & Kuntić, 2007). Παρότι σε ορισμένες περιπτώσεις αμφισβητείται η εκλεκτικότητα των χρωματομετρικών αυτών προσδιορισμών, στην περίπτωση σύνθετων υποστρωμάτων, όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα (Malešev & Kuntić, 2007), εφαρμόζονται συστηματικά.

Τα κέντρα συμπλοκοποίησης των φλαβονοειδών είναι οι κατεχόλες του δακτυλίου B και οι 3- ή 5-υδροξύ 4-καρβονυλο ομάδες των δακτυλίων A και C (Σχήμα 4.1).



Σχήμα 4.1. Κέντρα συμπλοκοποίησης φλαβονοειδών και μετάλλων.

Για δείγματα που εμπεριέχουν φλαβονοειδή και ενώσεις με παρόμοια δομικά και χημικά χαρακτηριστικά (π.χ. κατεχόλες), ενέχεται πάντοτε ο κίνδυνος για λανθασμένες εκτιμήσεις (συμπροσδιορισμός). Με βάση τη βιβλιογραφία, η εκτίμηση των ολικών φλαβονοειδών ενός φυτικού υλικού, πραγματοποιείται κυρίως μέσω δύο μεθόδων συμπλοκοποίησης μετάλλων-φλαβονοειδών (Nacz & Shahidi, 2006). Η διαφοροποίηση των μεθόδων έγκειται στην απουσία ή παρουσία του νιτρώδους νατρίου (NaNO₂) και την παρουσία (ή απουσία) οξέος. Στην παρούσα διατριβή, ο προσδιορισμός της παρουσίας των ολικών φλαβονοειδών έγινε παρουσία NaNO₂, με κάποιες τροποποιήσεις της μεθόδου των Gunes et al. (2002).

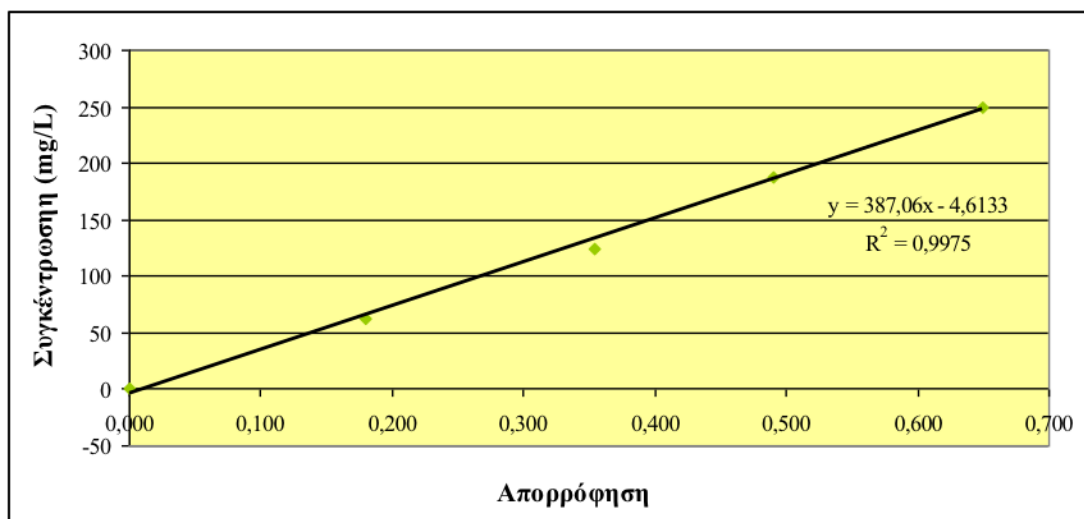
4.2.8.2.2. Αναλώσιμα - Συσκευές

Για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών, χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό, διάλυμα NaNO₂, 5% w/v, διάλυμα AlCl₃•6H₂O, 10% w/v, διάλυμα NaOH, 1M, (+)-κατεχίνη

και ογκομετρικές φιάλες των 10 mL. Η προμήθεια των αντιδραστηρίων και της πρότυπης ουσίας κατεχίνης έγινε από την εταιρεία Sigma Aldrich. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500.

4.2.8.2.3. Πειραματική διαδικασία

Τα στερεά δείγματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν με MeOH σε συγκέντρωση 0,5 mg/mL. Ποσότητα δείγματος 1 mL τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και αναμείχθηκε με 4 mL διπλά απεσταγμένου ύδατος και 0,3 mL διαλύματος NaNO₂, 5%. Μετά από 5 min προστέθηκαν 0,3 mL διαλύματος AlCl₃, 10% και μετά από 1 min, προστέθηκαν 2 mL διαλύματος NaOH 1M. Στη συνέχεια προστέθηκε απεσταγμένο ύδωρ έως τα 10 mL. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 510 nm με χρήση φασματοφωτόμετρου διπλής δέσμης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης (Γράφημα 4.2.) παρασκευάστηκαν πέντε διαλύματα κατεχίνης εύρους συγκεντρώσεων 62,5-250 mg/L. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις και τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν σε mg ισοδύναμων κατεχίνης ανά g ξηρού βάρους.



Γράφημα 4.2. Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης κατεχίνης σε σχέση με την απορρόφηση στα 510 nm ($y = 387,06x - 4,613$ και $R^2 = 0,998$)

4.2.8.3. Προσδιορισμός περιεχομένου πολυφαινολών των εκχυλισμάτων

Ο προσδιορισμός του περιεχομένου πολυφαινολών των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης – σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών (Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry / UPLC- MS-MS).

Η προμήθεια των πρότυπων ουσιών έγινε από την Extrasynthese (Genay Cedec, France), Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA), Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA) και Fluka (Buchs, Switzerland), ενώ οι διαλύτες από την Merck (Darmstadt, Germany). Για τις χρωματογραφικές αναλύσεις παρασκευάστηκε HPLC-νερό, με χρήση συστήματος Milli-Q system (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) και όλοι οι διαλύτες (εκτός από το ακετονιτρίλιο), διηθήθηκαν πριν από τη χρήση, διαμέσου μεμβρανών οξικής κυτταρίνης 0,45μm.

Τα πρότυπα μεθανολικά διαλύματα (100μg/mL) διατηρούντο στους -4° C, στο σκοτάδι, ώστε να αποφευχθεί η αποσύνθεση. Στη συνέχεια, αραιώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης, πριν από την εκτέλεση των αναλύσεων. Κάθε δείγμα αναλύθηκε δύο φορές, με άμεση έγχυση σε UPLC-MS/MS. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν απουσία άμεσου ηλιακού φωτός και σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 35° C, για την αποφυγή ισομερισμού πολυφαινολών.

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση συστήματος Υγρής Χρωματογραφίας UPLC-MS/MS, Accela Ultra High-Performance (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), σε συνδυασμό με τριπλό τετράπολο φασματόμετρο μάζας TSQ Quantum Access σε λειτουργία πολλαπλής παρακολούθησης αντίδρασης (Multiple Reaction Monitoring) και εξοπλισμένο με αυτόματο δειγματολήπτη (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Η φασματομετρική ανάλυση μάζας πραγματοποιήθηκε με θερμαινόμενο ιονισμό ηλεκτροδιάχυσης (HESI), σε λειτουργία θετικού και αρνητικού ιονισμού. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε λειτουργία παρακολούθησης της αντίδρασης, ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία των πρότυπων αναλυτών. Η πηγή ιονισμού και οι παράμετροι κενού στο φασματόμετρο μάζας βελτιστοποιήθηκαν για όλους τους αναλύτες. Αυτές οι παράμετροι, καθώς και ο προσδιορισμός των μεταβάσεων των μοριακών ιόντων και ο ενεργοποιημένος με σύγκρουση ιονισμός για τους αναλύτες-στόχους (target analytes), ελήφθησαν με άμεση έγχυση, σε λειτουργία πλήρους σάρωσης των πρότυπων διαλυμάτων τους, που εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων.

Η πηγή ιονισμού (ESI) ρυθμίστηκε σε αρνητική πολικότητα, λόγω της ευαισθησίας που εμφάνισαν δύο ενώσεις-στόχοι σε αυτήν την λειτουργία ιόντων. Η τάση ψεκασμού ρυθμίστηκε στα 2.700 V, και η πίεση κύριου (sheath gas) και βοηθητικού (auxiliary gas) αερίου σε 25 και

10 Arb αντίστοιχα. Η τριχοειδής θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 320° C και η πίεση θραύσης/σύγκρουσης στα 1,5 mTorr. Οι μεταβάσεις ιόντων παρακολούθησης ήταν m/z 227.9>186.5 (ενέργεια σύγκρουσης 22 eV) και 227.9>143.9 (ενέργεια σύγκρουσης 29 eV) για την trans-resveratrol και 389.8 > 227.6, 389.8 > 186.0 και m/z 389.8 > 143.6 για την trans-piceid με ενέργεια σύγκρουσης 26, 43 και 54 eV, αντίστοιχα.

Οι πολυφαινόλες διαχωρίστηκαν σε χρωματογραφική στήλη Hypersil Gold 100 × 2,1 cm (Thermo Fischer Scientific, San Jos, CA), χρησιμοποιώντας κινητή φάση αποτελούμενη από νερό (A) και ακετονιτρίλιο (B) με την προσθήκη 0,1% μυρμηκικού οξέος σε κάθε διαλύτη. Το διαβαθμισμένο πρόγραμμα έκλουσης ήταν 0,0–1,0 min: 10% B, 1,0–12,0 min από 10% B έως 100%, και 12,1–14,0 min 10% B, για την επαναβαθμονόμηση της στήλης, με ρυθμό έκλουσης 300μL/min και όγκο έγχυσης 10μL, σε σταθερή θερμοκρασία στήλης στους 35 °C.

Η γραμμικότητα για όλους τους αναλύτες προσδιορίστηκε εντός των ορίων των 10-1000 ng / mL (χρησιμοποιώντας πρότυπα βαθμονόμησης), καταδεικνύοντας αποδεκτές τιμές συντελεστή συσχέτισης ($r^2 \geq 0,99$). Η ανάκτηση των υπό μελέτη ενώσεων (ως κριτήριο της ορθότητας της μεθόδου) αξιολογήθηκε σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης (40 και 200 ng / mL), με την προσθήκη μικτών διαλυμάτων των προτύπων στο αντίστοιχο εκχύλισμα και ήταν εντός του αποδεκτού εύρους 70% – 120%. Οι τιμές ακρίβειας (precision values) ήταν πάντα αποδεκτές, με το ποσοστό σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) <15%.

4.2.9. Στατιστική Επεξεργασία

Η μέση αποτελεσματική δόση (EC_{50} -value) κάθε εκχυλίσματος στον τελικό χρόνο των 60 λεπτών (min) υπολογίστηκε με τη χρήση Probit ανάλυσης (Probit Regression analysis) του στατιστικού πακέτου SPSS 19 Ltd. Ως ανεξάρτητη μεταβλητή (fixed effect) ορίστηκε το επίπεδο συγκέντρωσης του εκχυλίσματος (σε 5 επίπεδα -1200, 600, 300, 150, 0 $\mu\text{g/mL}$ -συγκέντρωσης εκχυλίσματος) και ως συχνότητα απόκρισης (response frequency) ο αριθμός των L_3 που υπέστησαν έκδυση στον τελικό χρόνο των 60 min. Η ανάλυση Probit επιλέχθηκε γιατί μοντελοποιεί την πιθανότητα απόκρισης σε ένα ερέθισμα και είναι η πιο κατάλληλη για την εκτίμηση δράσης μιας ή περισσότερων ανεξάρτητων μεταβλητών, όταν η δράση είναι δοσοεξαρτώμενη.

Στον όρο *Μέση Αποτελεσματική Δόση* αποδίδεται η μέση συγκέντρωση του εκάστοτε εκχυλίσματος, που απαιτείται για να διακόψει το βιολογικό κύκλο του 50% του πληθυσμού κάθε παρασίτου. Αυτό σημαίνει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή αυτής της Δόσης, τόσο μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχυλίσματος απαιτείται για να διακοπεί ο βιολογικός κύκλος του 50% του πληθυσμού συγκεκριμένου παρασίτου, με αποτέλεσμα το εκχύλισμα να είναι λιγότερο αποτελεσματικό, από κάποιο του οποίου η τιμή EC_{50} (Μέσης Αποτελεσματικής Δόσης) είναι μικρότερη.

4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.3.1. Χημική Ανάλυση των Εκχυλισμάτων

Ο προσδιορισμός του περιεχομένου των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ουσίες κρίθηκε απαραίτητος, για να είναι εφικτή η συσχέτιση των τανινών και των επιμέρους πολυφαινόλων με την ανθελμινθική δράση που παρουσίασαν τα εκχυλίσματα κατά τους *in vitro* πειραματισμούς. Από τα σχετικά αποτελέσματα, όπως φαίνονται στον **Πίνακα 4.3.**, προέκυψε ότι τα εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των ειδών *Al. xanthochlora*, *Ar. agrimonoides*, *C. orientalis*, *F. vesca*, *G. urbanum*, *P. pedata*, *P. recta*, *P. speciosa*, *Pr. mahaleb*, *Pr. webbii*, *P. coccinea*, *R. canina*, *R. pulverulenta*, *R. sempervirens* εμφάνισαν την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες (TPC), που κυμαίνονταν από 300 έως 647,33 mg γαλλικού οξέος/g ξηρού δείγματος εκχυλίσματος.

Πίνακας 4.3. Αποτελέσματα χημικής ανάλυσης των εκχυλισμάτων φυτικών υλικών της Ελληνικής χλωρίδας ως προς α) Ολικές Πολυφαινόλες (TPC) εκφρασμένες ως mg γαλλικού οξέος/g ξηρού δείγματος και β) Ολικά φλαβονοειδή (TFC) εκφρασμένα ως mg ισοδύναμου κατεχίνης/g ξηρού βάρους.

Εκχύλισμα		TPC	TFC
Φυτικό Είδος	Μέρος φυτού που χρησιμοποιήθηκε		
<i>C. siliqua</i> L.	Καρποί	30,10	<min
<i>On. alba</i> subsp. <i>laconica</i> Boiss.	Υπέργειο	172,09	38,13
<i>On. peloponnesiaca</i> Iatrou & Kit Tan	Υπέργειο	158,00	61,71
<i>O. europaea</i> L.	Φύλλα	145,74	29,04
	νοπή πούλπα	74,07	15,48
	ξηρή πούλπα	82,39	35,03
<i>Al. bulgarica</i> Rothm.	Υπέργειο	298,00	26,00
<i>Al. xanthochlora</i> Rothm.	Υπέργειο	424,33	44,00
<i>Ar. agrimonoides</i> (L.) DC	Υπέργειο	376,00	51,67
<i>C. orientalis</i> Pall. ex M.Bieb.	Υπέργειο	513,33	96,89
<i>F. vesca</i> L.	Υπέργειο	647,33	64,44
<i>G. urbanum</i> L.	Υπέργειο	323,00	23,33
<i>P. haynaldiana</i>	Υπέργειο	169,33	8,89
<i>P. pedata</i> Willd. ex Hornem.	Υπέργειο	406,67	56,56
<i>P. recta</i> L.	Υπέργειο	307,67	48,33
<i>P. speciosa</i> Willd.	Υπέργειο	404,33	28,44
<i>Pr. mahaleb</i> L.	Υπέργειο	310,67	95,00
<i>Pr. prostrata</i> Labill.	Υπέργειο	205,00	8,89
<i>Pr. webbii</i> (Spach) Vierh.	Υπέργειο	541,33	62,67
<i>P. coccinea</i> M.Roem.	Υπέργειο	369,00	92,56
	Σπόρος	226,93	99,16
<i>P. spinosa</i> Forssk.	Υπέργειο	438,67	58,78
	Σπόρος	<min	<min
<i>R. canina</i> L.	Υπέργειο	451,00	53,78
	Καρπός	290,00	118,56
<i>R. pulverulenta</i> M. Bieb.	Υπέργειο	342,00	66,33
<i>R. sempervirens</i> L.	Υπέργειο	504,00	67,33
	Καρπός	267,67	65,78
<i>R. idaeus</i> L.	Υπέργειο	290,67	56,00
<i>R. sanctus</i> Schreb. (= <i>R. creticus</i> L.)	Υπέργειο	106,33	7,11
<i>S. umbellata</i> (Desf.) Fritsch (= <i>Aria umbellata</i> Desf)	Υπέργειο	520,33	116,11

Αντίθετα, τα εκχυλίσματα της ξηρής και της νωπής πούλπας *O. europaea*, όπως και των καρπών του *C. siliqua* παρουσίασαν τις μικρότερες τιμές ολικών πολυφαινολών (TPC). Τέλος, οι ολικές πολυφαινόλες του εκχυλίσματος των σπόρων *P. spinosa* ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Όσον αφορά τις τιμές των ολικών φλαβονοειδών (TFC), αυτές κυμάνθηκαν από 7,11 έως 99,16 mg ισοδύναμου κατεχίνης/g ξηρού βάρους, με το εκχύλισμα του *R. sanctus* να παρουσιάζει τη μικρότερη τιμή και του σπόρου του *P. coccinea* την μεγαλύτερη, αντίστοιχα. Για τα εκχυλίσματα α) καρπών *C. siliqua* και β) σπόρων *P. spinosa*, οι τιμές TFC προσδιορίστηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Η ανάλυση των επιμέρους πολυφαινολών (**Συμπληρωματικός Πίνακας 4**), έδειξε ότι τα διαφορετικά εκχυλίσματα έχουν τελείως διαφορετικό πολυφαινολικό προφίλ. Οι δύο ονοβρυχίδες (*On. alba laconica* και *On. peloropnnesiaca*) και το υπέργειο τμήμα του *P. spinosa* παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης του χλωρογενικού οξέος (chlorogenic acid), 104.000, 17.000 και 35.173,6 μg/100g, αντίστοιχα. Επίσης, οι συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος (gallic acid) ήταν αρκετά υψηλές στα εκχυλίσματα των καρπών *C. siliqua*, *On. alba laconica*, *On. peloropnnesiaca* και της ξηρής πούλπας *O. europaea* (285.000, 53.000, 4.000, 254.000 μg / 100g, αντίστοιχα), ενώ το εκχύλισμα νωπής πούλπας *O. europaea* φάνηκε να παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή καφεϊκού οξέος (caffeic acid) 22.000 μg/100g. Επιπλέον, οι δύο ονοβρυχίδες (*On. alba laconica* και *On. peloropnnesiaca*) και η νωπή πούλπα *O. europaea* φάνηκε να έχουν υψηλή συγκέντρωση σε p-κουμαρικό οξύ (p-coumaric acid) (3.000, 3.000 και 12.000 μg / 100g) και συριγγικό οξύ (syringic acid) (4.000, 2.000 και 10.000 μg / 100g), ενώ το εκχύλισμα της *P. haynaldiana* παρουσίασε υψηλή συγκέντρωση (243,1 μg / 100g) γαλλοκατεχίνων.

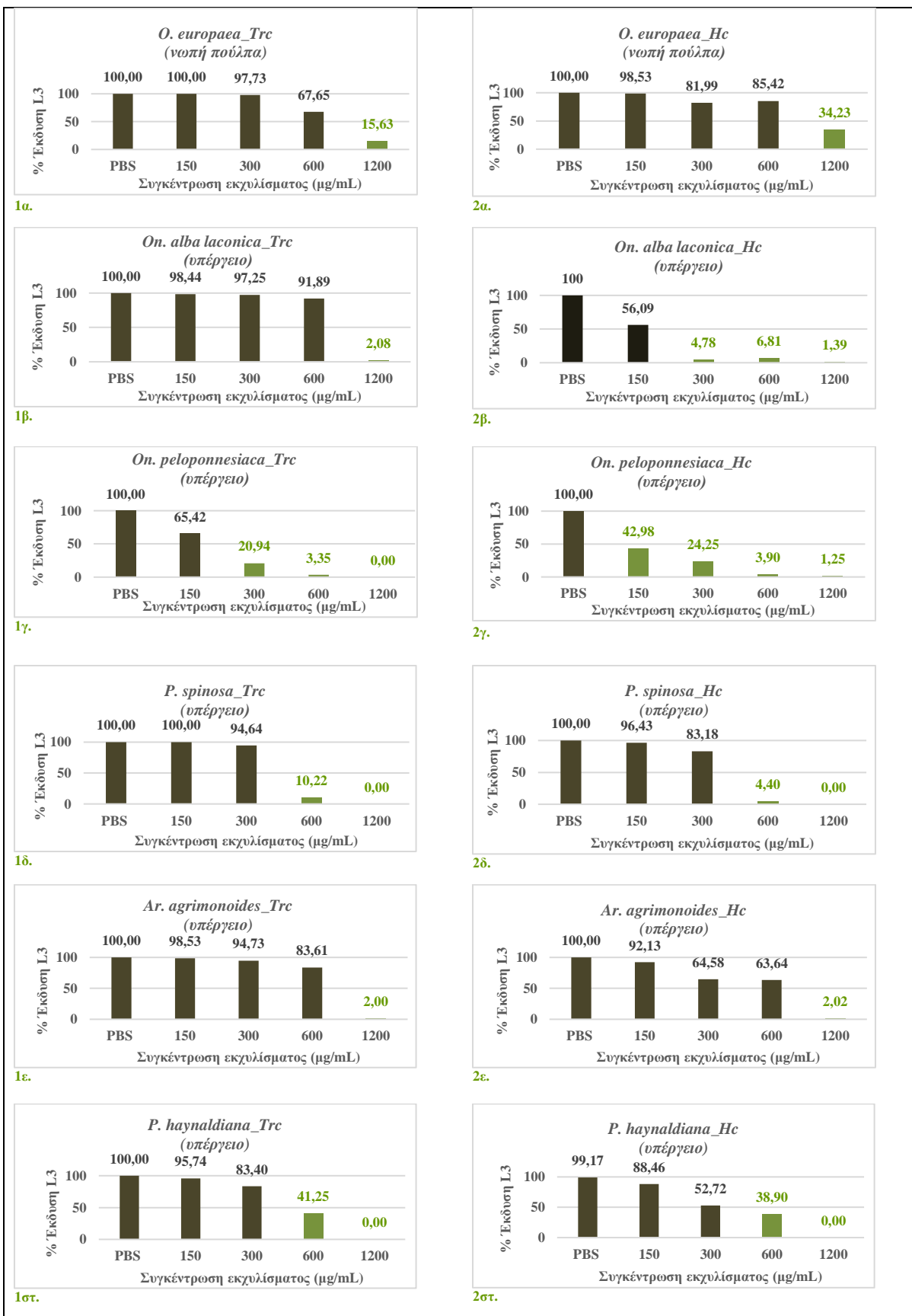
4.3.2. Αποτελέσματα Δοκιμής Έκδυσης Προνυμφών

Ελέγχοντας την ανθελμινθική δράση των 31 φυτικών εκχυλισμάτων που δοκιμάστηκαν έναντι των L₃ *H. contortus* και *Tr. colubriformis*, διαπιστώθηκε ότι τα εκχυλίσματα α) των φύλλων και β) της ξηρής πούλπας του *O. europaea*, γ) του καρπού των *R. sempervirens* και *R. canina*, δ) των σπόρων των *P. coccinea*, και *P. spinosa* και ε) των υπέργειων τμημάτων των φυτών *P. coccinea*, *C. orientalis*, *R. sanctus*, *R. idaeus*, *R. sempervirens*, *R. pulverulenta*, *Pr. mahaleb*, *Pr. prostrata*, *S. umbellata* και *G. urbanum*, δεν παρουσιάζουν δράση έναντι και των δύο παρασίτων, σε καμία συγκέντρωση.

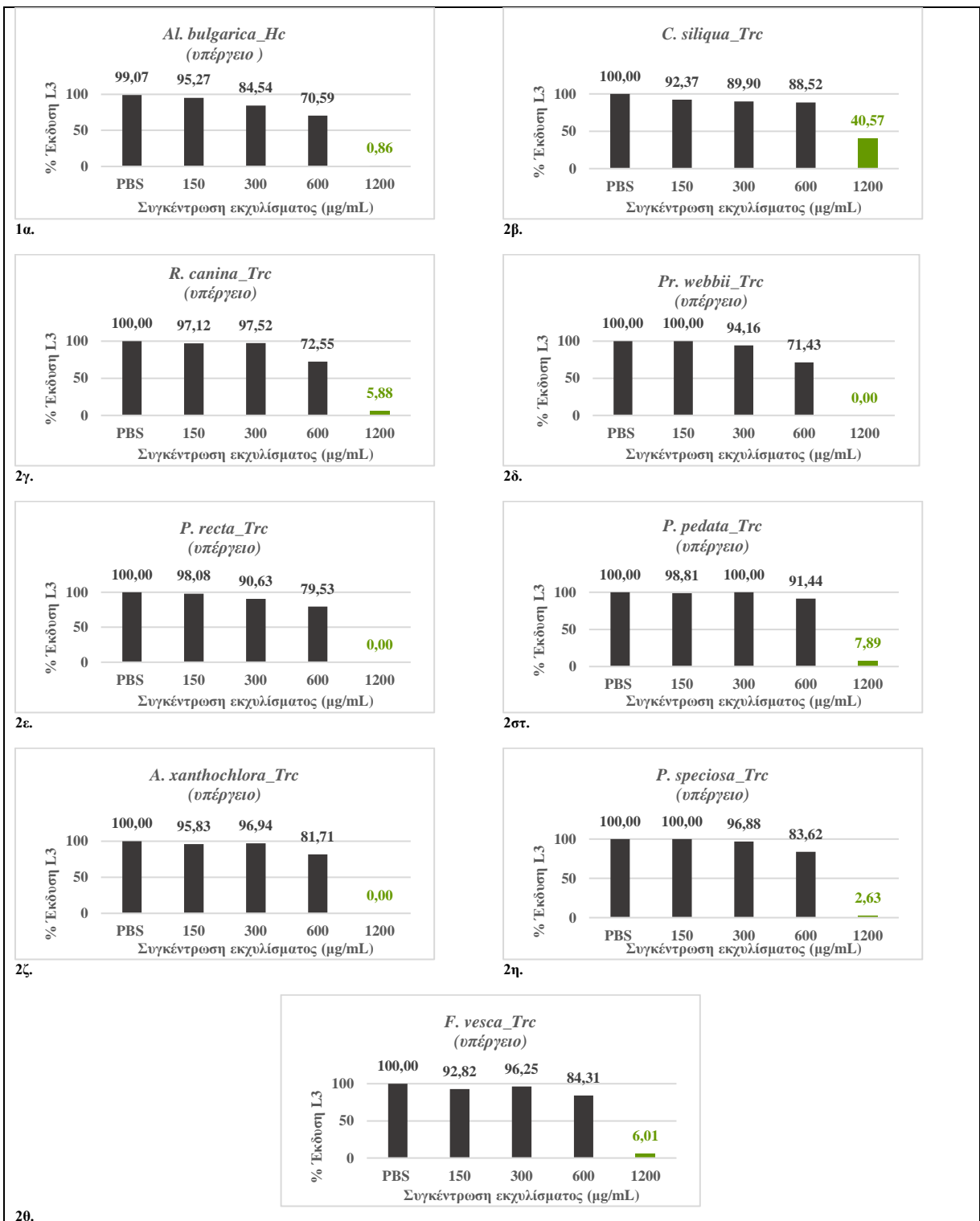
Αντίθετα, ανθελμινθική δράση κατά και των δύο ειδών παρασίτων εμφανίζουν τα εκχυλίσματα της νωπής πούλπας *O. europaea*, και τα εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των φυτών *On. alba laconica*, *On. peloponnesiaca*, *P. spinosa*, *Ar. agrimonoides* και *P. haynaldiana*, όπως παρουσιάζεται στο **Γράφημα 4.3**. Ειδικότερα, από τα παραπάνω εκχυλίσματα δράση εμφάνισαν μόνο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 1.200μg/mL η νωπή πούλπα της *O. europaea* και το υπέργειο τμήμα της *Ar. agrimonoides*, ενώ τα υπέργεια τμήματα των *P. spinosa* και *P. haynaldiana* παρουσίασαν δράση και στη συγκέντρωση των 600μg/mL εκχυλίσματος (**Γράφημα 4.3**).

Αποτελεσματικό μόνο ενάντια στις προνύμφες του παρασίτου *H. contortus*, και όχι του *Tr. colubriformis*, φάνηκε να είναι μόνο το εκχύλισμα του υπέργειου τμήματος του φυτού *Al. bulgarica*. Αντίθετα, τα εκχυλίσματα των καρπών της *C. siliqua* και των υπέργειων τμημάτων των *R. canina*, *Pr. webbii*, *P. recta*, *P. pedata*, *Al. xanthochlora*, *P. speciosa*, *F. vesca* παρουσίασαν δράση μόνο κατά του παρασίτου *Tr. colubriformis*. Εκτός από το εκχύλισμα του υπέργειου τμήματος του *P. spinosa* που φάνηκε να είναι αποτελεσματικό στις δυο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 600 και των 1200μg/mL, όλα τα υπόλοιπα ήταν αποτελεσματικά μόνο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (**Γράφημα 4.4**).

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δοσοεξαρτώμενη δράση παρουσίασαν τα εκχυλίσματα των δύο ονοβρυχίδων. Αυτό της *On. peloponnesiaca* παρουσίασε δοσοεξαρτώμενη δράση και για τα δύο είδη παρασίτων, ενώ το εκχύλισμα της *On. alba laconica* μόνο έναντι του *H. contortus* (**Γράφημα 4.3**).



Γράφημα 4.3. Ποσοστό εκδύομενων προνυμφών L3 των παρασίτων *H. contortus* (1α – 1στ) και *Tr. colubriformis* (2α - 2στ), μετά από την επίδραση των φυτικών εκχυλίσμάτων «νωπή πούλπα» *Olea europaea* (α), *Onobrychis alba laconica* (β), *Onobrychis peloponnesiaca* (γ), *Pyrus spinosa* (δ), *Aremonia agrimonoides* (ε) και *Potentilla haynaldiana* (στ) στις συγκεντρώσεις των 150, 300, 600 και 1.200 µg/mL.

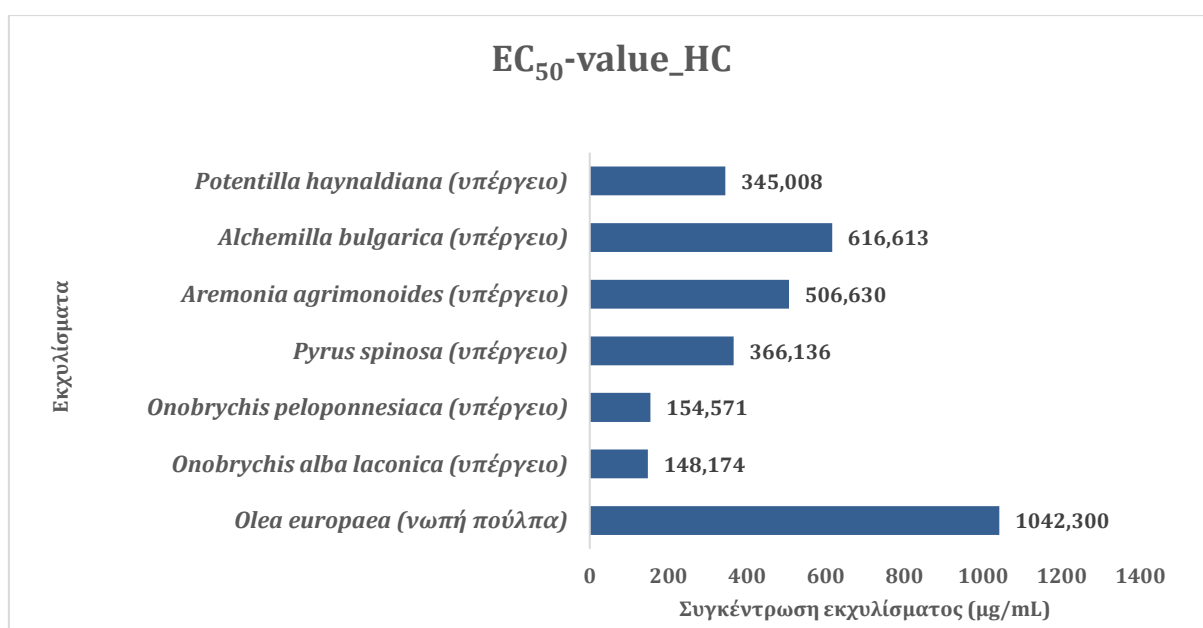


Γράφημα 4.4. Ποσοστό εκδύομενων προνυμφών L3 των παρασίτων *H. contortus* (1α) και *Tr. colubriformis* (2β – 2θ), μετά από την επίδραση των φυτικών εκχυλίσμάτων *Alchemilla bulgarica* (α), *Ceratonia siliqua* (β), *Rosa canina* (γ), *Prunus webbii* (δ), *Potentilla recta* (ε) και *Potentilla pedata* (στ), *Alchemilla xanthochlora* (ζ), *Potentilla speciosa* (η), *Fragaria vesca* (θ) στις συγκεντρώσεις των 150, 300, 600 και 1200 µg/mL.

4.3.3. Αποτελέσματα προσδιορισμού Μέσης Αποτελεσματικής Δόσης

Η Μέση Αποτελεσματική Δόση (EC₅₀-value), δηλαδή η μέση συγκέντρωση του εκάστοτε εκχυλίσματος, που απαιτείται για να διακόψει το βιολογικό κύκλο του 50% του πληθυσμού κάθε παρασίτου, φαίνεται στο **Γράφημα 4.5.** και το **Γράφημα 4.6.** για το παράσιτο *H. contortus* και το *Tr. colubriformis* αντίστοιχα.

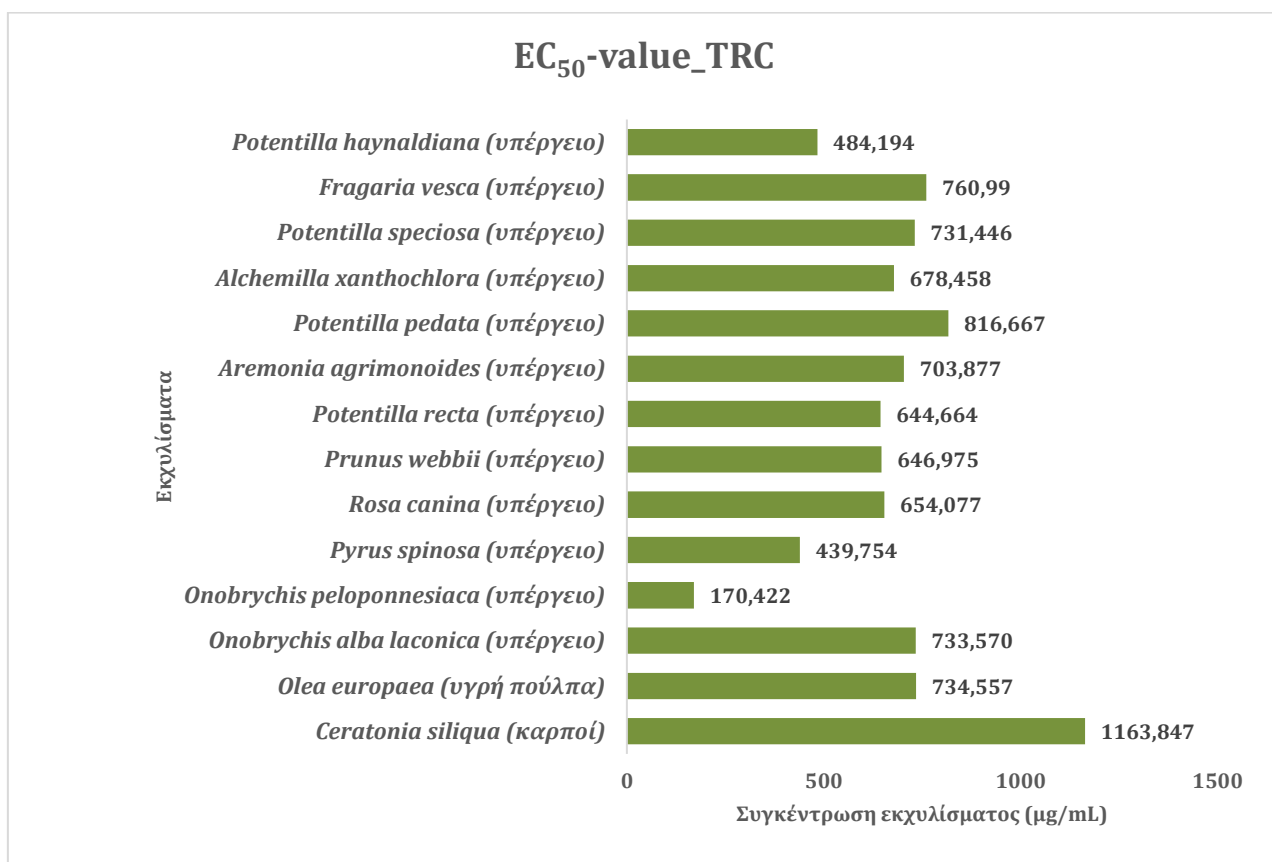
Πιο συγκεκριμένα, για το παράσιτο *H. contortus* την υψηλότερη τιμή EC₅₀ εμφάνισε το εκχύλισμα της νωπής πούλπας της *O. europaea*, ενώ τις μικρότερες τιμές παρουσίασαν τα εκχυλίσματα των δύο ονοβρυχίδων *On. peloponnesiaca* και *On. alba laconica*, επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματικότητά τους. Τα υπέργεια τμήματα των *Potentilla haynaldiana*, *Pyrus spinosa*, *Aremonia agrimonoides* και *Alchemilla bulgarica* εμφάνισαν ενδιάμεσες τιμές EC₅₀ από 345,008 έως και 616,613 μg / mL.



Γράφημα 4.5. Μέση Αποτελεσματική Δόση των εκχυλισμάτων της παρούσας δοκιμής που εμφάνισαν δράση έναντι του παρασίτου *H. contortus*.

Για το είδος *Tr. colubriformis*, την υψηλότερη τιμή Μέσης Αποτελεσματικής Δόσης φαίνεται να έχει το εκχύλισμα *C. siliqua* και αισθητά τη μικρότερη αυτό του *On. peloponnesiaca*. Δηλαδή, το εκχύλισμα του *On. peloponnesiaca* εμφανίζοντας τη μικρότερη τιμή EC₅₀ (170,42μg/mL), αποτελεί το πιο αποτελεσματικό φυτικό είδος έναντι του παρασίτου *Tr. colubriformis*. Ανθελμινθική δράση επίσης, εμφάνισαν τα υπέργεια τμήματα των φυτικών εκχυλισμάτων *Potentilla haynaldiana*, *Fragaria vesca*, *Potentilla speciosa*, *Alchemilla xanthochlora*, *Potentilla pedata*, *Aremonia agrimonoides*, *Potentilla recta*, *Prunus webbii*,

Rosa canina, *Pyrus spinosa*, *Onobrychis alba laconica*, όπως επίσης και η υγρή πούλπα *O. europaea*, με τιμές EC₅₀ από 439,754 έως 816,667 µg / mL.



Γράφημα 4.6. Μέση Αποτελεσματική Δόση των εκχυλισμάτων της παρούσας δοκιμής που εμφάνισαν δράση έναντι του παρασίτου *Tr. colubriformis*.

4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, πλήθος μελετών επικεντρώνεται στη διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μολύνσεων από γαστρεντερικά νηματώδη παράσιτα και της διατροφής του ξενιστή, ερευνώντας το αν και κατά πόσο η σύνθεση ή/και η ποιότητα των συστατικών που περιέχονται στις ζωοτροφές δύναται να επηρεάσουν τη βιολογία των παρασίτων. Τα αποτελέσματα των μελετών επιβεβαιώνουν ότι κάποιοι από τους δευτερογενείς μεταβολίτες που είτε υπάρχουν, είτε μπορούν να προστεθούν στη διατροφή των μηρυκαστικών, εμφανίζουν αντιπαρασιτική δράση (Min et al., 2003; Hoste et al., 2006, 2011, 2012, 2015).

Η παρούσα μελέτη στόχευε στην *in vitro* διερεύνηση της ανθελμινθικής δράσης 31 φυτικών εκχυλισμάτων, πλούσιων σε δευτερογενείς μεταβολίτες, ενάντια σε δύο γαστρεντερικά νηματώδη των προβάτων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η επιλογή των ειδών βασίστηκε στη διαθεσιμότητά τους στα μεσογειακά οικοσυστήματα και την περιεκτικότητά τους σε δευτερογενείς μεταβολίτες, όσο και στη δυνατότητα συμμετοχής τους στο σιτηρέσιο των ζώων.

Από τα αποτελέσματα, διαπιστώθηκε η ανθελμινθική δράση αρκετών από τα φυτικά είδη που δοκιμάστηκαν, με τα δύο είδη ονοβρυχίδας *On. alba laconica* και *On. peloponnesiaca* να είναι αποτελεσματικότερα όλων των άλλων έναντι των L₃ του παρασίτου *H. contortus*. Η *On. peloponnesiaca* φάνηκε ότι έχει την ισχυρότερη ανθελμινθική δράση έναντι και του παρασίτου *Tr. colubriformis*, η οποία φάνηκε να εξαρτάται και από τη δόση. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν παρεμφερείς μελέτες για τα συγκεκριμένα φυτικά είδη ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα. Όμως, άλλα είδη του γένους *Onobrychis* έχουν μελετηθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, με τις *in vitro* μελέτες να δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα του είδους *On. viciifolia* έχουν επίσης δόσοεξαρτώμενη δράση σε διαφορετικά είδη γαστρεντερικών νηματωδών (Brunet et al., 2007; Manolaraki et al., 2010; Novobilsky et al., 2013). Επιπλέον, *in vivo* πειραματισμοί σε μικρά μηρυκαστικά, επαλήθευσαν την αποτελεσματικότητα της *On. viciifolia*, μειώνοντας τα αυγά παρασίτων ανά γραμμάριο κοπράνων, και τη γονιμότητα των θηλυκών παρασίτων *H. contortus* (Manolaraki et al., 2010; Arroyo-Lopez et al., 2014) ή *Tr. colubriformis* (Manolaraki et al., 2010).

Τα αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης των εκχυλισμάτων για τα δυο είδη ονοβρυχίδας, *On. alba laconica* και *On. peloponnesiaca*, που χρησιμοποιήθηκαν στους πειραματισμούς, δείχνουν ότι η περιεκτικότητά τους σε ολικές πολυφαινόλες (TPC) 172,09 και 158,00 mg γαλλικού οξέος/g ξηρού δείγματος, αντίστοιχα και σε ολικά φλαβονοειδή (TFC) 38,13 και 61,71 mg ισοδύναμου κατεχίνης/g ξηρού βάρους αντίστοιχα, δεν ήταν ιδιαίτερα υψηλές σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Αντίθετα, εκχυλίσματα με μεγαλύτερη περιεκτικότητα ολικών

πολυφαινολών και φλαβονοειδών, όπως για παράδειγμα αυτό της *S. umbellata*, δεν έδειξαν αντίστοιχη ανθελμινθική δράση όπως εκείνη των ονοβρυχίδων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την ύπαρξη διαφόρων τύπων δευτερογενών μεταβολιτών και την επίδραση τους σε διάφορες συγκεντρώσεις σε συνδυασμό με τις ταννίνες εναντίον των παρασίτων. Παράλληλα, είναι δυνατό να υπάρχει συνέργεια ή ανταγωνιστική αλληλεπίδραση τόσο μεταξύ των πολυφαινολών (Klongsiriwet et al., 2015), όσο και μεταξύ άλλων διαφορετικών δευτερογενών μεταβολιτών (Burrit & Provenza, 2000; Lyman et al., 2008; Vargas- Magaña et al., 2014a). Σε αυτό το σημείο μάλιστα, είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι όσον αφορά τις ταννίνες, έχουν αναφερθεί στοιχεία για τη σχέση της στερεοχημικής δομής με την ανθελμινθική δράση, σε μελέτες με βοοειδή (Novobilský et al., 2011), μικρά μηρυκαστικά (Quijada et al., 2015) και χοίρους (Williams et al., 2014), υποδηλώνοντας ότι ο βαθμός/μέγεθος πολυμερισμού (mDP) αλλά και η ποιότητα ή η δομή των μονομερών (αναλογία προδελφινιδίων/προκυανιδίων, δείκτης PD/PC) διαμορφώνουν την αποτελεσματικότητα των φυτικών εκχυλισμάτων. Ακόμη και εδώ όμως φαίνεται να υπάρχουν διαφορές, καθώς σύμφωνα με τους Quijada et al. (2015) σε ότι αφορά το *H. contortus* φαίνεται ότι η ανθελμινθική δράση σχετίζεται τόσο με τον βαθμό πολυμερισμού, όσο και με την αναλογία PD/PC, σε αντίθεση με την περίπτωση του *Tr. colubriformis*, όπου ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα των φυτικών εκχυλισμάτων είναι η αναλογία PD/PC.

Αναφορικά με τα εκχυλίσματα της ελιάς (*O. europaea*), παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα των φύλλων της, όπως και της ξηρής πούλπας δεν εμφάνισε καμία δράση ενάντια και στα δυο είδη των παρασίτων που μελετήθηκαν. Η απουσία ανθελμινθικής δράσης του εκχυλίσματος «φύλλα *O. europaea*» έναντι του *H. contortus*, επιβεβαιώνεται και από παρόμοια *in vitro* μελέτη από τους Manolaraki et al., (2010). Αντίθετα, η «νωπή πούλπα» *O. europaea*, έδειξε να είναι αποτελεσματική και για τα δυο μελετώμενα παράσιτα στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των 1.200 μg/mL εκχυλίσματος, χωρίς να εμφανίζει και την αντίστοιχη περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες ή σε ολικά φλαβονοειδή.

Επιπλέον, τόσο το εκχύλισμα από το υπέργειο τμήμα, όσο και από τον καρπό της *R. sempervirens*, δεν είχε καμία δράση έναντι των δυο παρασίτων, παρά τις υψηλές τιμές των ολικών πολυφαινολών και των φλαβονοειδών που προσδιορίστηκαν σε αυτό.

Και σε αυτές τις περιπτώσεις, λοιπόν, όπως και στις ονοβρυχίδες, τίθεται το ζήτημα της έλλειψης επαρκών πληροφοριών, όσον αφορά την ποσότητα, τη δομή και τη δραστηριότητα των δευτερογενών μεταβολιτών των εκχυλισμάτων. Πέρα όμως από αυτό, είναι ευρέως γνωστό ότι η χημική σύσταση ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών μερών ακόμη και του ίδιου του φυτού

(Malisch et al., 2015; Yahia et al., 2020). Επομένως, είναι πιθανό εκτός από την ποσότητα, να υπάρχουν σημαντικές διαφορές και στη δομή των δευτερογενών μεταβολιτών μεταξύ των διαφορετικών μερών. Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ονοβρυχίδες, αποδείχθηκε ότι τα στελέχη της έχουν περισσότερες προκυανιδίνες, ενώ τα φύλλα της, περισσότερες προδελφινιδίνες (Theodoridou et al., 2010; Malisch et al., 2015), ενώ παράλληλα δυο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα και την ποσότητά τους είναι τόσο το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, όσο και το περιβάλλον (Kotze et al., 2009; Theodoridou et al., 2011; Azuhnwi et al., 2013; Grabber et al., 2014).

Τέλος το «υπέργειο» *P. spinosa* εμφάνισε σχετικά υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι των *L3 H. contortus* και *Tr. colubriformis*, με τιμές EC_{50} ίσες με 366,14 και 439,75 $\mu\text{g/mL}$ εκχυλίσματος αντίστοιχα, ενώ ταυτόχρονα παρουσίασε και ικανοποιητικές τιμές ολικών πολυφαινολών και φλαβονοειδών. Αντιθέτως, το εκχύλισμα του καρπού του, δεν έδρασε ενάντια σε κανένα από τα δύο είδη παρασίτων, παρουσιάζοντας και μη ανιχνεύσιμες τιμές ολικών πολυφαινολών. Η αποτελεσματικότητα του υπέργειου τμήματος, έναντι του *H. contortus* φαίνεται να συμφωνεί με τα αποτελέσματα αντίστοιχων *in vitro* πειραματισμών στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν φύλλα του *P. spinosa* και διαπιστώθηκε δόσοεξαρτώμενη δράση (Manolaraki et al., 2010).

Τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην αποτελεσματικότητα του ίδιου φυτικού είδους ενάντια στα διαφορετικά είδη γαστρεντερικών παρασίτων (Hoste et al., 2016). Αυτές οι διαφορές, ιδίως μεταξύ των ειδών των νηματωδών παρασίτων που παρασιτούν το ήνυστρο και αυτών που παρασιτούν το λεπτό έντερο, μπορεί να σχετίζονται τόσο με τον διαφορετικό μηχανισμό αντίδρασής τους, όσο και με τις διαφορές στη βιοδιαθεσιμότητα των δευτερογενών μεταβολιτών (όπως στην περίπτωση των συμπυκνωμένων ταννινών), κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα (Terrill et al., 1994; Desrues et al., 2015).

Από τα παραπάνω, προκύπτει ότι πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες για να διαπιστωθεί ποιες χημικές ενώσεις είναι αυτές που ευθύνονται σε κάθε περίπτωση για την αποτελεσματικότητα έναντι των διαφορετικών ειδών γαστρεντερικών νηματωδών. Απαραίτητη θεωρείται και η *in vivo* μελέτη των φυτικών ειδών, που θα επαληθεύσει και θα επιβεβαιώσει τη ανθελμινθική τους δράση, καθώς λόγω των φυσιοχημικών συνθηκών στο έντερο των ζώων, κάποια εκχυλίσματα, πιθανώς να εμφανίζουν μικρότερη ή καθόλου ανθελμινθική δράση (Jackson & Hoste, 2010).

Σε ότι αφορά τις *in vivo* μελέτες, τις μελέτες δηλαδή όπου τα φυτά αυτά θα πρέπει να ενσωματωθούν στα σιτηρέσια των ζώων, οι προκλήσεις είναι πολλές γιατί θα πρέπει να ληφθούν πολλοί παράγοντες υπόψη έτσι ώστε τα σιτηρέσια που θα προκύψουν να είναι ισορροπημένα, ελκυστικά για τα ζώα αλλά και πάνω από όλα ασφαλή για την υγεία τους. Για αρκετά φυτά (όπως είναι η χαρουπιά, η ελιά και η ονοβρυχίδα) αυτό είναι πολύ πιο εφικτό γιατί χρησιμοποιούνται ήδη εδώ και πολλά χρόνια στη διατροφή των ζώων.

Σχετικά με την χαρουπιά, στην Ελλάδα αλλά και σε άλλες Μεσογειακές χώρες, η κύρια χρήση της στην διατροφή των ζώων αφορά το άλεσμα των καρπών της. Οι καρποί της εξαιτίας της γλυκιάς γεύσης (περιέχουν σάκχαρα σε ποσοστό 48-56%) και του ελκυστικού αρώματός τους καταναλώνονται ευχάριστα από τα ζώα. Παρόλα αυτά, η χαμηλή περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη (3-4%) περιορίζει το ποσοστό συμμετοχής τους στα σιτηρέσια (Marakis, 1996; Batlle & Tous, 1997). Ένας ακόμη περιοριστικός παράγοντας της χρήσης των καρπών της χαρουπιάς είναι η περιεκτικότητα σε ταννίνες που μπορεί να προκαλέσουν μειωμένη πρόσληψη τροφής, μειωμένη πεπτικότητα πρωτεϊνών, μειωμένη απορρόφηση αμινοξέων και ιχνοστοιχείων αλλά και τοξίκωση, η οποία εκδηλώνεται με διαταραχές στο κυκλοφορικό και το νευρικό σύστημα (υπεραιμία εγκεφάλου, υποθερμία κ.α.) (Silanikove et al., 1994; Priolo et al., 1998). Για την άρση των παραπάνω, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι μπορεί να είναι ευεργετική η ταυτόχρονη χορήγηση στα ζώα σκευασμάτων πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG) (Priolo et al., 2000, 2002).

Παρομοίως, σε αρκετές περιοχές, κυρίως της Μεσογείου, τα φύλλα της ελιάς χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή για τα μικρά μηρυκαστικά νωπά ή με τη μορφή ενσιρώματος με σημαντικά οφέλη στην ποιότητα του γάλακτος και του κρέατος (Zoiopoulos, 1983; Sansoucy, 1985; Molina-Alcaide & Yáñez-Ruiz, 2008; Arco-Perez et al., 2017; Jabalbarez Hukerdi et al., 2020). Εκτός όμως από τα ενσιρώματα, τα βιομηχανικά υποπροϊόντα ελαιουργίας, όπως η πούλπα ελιάς, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν στην διατροφή των ζώων ως πρωτεϊνούχες ζωοτροφές. Μάλιστα, σύμφωνα με τους García-Rodríguez et al. (2020), η πούλπα ελιάς θα μπορούσε να αντικαταστήσει εν μέρει το ενσίρωμα αραβόσιτου και τον σανό κριθαριού, χωρίς να προκαλέσει διαταραχές σε μεταβολικές διεργασίες στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών, προκαλώντας ανεπαίσθητες μόνο αλλαγές στους μικροβιακούς πληθυσμούς. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού στα φύλλα ελιάς λόγω συχνών ψεκασμών με χαλκούχα σκευάσματα μπορεί να περιορίσουν τη χρήση τους ως ζωοτροφή (Molina-Alcaide & Yáñez-Ruiz, 2008).

Η ονοβρυχίδα (ως επί το πλείστον το είδος *Onobrychis viciifolia*) καλλιεργείται και χρησιμοποιείται στη διατροφή των ζώων σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες είτε κατά τη βόσκηση ή ως συγκομιζόμενη ζωοτροφή με τη μορφή σανού, ενσιρώματος αλλά και pellet (Mueller-Harvey et al., 2019). Στην Ελλάδα, η καλλιέργεια αυτή δεν είναι διαδεδομένη αλλά υπάρχουν αυτοφυή αρκετά είδη ονοβρυχίδων όπως τα συγκεκριμένα 2 που χρησιμοποιήθηκαν στους πειραματισμούς της παρούσας διατριβής. Μελλοντικά θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον, βάσει επίσης και των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας, να γίνουν προσπάθειες καλλιέργειας και των ενδημικών αυτών ειδών.

Σε ότι αφορά τα υπόλοιπα φυτά που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη (της οικογένειας *Rosaceae*), παρότι δε χρησιμοποιούνται συστηματικά στη διατροφή των ζώων, αποτελούν σημαντικό ποσοστό της Μεσογειακής χλωρίδας και σύμφωνα με μαρτυρίες κτηνοτρόφων πολλά από αυτά προτιμώνται κατά τη βόσκηση τόσο από τα πρόβατα (ποώδη) όσο και από τις αίγες (ξυλώδη) (Σπαής, 1997). Σε κάθε περίπτωση, ακόμη και αν τα φυτά αυτά δε μπορούν να αποτελέσουν συστατικά των σιτηρεσιών των ζώων, η περαιτέρω διερεύνηση της ανθελμινθικής δράσης που εμφανίζουν μπορεί να οδηγήσει στον εντοπισμό των υπεύθυνων για τη δράση αυτή συστατικών, που δυνητικά στο μέλλον θα αποτελέσουν τη δραστική ουσία των φαρμάκων νέας γενιάς.

4.5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη συγκεκριμένη *in vitro* μελέτη σχετικά με την ανθελμινθική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων ενάντια στις L₃ των γαστρεντερικών νηματωδών *H. contortus* και *Tr. colubriformis* είναι τα εξής:

- i) Εκτός από τα υλικά των φυτικών ειδών *O. europaea*, και *P. spinosa*, όλα τα άλλα μελετήθηκαν για την ανθελμινθική δράση τους πρώτη φορά στην Ελλάδα στην παρούσα διατριβή.
- ii) Τα εκχυλίσματα α) των ‘φύλλων’ και β) της ‘ξηρής πούλπας’ *O. europaea*, γ) του ‘καρπού’ *R. sempervirens* και *R. canina*, δ) των ‘σπόρων’ των *P. coccinea*, και *P. spinosa* και ε) των ‘υπέργειων’ τμημάτων των φυτών *P. coccinea*, *C. orientalis*, *R. sanctus*, *R. idaeus*, *R. sempervirens*, *R. pulverulenta*, *Pr. mahaleb*, *Pr. prostrata*, *S. umbellata* και *G. urbanum*, δεν παρουσίασαν καμία δράση έναντι των δυο παρασίτων σε καμία συγκέντρωση.
- iii) Υψηλή ανθελμινθική δράση ενάντια και στα δυο είδη παρασίτων, αλλά μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση των 1.200μg/mL εκχυλίσματος, παρουσίασαν η ‘νωπή πούλπα’ *O. europaea* και το ‘υπέργειο’ *Ar. agrimonoides*, ενώ τα ‘υπέργεια’ *P. spinosa* και *P. haynaldiana* παρουσίασαν δράση και στην συγκέντρωση των 600μg/mL εκχυλίσματος.
- iv) Δοσοεξαρτώμενη δράση παρουσίασαν οι ονοβρυχίδες *On. peloponnesiaca* και στα δύο είδη παρασίτων, ενώ η *On. alba laconica* μόνο έναντι του *H. contortus*.
- v) Το εκχύλισμα του υπέργειου τμήματος του φυτού *Al. bulgarica*, ήταν το μοναδικό που εμφάνισε ανθελμινθική δράση έναντι του *H. contortus* αλλά όχι εναντίον του *Tr. colubriformis*.
- vi) Απαραίτητοι θεωρούνται *in vivo* πειραματισμοί, που θα επιβεβαιώσουν τα *in vitro* αποτελέσματα της εργασίας, όπως και περαιτέρω έρευνα που θα αφορά την ανάλυση των δευτερογενών μεταβολιτών, ιδιαίτερος των πολυφαινολών, όσον αφορά το είδος και την στερεοδομή τους.
- vii) Στα εκχυλίσματα που εμφάνισαν ανθελμινθική δράση έναντι και των δύο ειδών παρασίτων, θα ήταν σκόπιμο πριν τη διεξαγωγή *in vivo* πειραματισμών να ελεγχθεί η τοξικότητά τους και η διατροφική τους αξία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: *IN VIVO* ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΙ

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εκτροφή των μικρών μηρυκαστικών είναι ιδιαίτερα σημαντική για την παραγωγή γαλακτοκομικών κυρίως προϊόντων, στην περιοχή της Μεσογειακής λεκάνης (Hadjigeorgiou et al., 2005). Πραγματοποιείται κυρίως σε ορεινές περιοχές, που δεν είναι κατάλληλες για καλλιέργεια, είναι όμως πλούσιες σε τοπικά φυτικά είδη (λιβαδική βλάστηση), τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν από τα ζώα ως ζωοτροφές (Frutos et al., 2008; Méndez-Ortiz et al., 2018). Πολλά λιβαδικά φυτά μάλιστα, περιέχουν και δευτερογενείς μεταβολίτες (PSM), όπως είναι κατά βάση οι ταννίνες (Papachristou et al., 2005), των οποίων την ανθελμινθική δράση έναντι των γαστρεντερικών νηματωδών παρασίτων των μικρών μηρυκαστικών έχει αξιολογηθεί σε σημαντικό αριθμό *in vivo* και *in vitro* μελετών (Manolaraki et al., 2010; Moreno-Gonzalo et al., 2012, 2013a,b, 2014; Arroyo-Lopez et al., 2014; Silva Soares et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα, οι συμπυκνωμένες ταννίνες έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν είτε άμεσα, είτε έμμεσα τον βιολογικό κύκλο πολλών νηματωδών παρασίτων και επομένως τα φυτά που τις περιέχουν αποτελούν εκτός από ζωοτροφή και ένα αποτελεσματικό μέσο αντιμετώπισής τους. Εκτός από τη συγκέντρωση των ταννινών στη διατροφή των μηρυκαστικών, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η μοριακή τους σύνθεση ή τα δομικά χαρακτηριστικά τους, μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ανθελμινθική τους δράση (Mueller-Harvey et al., 2019).

Η χαρουπιά (*Ceratonia siliqua*) και η ονοβρυχίδα (*Onobrychis viciifolia*) είναι δυο είδη της οικογένειας Fabaceae, που περιέχουν συμπυκνωμένες ταννίνες. Πιο συγκεκριμένα, η χαρουπιά είναι ένα από τα σημαντικότερα είδη τόσο για οικονομικούς όσο και για περιβαλλοντικούς λόγους (Batlle & Tous, 1997), που καλλιεργείται ευρέως στην περιοχή της Μεσογείου. Οι καρποί της χρησιμοποιούνται κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων. Αποτελούνται από 90% (κατά βάρος) πούλπα, η οποία είναι πλούσια σε σάκχαρα (48-56%) και φτωχή σε πρωτεΐνες (3-4%) και λιπίδια (0,4-0,8%) (Marakis, 1996; Batlle & Tous, 1997), ενώ η συγκέντρωση συμπυκνωμένων ταννινών στους ώριμους καρπούς της χαρουπιάς κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα (16-20 % w/w DM) (Bravo et al., 1994; Batlle & Tous, 1997). Σύμφωνα με τους Priolo et al. (2000, 2002), οι καρποί έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε συμπυκνωμένες ταννίνες, αλλά αυτές παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλή βιολογική δραστηριότητα. Βέβαια, οι Silanikove et al. (2006) απέδειξαν ότι η δραστηριότητα των συμπυκνωμένων ταννινών του εκχυλίσματος επηρεάζεται σημαντικά από τη μέθοδο εκχύλισης που εφαρμόζεται (από 5% με όξινο διάλυμα μεθανόλης έως 17,2% με ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας), αποδεικνύοντας ότι οι καρποί του

χαρουπιού είναι μια πλούσια μεν πηγή, αλλά μη εκχυλίσμων συμπυκνωμένων ταννινών. Η υψηλή περιεκτικότητα των υποπροϊόντων των καρπών του χαρουπιού σε συμπυκνωμένες ταννίνες, δικαιολογεί τη διερεύνηση της προστιθέμενης αξίας τους ως συστατικό του σιτηρεσίου των μηρυκαστικών, τόσο κατά τους *in vivo* όσο και για τους *in vitro* πειραματισμούς, όσον αφορά την ανθελμινθική τους δράση ενάντια ορισμένων ειδών γαστρεντερικών νηματωδών παρασίτων.

Η ονοβρυχίδα, που απαντάται κυρίως στην Ευρώπη (αυτοφυή ή/και καλλιεργούμενη), έχει αποτελέσει αντικείμενο ενδιαφέροντος, κυρίως λόγω:

- i) των ευεργετικών επιδράσεων στο πλαίσιο της αγρο-οικολογίας (Hayot-Carbonero et al., 2011),
- ii) του θετικού αντίκτυπου στην παραγωγή των μηρυκαστικών και στο περιβάλλον, αλλά και
- iii) των πιθανών αντιπαρασιτικών δράσεων στα μικρά μηρυκαστικά (Mueller-Harvey et al., 2006; Manolaraki et al., 2010; Hoste et al. 2015; Saratsis et al., 2016).

In vitro μελέτες έδειξαν ότι εκχυλίσματα ονοβρυχίδας έχουν δόσοεξαρτώμενη δράση έναντι διαφορετικών ειδών γαστρεντερικών νηματωδών παρασίτων (Brunet et al., 2007; Manolaraki et al., 2010; Novobilsky et al., 2013). Επιπλέον, *in vivo* πειραματισμοί σε αίγες και πρόβατα που κατανάλωναν ονοβρυχίδα ως ζωοτροφή, έχουν δείξει μείωση στην έκκριση αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων, η οποία σχετίστηκε με μείωση της γονιμότητας των θηλυκών παρασίτων και/ή του παρασιτικού φορτίου των ενήλικων ελμίνθων, ανάλογα με το είδος των νηματωδών (Hoste et al., 2015).

Η παρούσα μελέτη στοχεύει στη διερεύνηση της ανθελμινθικής δράσης διαφορετικών σιτηρεσίων με τη συμμετοχή δύο φυτικών ειδών που περιέχουν συμπυκνωμένες ταννίνες και τα οποία χορηγήθηκαν σε αρνιά είτε μόνα, είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους, ώστε να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητά τους έναντι δύο γαστρεντερικών παρασίτων (*Haemonchus contortus* και *Trichostrongylus colubriformis*). Πιο συγκεκριμένα διερευνάται εάν α) το χαρούπι έχει ανθελμινθική δράση και αν αυτή είναι δόσοεξαρτώμενη (Πείραμα 1), β) εάν η δράση του χαρουπιού σχετίζεται με το περιεχόμενό του σε ταννίνες [όπου χρησιμοποιήθηκε πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) ως αναστολέας των ταννινών] (Πείραμα 2), και γ) εάν δημιουργείται συνέργεια μεταξύ του χαρουπιού και της ονοβρυχίδας όταν αυτά χορηγούνται σε συνδυασμό (Πείραμα 3).

5.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

5.2.1. Σταβλισμός και ζώα

Οι πειραματισμοί πραγματοποιήθηκαν στον Σταθμό Γεωργικής Έρευνας Ασωμάτων του ΕΛΓΟ-Δήμητρα, στον Δήμο Αμαρίου, στο Ρέθυμνο Κρήτης. Οι σταβλικές εγκαταστάσεις ήταν ανοιχτού τύπου και το δάπεδο είχε στρωμένη άχυρου. Τα αρνιά, φυλής Σφακίων, που χρησιμοποιήθηκαν παρέμειναν κατά τη διάρκεια όλης της πειραματικής περιόδου σε χωριστές ομάδες σύμφωνα με τη διατροφή που λάμβαναν (10m² ανά ομάδα ζώων και 10m² προαύλιο χώρο).

Τα ζώα που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη ήταν 83 θηλυκά, ηλικίας έξι μηνών με συγκρίσιμο σωματικό βάρος (ΣΒ), εντός των φυσιολογικών ορίων με βάση την ηλικία τους και τη φυλή (Voutzourakis et al., 2020). Τα αρνιά από τη γέννησή τους έως την έναρξη του πειραματισμού παρέμειναν εντός του στάβλου και, μετά από επαναλαμβανόμενες εξετάσεις, ήταν σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους, αρνητικά στις παρασιτολογικές εξετάσεις. Δεκατέσσερις ημέρες πριν την έναρξη κάθε πειράματος χορηγήθηκε στα ζώα αλβενδαζόλη (albendazole), στη μέγιστη συνιστώμενη εμπορική δόση (ALBENDAZOLE Drench, PROVET, 7,5 mg/kg) και η ανάλυση των κοπράνων τους έδειξε την πλήρη απουσία αυγών παρασίτων. Στη συγκεκριμένη εκτροφή, δεν υπήρχε ιστορικό ανθελμινθικοαντοχής.

5.2.2. Μολύνουσες Προνύμφες L₃

Για την εξασφάλιση ικανού αριθμού προνυμφών L₃ *H. contortus* και *Tr. colubriformis*, για την πειραματική μόλυνση των ζώων κατά τη διενέργεια των πειραματισμών χρησιμοποιήθηκαν δύο αρνιά-δότες που μολύνθηκαν με τα αντίστοιχα παρασιτικά είδη. Τα στελέχη των παρασίτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εργαστηριακά στελέχη που διατηρούνται στο Εργαστήριο Παρασιτολογίας του ΙΚΕ και είναι ευαίσθητα σε όλα τα ανθελμινθικά. Τα παραπάνω ζώα, κατά τη διάρκεια του πειραματισμού παρέμειναν χωριστά σε ειδικά διαμορφωμένους κλωβούς, για να αποφευχθεί η μεταξύ τους επιμόλυνση. Δύο εβδομάδες μετά την πειραματική αυτή μόλυνση και για διάστημα δύο περίπου μηνών, γινόταν σε καθημερινή βάση συλλογή κοπράνων από τα ζώα, για τον έλεγχο της παρουσίας αυγών των εν λόγω παρασίτων και στη συνέχεια με τη μέθοδο της κοπρανοκαλλιέργειας (MAFF, 1986) και της τεχνικής Baermann (MAFF, 1986), συλλέχθηκαν οι προνύμφες L₃ και αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα ύδατος, στους 4°C έως την τελική χρήση (1-2 μήνες), δηλαδή την μόλυνση των ζώων που θα συμμετείχαν στους *in vivo* πειραματισμούς.

5.2.3. Φυτά πλούσια σε ταννίνες που χρησιμοποιήθηκαν

Για τις ανάγκες των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν καρποί χαρουπιού, η προμήθεια των οποίων έγινε από την τοπική αγορά, υπέστησαν ξήρανση με αέρα και προσφέρθηκαν ως άλεσμα ενσωματωμένο στο μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών. Η ονοβρυχίδα (ποικιλία Perly, τρίτη κοπή) χορηγήθηκε σε pellet, το οποίο παράχθηκε από την εταιρεία Multifolia (Viapres le Petit 10380, Γαλλία).

5.2.4. Συγκέντρωση και σύσταση σε ταννίνες

Η συγκέντρωση και η σύσταση των ταννινών προσδιορίστηκε (σε 3 επαναλήψεις), χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικούς τρόπους ανάλυσης α) με τη μέθοδο acetone-butanol-HCl, και β) πραγματοποιώντας θειολυτική αποικοδόμηση (thiolytic degradation with benzyl mercaptan). Αυτό επιλέχθηκε, καθώς προηγουμένως (Pérez-Jiménez & Torres, 2011) είχε αποδειχθεί ότι ανάλογα με τον τύπο των συμπυκνωμένων ταννινών η ανάλυση με τη μέθοδο acetone-butanol-HCl μπορεί να δώσει υψηλότερες συγκεντρώσεις συμπυκνωμένων ταννινών από ένα δείγμα σε σύγκριση με τη θειόλυση. Η δοκιμή acetone-butanol-HCl πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί από τους Grabber et al., 2013 και Desrues et al., 2017. Η αντίδραση θειόλυσης πραγματοποιήθηκε με βενζυλο-μερκαπτάνη σύμφωνα με τους Gea et al., 2011 και Ropiak et al., 2016 και τα προϊόντα της ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση HPLC-MS (Williams et al., 2014; Desrues et al., 2017) και ποσοτικοποιήθηκαν με βάση τις περιοχές αιχμής των 280 nm (Gea et al., 2011; Ropiak et al., 2016). Αυτή η διαδικασία παρείχε αποτελέσματα σχετικά με τη συγκέντρωση των συμπυκνωμένων ταννινών (g CT / 100 g DW), το μοριακό μέγεθός τους (με βάση τον μέσο βαθμό πολυμερισμού, mDP), τα γραμμομοριακά ποσοστά προδελφινιδίων (PD) και προκυανιδίων (PC) εντός τους και τα γραμμομοριακά ποσοστά cis- και trans- υπομονάδων φλαβανο-3όλης (Ropiak et al., 2016).

5.2.5. Πειραματικός Σχεδιασμός

Η διατροφή των ζώων και για τις τρεις *in vivo* μελέτες, σχεδιάστηκε ώστε να καλύπτει τις ανάγκες των ζώων σε θρεπτικές ουσίες και το συνολικό σιτηρέσιο ήταν πάντα ισοενεργειακό και ισοαζωτούχο, καθώς και ισόρροπο ως προς τα ανόργανα συστατικά Ca, P, και την αναλογία Ca/P (Συμπληρωματικός Πίνακας 5.1). Τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε καθαρό νερό

και η ημερήσια κατανάλωση της ζωοτροφής (ως χορηγούμενη ποσότητα μείον την απορριπτόμενη) καταγράφονταν από τον υπεύθυνο της εκμετάλλευσης.

5.2.5.1. Πείραμα 1

Το **Πείραμα 1**, στόχευε στη διερεύνηση της ανθελμινθικής δράσης χαρουπιού, μετά από προσθήκη χαρουπάλευρου στο σιτηρέσιο προβάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και στον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσής του στο σιτηρέσιο. Στο πείραμα συμμετείχαν 35 αρνιά (πέντε ομάδες των επτά ζώων), με μέσες τιμές βάρους ανά ομάδα, όπως φαίνονται στον **Πίνακα 5.1**. Το χαρουπάλευρο (CaBP) χορηγήθηκε ως συμπλήρωμα, σε ποσοστά 0%, 3%, 6% και 12% (g CaBP / 100 g) του συνολικού σιτηρεσίου. Το μέγιστο ποσοστό 12% ορίστηκε εξαιτίας της χαμηλής περιεκτικότητάς του σε ενέργεια και πρωτεΐνες, ώστε η διατροφή να καλύπτει τις ανάγκες των αρνιών. Προκειμένου τα ζώα να προσαρμοστούν στη διατροφή, όλες οι ομάδες άρχισαν να λαμβάνουν το επιμερισμένο μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών με τις διαφορετικές αναλογίες χαρουπάλευρου, δύο εβδομάδες πριν την πειραματική μόλυνση (D - 14). Την Ημέρα 0 (D0), όλα τα αρνιά μολύνθηκαν δια του στόματος, με δόση 12.000 προνυμφών L₃ του *H. contortus* και 12.000 L₃ του *Tr. colubriformis*. Παθοφυσιολογικές και παρασιτολογικές εξετάσεις πραγματοποιούνταν, όπως αναφέρεται στα **Κεφάλαια 5.2.6** και **5.2.7.1.**, αντίστοιχα. Στο τέλος της πειραματικής περιόδου (D49), τα ζώα οδηγήθηκαν στο σφαγείο.

5.2.5.2. Πείραμα 2

Τέσσερις ομάδες των έξι αρνιών συμπεριλήφθηκαν σε πείραμα δύο παραγόντων [(διατροφή και προσθήκη πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG)]. Σε δύο ομάδες ενσωματώθηκε στο σιτηρέσιό τους χαρουπάλευρο (CaBP) στη μέγιστη συγκέντρωση 12%, ενώ στις δυο άλλες ομάδες χορηγήθηκε συμβατικό σιτηρέσιο (**Πίνακας 5.1**). Στα μισά αρνιά χορηγήθηκε PEG (Polyethylene Glycol 4000, Fisher Scientific USA) ατομικά, διά του στόματος (60 g/ζώο αραιωμένο σε 200 mL νερού) καθημερινά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, μετά την κατανομή τους στις πειραματικές ομάδες. Την Ημέρα 0 (D0), όλα τα αρνιά μολύνθηκαν πειραματικά με 8.000 L₃ *H. contortus* και 16.000 L₃ του *Tr. colubriformis*. Την Ημέρα 21 (D21), μετά την επιβεβαίωση της μόλυνσης από παράσιτα, μέσω της εξέτασης κοπράνων, τα ζώα χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες των έξι αρνιών η καθεμία, σύμφωνα με τις πειραματικές επεμβάσεις. Παθοφυσιολογικές και παρασιτολογικές εξετάσεις πραγματοποιούνταν, όπως

αναφέρεται στα **Κεφάλαια 5.2.6** και **5.2.7.1.**, αντίστοιχα. Την Ημέρα 37 (D37) τα ζώα οδηγήθηκαν στο σφαγείο.

5.2.5.3. Πείραμα 3

Το Πείραμα 3 είχε σκοπό τον προσδιορισμό πιθανής συνέργειας μεταξύ των δύο πλούσιων σε συμπυκνωμένες ταννίνες (CT) φυτικών υλικών, δηλαδή του καρπού χαρουπιού (*C. siliqua*) και του σανού ονοβρυχίδας (*O. viciifolia*). Έτσι, δημιουργήθηκαν τέσσερις ομάδες των έξι αρνιών σε έναν πειραματικό σχεδιασμό δυο παραγόντων (**Πίνακας 5.1.**). Την Ημέρα -14 (D-14), κάθε ομάδα έλαβε σιτηρέσιο που περιείχε:

- i) χαρουπάλευρο (CaBP),
- ii) pellets ονοβρυχίδας (S)
- iii) συνδυασμό χαρουπάλευρου και pellets ονοβρυχίδας (CaBP+S), ενώ στην ομάδα ελέγχου (C) το σιτηρέσιο είχε βάση τη μηδική.

Το χαρουπάλευρο ενσωματώθηκε στο σιτηρέσιο σε ποσοστό 12%, ενώ η ονοβρυχίδα ως pellet που αντιπροσώπευε το 35% του συνολικού σιτηρεσίου. Την Ημέρα 0 (D0) πραγματοποιήθηκε η μόλυνση όλων των αρνιών, με 12.000 L₃ *H. contortus* και 12.000 L₃ *Tr. colubriformis*. Παθοφυσιολογικές και παρασιτολογικές εξετάσεις πραγματοποιούνταν, όπως αναφέρεται στα **Κεφάλαια 5.2.6** και **5.2.7.1.**, αντίστοιχα. Την τελευταία Ημέρα 37 (D37) της πειραματικής περιόδου τα ζώα οδηγήθηκαν στο σφαγείο.

5.2.6. Παθοφυσιολογικές εξετάσεις

Ατομικά δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε φιαλίδια με ηπαρίνη (BD Vacutainer®, UK) για τον προσδιορισμό του αιματοκρίτη (PCV - packed cell volume), εβδομαδιαία (από D0 έως D49) κατά τη διάρκεια του Πειράματος 1 και μια φορά κάθε 14 ημέρες (D0, D14, D28) κατά τη διάρκεια του Πειράματος 3. Λόγω της σύντομης διάρκειας του Πειράματος 2, η λήψη δειγμάτων για προσδιορισμό των τιμών PCV δεν συμπεριλήφθηκε στον πειραματικό σχεδιασμό του.

Πίνακας 5.1. Πειραματικός σχεδιασμός *in vivo* δοκιμών σε αρνιά, ανθελμινθικής δράσης φυτικών υλικών (CaBP = Χαρούπι; CaBP+PEG = Χαρούπι+PEG; C = Ομάδα ελέγχου; C+PEG = Ομάδα ελέγχου+PEG; CaBP+S = Χαρούπι+Ονοβρυχίδα; S = Ονοβρυχίδα)

<i>Πειραμα</i>	<i>Ομάδα</i>	<i>Πρόβατα /ομάδα</i>	<i>Μέσο Σ.Β.±τ.α. (kg)</i>	<i>Ημέρα (D) έναρξης διατροφής</i>	<i>Ημέρα (D) μόλυνσης</i>	<i>Δόση μόλυνσης (L3)</i>	<i>Ημέρα λήξης του πειράματος</i>
<i>1</i>	CaBP 0%	<i>7</i>	25,8±1,07	<i>-14</i>	<i>0</i>	12.000	<i>49</i>
	CaBP 3%		26,2±3,67			<i>H. contortus</i>	
	CaBP 6%		25,2±2,62			<i>&</i>	
	CaBP 9%		27,1±3,49			12.000	
	CaBP 12%		26,4±2,82			<i>Tr. colubriformis</i>	
<i>2</i>	C	<i>6</i>	26,4±2,75	<i>21</i>	<i>0</i>	8.000	<i>37</i>
	C+PEG		26,5±2,59			<i>H. contortus</i>	
	CaBP		26,3±2,42			<i>&</i>	
	CaBP+PEG		27,0±1,67			16.000 <i>Tr. colubriformis</i>	
<i>3</i>	C	<i>6</i>	27,0±3,10	<i>-14</i>	<i>0</i>	12.000 L3	<i>37</i>
	CaBP		27,1±2,54			<i>H. contortus</i>	
	CaBP+S		27,1±2,87			<i>&</i>	
	S		26,8±3,19			12.000 L3 <i>Tr. colubriformis</i>	

5.2.7. Παρασιτολογικές εξετάσεις

5.2.7.1. Προσδιορισμός αριθμού αυγών γαστρεντερικών παρασίτων (Faecal Egg Counts / FEC)

Ατομικά δείγματα κοπράνων συλλέγονταν εβδομαδιαίως από το απευθυσμένο των ζώων, κατά τη διάρκεια των Πειραμάτων 1 και 3, και δυο φορές της εβδομάδα κατά τη διάρκεια του Πειράματος 2, προκειμένου να προσδιοριστεί ο αριθμός των αυγών των παρασίτων στα κόπρανα των αρνιών, με τη χρήση της τροποποιημένης τεχνικής McMaster (Roepstorff & Nansen, 1998). Τα αποτελέσματα εκφράζονταν σε αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων (EPG).

5.2.7.2. Προσδιορισμός αριθμού ενήλικων παρασίτων *H. contortus* και *Tr. colubriformis*

Μετά από τη νεκροψία, το ήνυστρο και τα 12 πρώτα μέτρα του λεπτού εντέρου διαχωρίστηκαν, δέθηκαν και απομακρύνθηκαν ταχέως, ώστε να επεξεργαστούν, για να επιτευχθεί η συλλογή των ενήλικων ελμίνθων από το περιεχόμενο του αυλού. Επιπλέον, για την συλλογή των προνυμφών που πιθανά βρίσκονταν ακόμη εντός του βλεννογόνου, εφαρμόστηκε και η τεχνική της τεχνητής πέψης στους ιστούς του ηνύστρου, αλλά και του εντερικού βλεννογόνου (έκθεσή τους δηλαδή σε διάλυμα πεψίνης και επώαση τεσσάρων περίπου ωρών στους 37° C) (MAFF, 1986). Το συνολικό παρασιτικό φορτίο ανά ζώο τελικά εκτιμήθηκε μετά από καταμέτρηση του 10% των παρασίτων στο τελικό όγκο του υγρού που συλλέχθηκε κατά την προηγούμενη διαδικασία σύμφωνα με τη μέθοδο που προτείνεται από το MAFF (1986). Η μορφολογική ταυτοποίηση των σταδίων, του φύλου και των ειδών διεξήχθη χρησιμοποιώντας τυποποιημένες διαδικασίες (MAFF, 1986).

5.2.7.3. Προσδιορισμός ωοτοκίας των θηλυκών ενήλικων παρασίτων

Η ωοτοκία των θηλυκών ελμίνθων (ως δείκτης γονιμότητας) μετρήθηκε σε 10 έλμινθες ανά ζώο. Κατά τη διάρκεια της παραπάνω διαδικασίας του προσδιορισμού του αριθμού των ενήλικων παρασίτων, συλλέγονταν 10 θηλυκά ενήλικα παράσιτα ανά είδος για κάθε ζώο, τα οποία και φυλάσσονταν σε περιέκτες των 2ml σε διάλυμα αιθανόλης 70%. Ανάλογα με το είδος του παρασίτου, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω διαφορετικά πρωτόκολλα.

5.2.7.3.1. Προσδιορισμός ωοτοκίας θηλυκών *H. contortus*

Για τα ενήλικα θηλυκά του είδους *H. contortus*, η ωοτοκία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Kloosterman et al. (1978). Εν συντομία, τα ενήλικα ένα προς ένα επανυδατώθηκαν για 5' σε 1.000 μl αποσταγμένου νερού, πριν τοποθετηθούν σε 1.000 μl υποχλωριώδους διαλύματος 0,125 % για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία είχε ως αποτέλεσμα της διάσπαση των ελμίνθων, επιτρέποντας την άμεση μέτρηση των αυγών με τη βοήθεια στερεοσκοπίου, χρησιμοποιώντας το 10 % του συνολικού όγκου (100 μl από τα 1.000 μl). Τέλος, υπολογίστηκε με επαγωγή η ωοτοκία στο 100%.

5.2.7.3.2. Προσδιορισμός ωοτοκίας θηλυκών *Tr. colubriformis*

Όσον αφορά τον αριθμό των αυγών των θηλυκών *Tr. colubriformis*, αυτός προσδιοριζόταν με τον εξής τρόπο: ολόκληρο το ενήλικο παράσιτο εμβαπτίζονταν σε διάλυμα γαλακτικού οξέος 85%, για λίγα δευτερόλεπτα, έως ότου επιτευχθεί διαύγαση του επιδερματιδίου του και τα αυγά μετριόνταν απευθείας στη μήτρα του κάθε παρασίτου. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο ρυθμισμένο στον φακό μεγέθυνσης 10 (100x).

5.2.8. Στατιστική Επεξεργασία

Οι τιμές των αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων (FEC) και οι μετρήσεις των ενήλικων παρασίτων (AWC) λογαριθμήθηκαν ($\log_{10}(x+1)$) πριν από την στατιστική ανάλυση. Για τις τιμές FEC πραγματοποιήθηκαν αρχικά συγκρίσεις χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης σε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (Repeated measures ANOVA). Στη συνέχεια έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων με τις τιμές ελέγχου από ημερομηνία σε ημερομηνία χρησιμοποιώντας one-way ANOVA, που ολοκληρώθηκε με post-hoc Bonferroni test για τις επιμέρους συγκρίσεις κατά ζεύγη. Οι διαφορές των μέσων τιμών AWC μεταξύ των ομάδων εξετάστηκαν:

- i) με one-way ANOVA για το Πείραμα 1 και
- ii) με two-way ANOVA για το Πείραμα 2 (CaBP +/- και PEG +/-) και το Πείραμα 3 (CaBP +/- and sainfoin +/-).

Όσον αφορά την παράμετρο της ωοτοκίας των θηλυκών παρασίτων, αρχικά χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή Shapiro-Wilk Test, η οποία είναι κατάλληλη για μικρό αριθμό δειγμάτων, ώστε να διαπιστωθεί εάν οι μετρήσεις ακολουθούν κανονική κατανομή. Στις περιπτώσεις όπου τα δεδομένα απέκλιναν σημαντικά ($P < 0.05$) από την κανονική κατανομή (Πείραμα 1 και 3 και για

τα δύο είδη παρασίτων και Πείραμα 2 για το *Tr. colubriformis*) χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμή Kruskal-Wallis. Στις περιπτώσεις όπου η εξαρτημένη μεταβλητή ακολουθούσε κανονική κατανομή ($P > 0.05$), χρησιμοποιήθηκε η παραμετρική δοκιμή one-way ANOVA (Πείραμα 2 για το *H. contortus*). Επιπλέον, όσον αφορά το Πείραμα 1, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του «ποσοστού χαρουπάλευρου στο σιτηρέσιο» πάνω στην «ωοτοκία των θηλυκών παρασίτων» και για τα δύο είδη παρασίτων χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης. Τέλος, η δοκιμή Tukey HSD χρησιμοποιήθηκε για τα δεδομένα του Πειράματος 3, προκειμένου να διερευνηθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό SyStatSPSS 9.0.

5.2.9. Ηθικά Ζητήματα

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη σχετική εθνική/ευρωπαϊκή νομοθεσία που αφορά πειραματισμούς σε ζώα (Οδηγία 86/609/EC). Ο αριθμός των ζώων επιλέχθηκε να είναι ο μικρότερος δυνατός (σύμφωνα με παρόμοιες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία) και οι χειρισμοί των ζώων περιορίστηκαν σε διαγνωστικές κτηνιατρικές διαδικασίες ρουτίνας για τη διάγνωση ασθενειών των ζώων και την βελτίωση της ευζωίας (οι οποίες σύμφωνα με τη νομοθεσία εξαιρούνται από την διαδικασία αδειοδότησης). Όλοι οι χειρισμοί έγιναν σε πειραματικό ποίμνιο του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ από εξειδικευμένο προσωπικό και κτηνιάτρους (ειδικά εκπαιδευμένους για διενέργεια πειραματισμών σε ζώα). Στο τέλος του κάθε πειραματισμού τα ζώα οδηγήθηκαν στο σφαγείο σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία.

5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.3.1. Αποτελέσματα Χημικής Ανάλυσης Ταννινών

Η συγκέντρωση και η σύνθεση των συμπυκνωμένων ταννινών (CT) παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5.3**. Η δοκιμή HBA έδειξε παρόμοιες συγκεντρώσεις CT και για τα δύο φυτικά υλικά, ενώ εκείνη της θειόλυσης έδειξε χαμηλότερες συγκεντρώσεις CT στο pellet ονοβρυχίδας σε σχέση με το χαρουπάλευρο. Μάλιστα, η δοκιμή θειόλυσης αποκάλυψε ότι:

- i) οι CT τόσο του χαρουπιού όσο και της ονοβρυχίδας αποτελούνται κυρίως από προδελφινιδίνες 96,7 και 74,7% αντίστοιχα,
- ii) οι CT του χαρουπιού παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (ειδικότερα το ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ των υπομονάδων φλαβαν-3όλης ήταν 41,1%), ενώ της ονοβρυχίδας όχι, και
- iii) οι CT του χαρουπιού χαρακτηρίστηκαν από υψηλό σχετικά μοριακό βάρος ($mDP = 31,1$), ενώ της ονοβρυχίδας είχαν τιμή μέσου βαθμού πολυμερισμού $mDP = 11,5$.

Πίνακας 5.3. Συγκεντρώσεις συμπυκνωμένων ταννινών (CT) (εκφρασμένες σε g CT / 100 g DW), που μετρήθηκαν είτε με τη μέθοδο acetone-HCl/butanol είτε με θειόλυση, καθώς και η σύνθεση ταννινών στα δυο διαφορετικά φυτικά υλικά [συντομογραφίες: % αναφέρεται σε γραμμομοριακά ποσοστά εστεροποίησης με γαλλικό οξύ, προδελφινιδίων (PD), προκυανιδίων (PC), *cis*- ή *trans*- υπομονάδων φλαβανο-3όλης, μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP)].

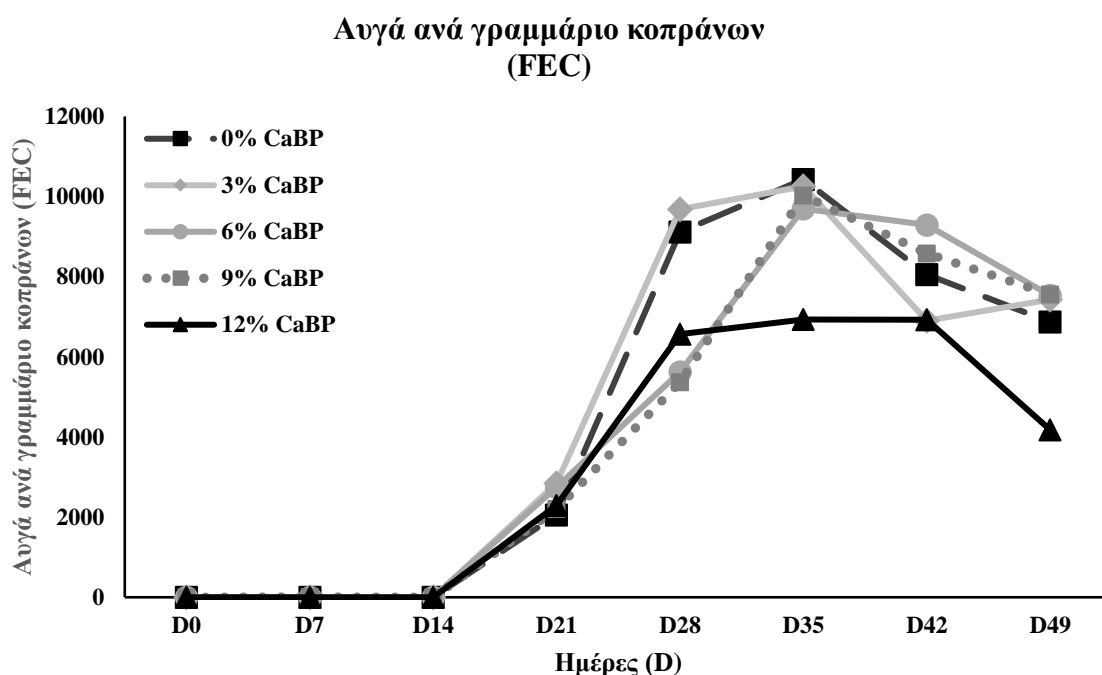
ND: δεν εντοπίστηκαν

	% εστεροποίησης με γαλλικό οξύ	PD/PC	Ταννίνες (acetone- HCl/butanol)	Ταννίνες (thiolysis)	mDP	<i>cis/trans</i> -flavan-3-ols
Χαρουπάλευρο	41,1	96,7/3,3	5,84	7,20	31,2	45,9/54,1
Pellets ονοβρυχίδας¹	ND	74,8/25,2	6,50	1,70	11,5	85,3/14,7

¹Το ίδιο pellet ονοβρυχίδας χρησιμοποιήθηκε σε μια άλλη μελέτη (Quijada et al., 2018) και παραθέτονται οι μετρήσεις εδώ, για σκοπούς σύγκρισης.

5.3.2. Πείραμα 1

Οι αναλύσεις των αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων (FEC), με βάση την ανάλυση διακύμανσης ANOVA on Repeated Measures από την Ημέρα 21 (D21) έως την Ημέρα 49 (D49), δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (Γράφημα 5.1). Παρόλα αυτά παρουσίασαν σημαντικές διαφορές με την πάροδο του χρόνου (μεταξύ των ημερών δειγματοληψίας). Επιπρόσθετα, οι επιμέρους αναλύσεις διακύμανσης ανά δειγματοληψία, δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, ανεξάρτητα από την ημερομηνία, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της δόσης. Μείωση στα αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων (FEC) έως 39,2% παρατηρήθηκε μόνο στην ομάδα που χορηγήθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση χαρουπιού (12%), την Ημέρα 49 (D49).



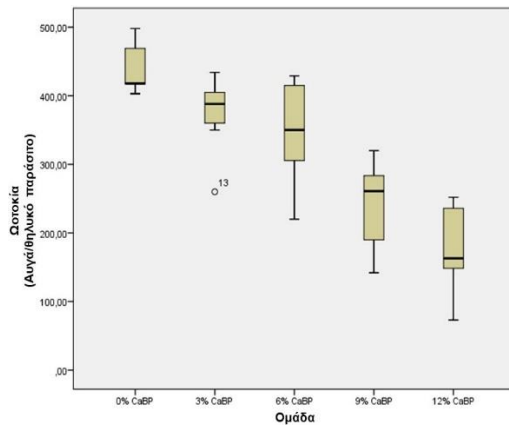
Γράφημα 5.1. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων χαρουπάλευρου (CaBP) της διατροφής στα αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων (FEC) που εκκρίνονταν από τα ζώα ανά πειραματική ομάδα.

Όσον αφορά την επίδραση του χαρουπιού στους ενήλικες έλμινθες (Πίνακας 5.4.) υπήρξε τάση μείωσης ($P=0,058$) για τα ενήλικα παράσιτα *Tr. colubriformis*, καθώς αυξάνονταν η συγκέντρωση του χαρουπιού, η οποία ενδεχομένως να ήταν ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, αν ο αριθμός των ζώων ήταν μεγαλύτερος.

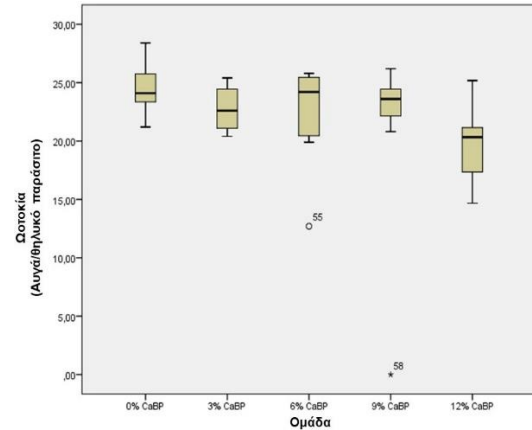
Πίνακας 5.4. Ενήλικα παράσιτα που ανακτήθηκαν κατά την νεκροψία ανά ομάδα ζώων που τους χορηγήθηκε σιτηρέσιο με διαφορετική συγκέντρωση χαρουπάλευρου (CaBP). Οι μετρήσεις των ενήλικων παρασίτων φαίνονται ως αριθμητικοί μέσοι (\pm τυπική απόκλιση) των ενήλικων *H. contortus* και *Tr. colubriformis* (θηλυκών, αρσενικών, σύνολο) ανά πειραματική ομάδα.

Πειραματική ομάδα	Ενήλικα <i>H. contortus</i>			Ενήλικα <i>Tr. colubriformis</i>		
	Θηλυκά	Αρσενικά	Σύνολο	Θηλυκά	Αρσενικά	Σύνολο
0% CaBP	2.777,1 (\pm 1.579,30)	2.331,4 (\pm 1.382,33)	5.108,6 (\pm 2.801,53)	2.062,9 (\pm 533,56)	1.097,1 (\pm 470,88)	3.160,0 (\pm 944,18)
3% CaBP	2.788,6 (\pm 1.606,35)	2.005,7 (\pm 1.117,06)	4.794,3 (\pm 2.709,46)	2.492,9 (\pm 986,03)	1.162,9 (\pm 568,50)	3.655,7 (\pm 1.460,85)
6% CaBP	3.584,3 (\pm 1.569,66)	2.570,0 (\pm 1.177,53)	6.154,3 (\pm 2.595,39)	2.514,3 (\pm 496,68)	902,9 (\pm 676,18)	3.417,1 (\pm 1.072,89)
9% CaBP	3.028,6 (\pm 1.385,03)	2.798,6 (\pm 1.415,20)	5.827,1 (\pm 2.692,20)	1.910,0 (\pm 1.042,80)	633,3 (\pm 427,30)	2.543,3 (\pm 1.418,32)
12% CaBP	2.160,0 (\pm 1.361,74)	2.038,6 (\pm 1.211,63)	4.198,6 (\pm 2.422,44)	1.550,0 (\pm 800,81)	944,3 (\pm 630,05)	2.494,3 (\pm 1.416,01)

Φάνηκε επίσης, να διαφέρουν σημαντικά οι τιμές ωοτοκίας (**Γράφημα 5.2.**) μεταξύ των ομάδων και για τα δύο είδη νηματωδών (κατά 15,6 % - 59,3 % χαμηλότερες τιμές από την ομάδα ελέγχου), δείχνοντας δοσοεξαρτώμενη δράση ($P < 0,05$). Όπως φαίνεται στο Box plot (**Γράφημα 5.2.**) οι έλμινθες του *H. contortus* παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές ωοτοκίας στην ομάδα ελέγχου, τάση που επιβεβαιώνεται από την μη παραμετρική δοκιμή Kruskal-Wallis, η οποία δείχνει ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ωοτοκία των παρασίτων μεταξύ των ομάδων ($P < 0,05$). Πιο συγκεκριμένα, η ωοτοκία διαφέρει σημαντικά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ομάδων που χορηγήθηκε χαρουπάλευρο. Αντίθετα, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των ομάδων ($P > 0,05$), για το είδος *Tr. colubriformis*. Όμως, το μοντέλο της γραμμικής παλινδρόμησης που χρησιμοποιήθηκε έδειξε να υπάρχει αρνητική συσχέτιση ($P < 0,05$) μεταξύ των μεταβλητών «ομάδα» και «ωοτοκία» (**Συμπληρωματικός Πίνακας 5.2.**), τόσο για το παράσιτο *H. contortus* ($B = -65,857$, διάστημα εμπιστοσύνης 95% (-78,35, -53,37), $P < 0,05$), όσο και για το *Tr. colubriformis* ($B = -0,80$, διάστημα εμπιστοσύνης 95% (-1,27, -0,34), $P < 0,05$)



i) *H. contortus*



ii) *Tr. colubriformis*

Γράφημα 5.2. Boxplots με διάστημα εμπιστοσύνης 95%, που δείχνουν τον μέσο αριθμό αυγών ανά θηλυκό παράσιτο για τις διατροφικές παρεμβάσεις διαφορετικών συγκεντρώσεων χαρουπάλευρου (CaBP) για τα παράσιτα i) *H. contortus* και ii) *Tr. colubriformis* κατά το Πείραμα 1.

Μετά την εφαρμογή της μεθόδου της τεχνητής πένης, δεν βρέθηκαν προνύμφες νηματωδών στα αρνιά καμίας επέμβασης. Επίσης, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε μεταξύ των ομάδων όσον αφορά τους αιματοκρίτες (PVC) που φαίνονται στον Πίνακα 5.5. Η μέση ημερήσια αύξηση σωματικού βάρους (ΜΗΑ), όπως αυτή υπολογίστηκε για ολόκληρη τη διάρκεια του πειράματος για τις ομάδες 0% CaBP, 3% CaBP, 6%CaBP, 9%CaBP και 12% CaBP ήταν (Μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση) $69,2 \pm 30,98$, $61,5 \pm 36,12$, $68,7 \pm 32,95$, $74,8 \pm 37,54$ και $64,4 \pm 32,87$ g αντίστοιχα, χωρίς να βρεθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

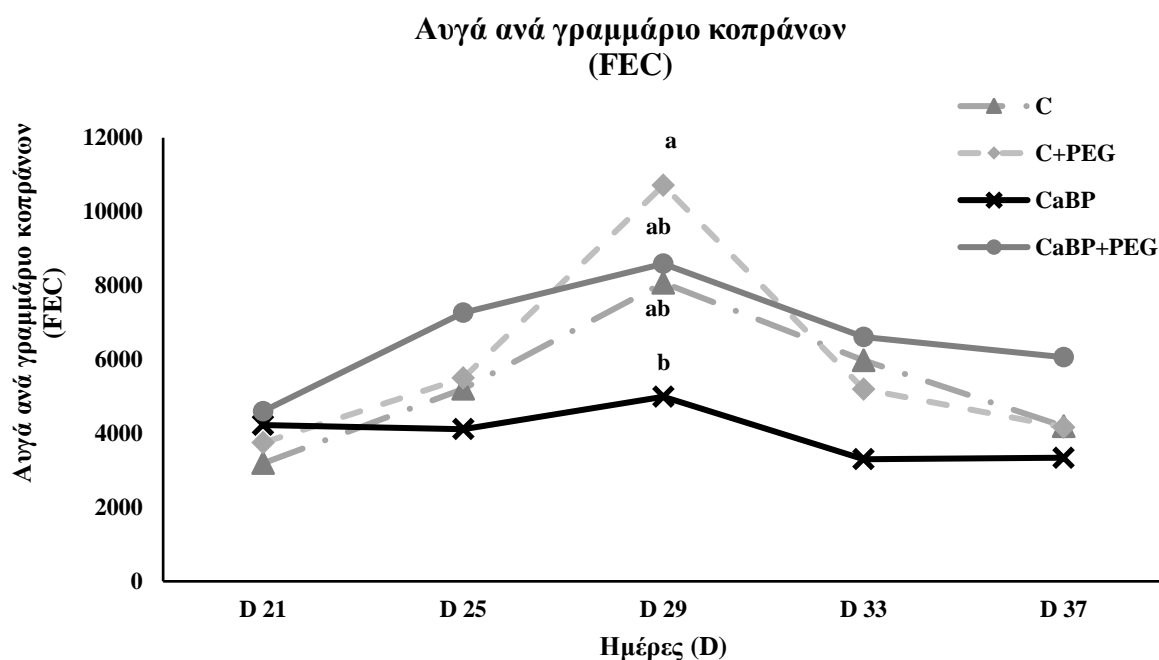
Πίνακας 5.5. Μέσοι όροι (\pm τυπική απόκλιση) τιμών αιματοκρίτη (%) για τα αρνιά κάθε πειραματικής ομάδας καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής περιόδου του Πειράματος 1

Πειραματική ομάδα	Αιματοκρίτης %							
	Ημέρα 0	Ημέρα 7	Ημέρα 14	Ημέρα 21	Ημέρα 28	Ημέρα 35	Ημέρα 42	Ημέρα 49
0%CaBP	36,9 ($\pm 8,07$)	33,9 ($\pm 4,14$)	27,3 ($\pm 3,90$)	25,3 ($\pm 5,85$)	25,7 ($\pm 5,99$)	26,6 ($\pm 6,88$)	28,6 ($\pm 9,05$)	25,3 ($\pm 5,96$)
3%CaBP	40,4 ($\pm 7,23$)	37,0 ($\pm 3,11$)	27,6 ($\pm 3,31$)	24,3 ($\pm 3,95$)	21,7 ($\pm 5,99$)	24,3 ($\pm 5,77$)	23,4 ($\pm 6,85$)	23,0 ($\pm 5,72$)
6%CaBP	30,3 ($\pm 3,59$)	32,9 ($\pm 3,67$)	23,3 ($\pm 3,04$)	24,4 ($\pm 3,69$)	21,7 ($\pm 4,79$)	22,7 ($\pm 6,21$)	21,7 ($\pm 6,24$)	21,0 ($\pm 6,32$)
9%CaBP	34,6 ($\pm 3,10$)	33,4 ($\pm 3,31$)	26,9 ($\pm 3,02$)	25,1 ($\pm 2,79$)	23,4 ($\pm 2,57$)	24,1 ($\pm 3,93$)	23,6 ($\pm 5,19$)	23,0 ($\pm 5,89$)
12%CaBP	36,0 ($\pm 3,27$)	34,6 ($\pm 2,64$)	27,6 ($\pm 3,99$)	25,6 ($\pm 5,38$)	23,4 ($\pm 4,31$)	25,0 ($\pm 4,69$)	25,6 ($\pm 4,72$)	24,0 ($\pm 5,00$)

5.3.3. Πείραμα 2

Όπως φαίνεται και στο **Γράφημα 5.3.**, παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$) μεταξύ της ομάδας που κατανάλωσε τροφή πλούσια σε χαρουπάλευρο (CaBP) και των υπόλοιπων ομάδων ελέγχου (C, C+PEG, CaBP+PEG) για την παράμετρο «αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων» (FEC). Μάλιστα, η ανάλυση date-by-date ANOVA έδειξε ότι οι διαφορές ήταν πιο εμφανείς την Ημέρα 29 (στατιστικά σημαντικές διαφορές, $P < 0,05$) και στη συνέχεια την Ημέρα 33 (τάση $P = 0,07$). Συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε ό, τι αφορά το FEC ανάμεσα στις ομάδες C, C+PEG, CaBP+PEG του Πειράματος 2, ενώ η ομάδα που έλαβε μόνο χαρούπι (CaBP), παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές FEC από την Ημέρα 25 έως την τελευταία μέρα του πειράματος ($P > 0,05$).

Οι ακριβείς τιμές P φαίνονται στους **Συμπληρωματικούς Πίνακες 5.3** έως **5.6** του Παραρτήματος Β.



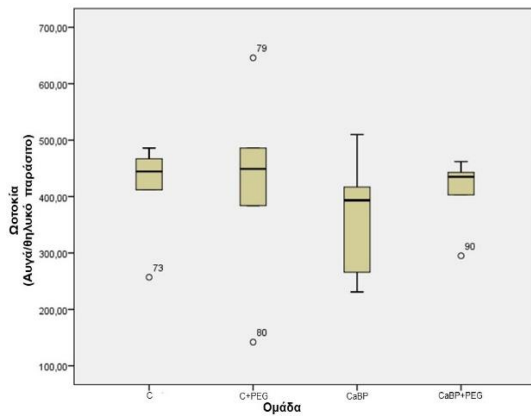
Γράφημα 5.3. Επίδραση διαφορετικών πειραματικών σιτηρεσίων χαρουπάλευρου (CaBP) με ή χωρίς PEG (C = Ομάδα ελέγχου, C+PEG = Ομάδα ελέγχου+PEG, CaBP = Χαρουπάλευρο, CaBP+PEG = Χαρουπάλευρο+PEG), στα αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων (FEC) που εκκρίνονταν από τα ζώα ανά πειραματική ομάδα. Κατά την ημέρα 29 οι τιμές FEC με διαφορετικό εκθέτη (^{a,b}) διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($P < 0,05$)

Όσον αφορά τα ενήλικα παράσιτα (AWC), φάνηκε (**Πίνακας 5.6.**) να μειώνεται ο αριθμός τους για το είδος *H. contortus* ($P < 0,05$), και οι χαμηλότερες τιμές να εμφανίζονται στην ομάδα (CaBP). Μάλιστα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (C) παρατηρήθηκε μείωση έως 65% στην ομάδα CaBP, η οποία εν μέρει εξουδετερώθηκε με τη χρήση PEG. Από την άλλη πλευρά, καμία επίδραση δεν φάνηκε να έχει το χαρούπι στα ενήλικα άτομα του είδους *Tr. colubriformis*.

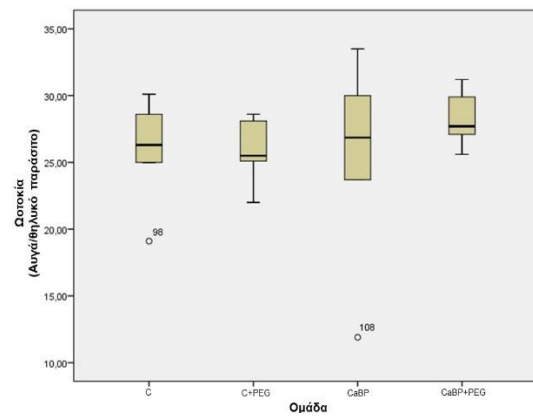
Πίνακας 5.6. Ενήλικα παράσιτα που ανακτήθηκαν κατά τη νεκροψία ανά ομάδα ζώων, που έλαβε διαφορετικό πειραματικό σιτηρέσιο χαρουπάλευρου με ή χωρίς PEG (C = Ομάδα ελέγχου, C+PEG = Ομάδα ελέγχου+PEG, CaBP = Χαρουπάλευρο, CaBP+PEG = Χαρουπάλευρο+PEG). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αριθμητικοί μέσοι (\pm τυπική απόκλιση) των ενηλίκων *H. contortus* και *Tr. colubriformis* (θηλυκών, αρσενικών, σύνολο) ανά πειραματική ομάδα

Πειραματική ομάδα	Ενήλικα <i>H. contortus</i>			Ενήλικα <i>Tr. colubriformis</i>		
	Θηλυκά	Αρσενικά	Σύνολο	Θηλυκά	Αρσενικά	Σύνολο
C	896,7 ($\pm 736,14$)	583,7 ($\pm 461,48$)	1.480,3 ^a ($\pm 1.194,81$)	5.783,3 ($\pm 2.104,37$)	4.382,2 ($\pm 1.529,12$)	10.165,5 ($\pm 3.598,72$)
C+PEG	1.001,7 ($\pm 323,14$)	710,3 ($\pm 278,86$)	1.712,0 ^a ($\pm 592,91$)	6.028 (± 2.740)	4.713,3 ($\pm 2.066,50$)	10.741,5 ($\pm 4.775,89$)
CaBP	288,3 ($\pm 220,31$)	243,3 ($\pm 199,96$)	531,7 ^b ($\pm 399,02$)	5.397 (± 2.280)	4.881,7 ($\pm 2.170,91$)	10.278,7 ($\pm 4.439,20$)
CaBP+PEG	701,0 ($\pm 250,04$)	616,7 ($\pm 177,95$)	1.317,7 ^a ($\pm 423,75$)	5.751 (± 2.387)	5.303,3 ($\pm 1.742,78$)	11.053,8 ($\pm 4.090,68$)

Η ωοτοκία των θηλυκών, όπως φαίνεται στο **Γράφημα 5.4.**, τόσο του είδους *H. contortus* όσο και του *Tr. colubriformis*, φάνηκε να μην επηρεάζεται από την προσθήκη χαρουπιού στο σιτηρέσιο και δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες και για τα δύο είδη παρασίτων. Βέβαια, όσον αφορά την ωοτοκία των θηλυκών *H. contortus*, η ωοτοκία των θηλυκών παρασίτων στην ομάδα CaBP παρουσίασε μεγαλύτερο εύρος τιμών σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου (C, C+PEG και CaBP+PEG).



i) *H. contortus*



ii) *Tr. colubriformis*

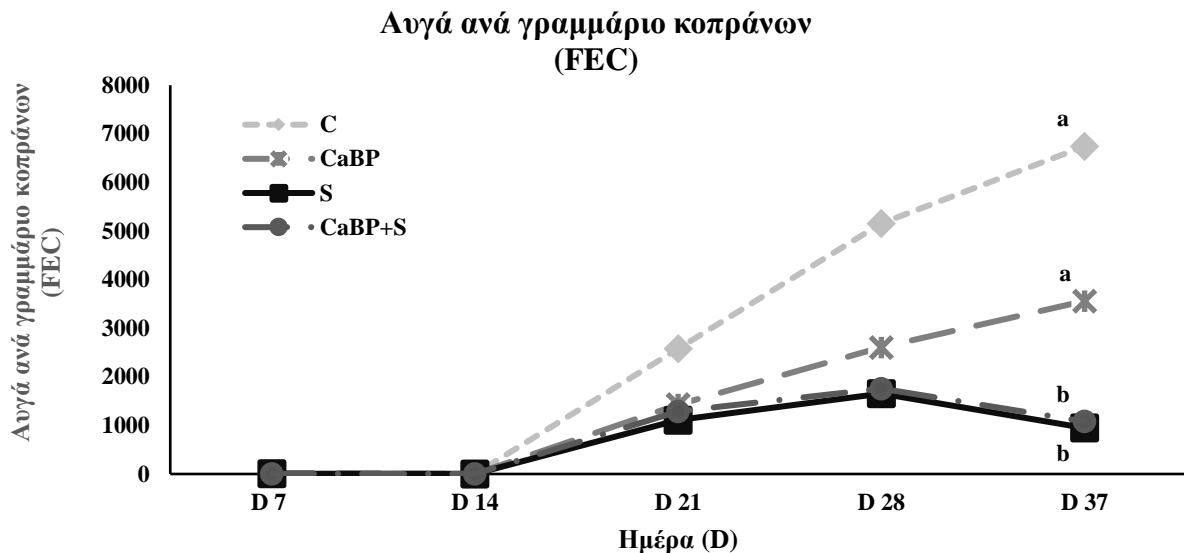
Γράφημα 5.4. Boxplots με διάστημα εμπιστοσύνης 95%, που δείχνουν τον μέσο αριθμό αυγών ανά θηλυκό παράσιτο για τις διατροφικές παρεμβάσεις [χαρουπάλευρου (CaBP) με ή χωρίς PEG (C = Ομάδα ελέγχου, C+PEG = Ομάδα ελέγχου+PEG, CaBP = Χαρουπάλευρο, CaBP+PEG = Χαρουπάλευρο+PEG)], για τα παράσιτα i) *H. contortus* και ii) *Tr. colubriformis* κατά το **Πείραμα 2**.

Όπως στο Πείραμα 1, έτσι και εδώ δεν βρέθηκαν προνύμφες νηματωδών μετά την τεχνητή πέψη με πεψίνη. Όσον αφορά την ΜΗΑ των αρνιών, όπως αυτή υπολογίστηκε για ολόκληρη τη διάρκεια του πειράματος για τις ομάδες C, C+PEG, CaBP και CaBP+PEG ήταν (Μέσος όρος±τυπική απόκλιση) 51,8±30,12, 69,8±19,89, 60,8±29,30 και 40,5±25,64 g αντίστοιχα, χωρίς να βρεθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

5.3.4. Πείραμα 3

Οι τιμές των αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων (FEC), όλων των ομάδων παρέμειναν σε πολύ χαμηλά επίπεδα έως την Ημέρα 21, όπως φαίνεται στον **Γράφημα 5.5**. Οι συνολικές επαναλαμβανόμενες αναλύσεις με βάση τρεις ημερομηνίες (Ημέρα 21, Ημέρα 28, Ημέρα 37) έδειξαν τάση ($P=0,07$) για διαφορές μεταξύ των ομάδων. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων διακύμανσης ανά δειγματοληψία δεν έδειξαν διαφορές για τις Ημέρες 21 και 28, ενώ την Ημέρα 37 οι τιμές στις ομάδες CaBP+S ($P=0,53$) και S ($P=0,06$) έδειξαν πτωτική τάση σε σχέση με την ομάδα C. Το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό ($P<0,05$) και στην Ημέρα 37 οι τιμές στις ομάδες CaBP+S και S είναι πτωτικές, ενώ οι τιμές στις ομάδες C και CaBP είναι αυξητικές. Συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, εμφανίστηκαν μειώσεις στα FEC των ομάδων CaBP, CaBP+S και S, που κυμάνθηκαν από 44,6 έως 86,0%, κυρίως στις ομάδες S και CaBP+S.

Οι ακριβείς τιμές P φαίνονται στους **Συμπληρωματικούς Πίνακες 5.7** έως **5.9** του **Παραρτήματος Β**.



Γράφημα 5.5. Επίδραση διαφορετικών πειραματικών διατροφών [χαρουπάλευρου (CaBP), ονοβρυχίδας (S), συνδυασμού χαρουπάλευρου και ονοβρυχίδας (CaBP+S) και τυπικής διατροφής της ομάδας ελέγχου (C)] στα αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων (FEC) που εκκρίνονταν από τα ζώα ανά πειραματική ομάδα. Κατά την ημέρα 37 οι τιμές FEC στις ομάδες CaBP+S και S έδειξαν πτωτική τάση ($P=0,53$ και $P=0,06$ αντίστοιχα)

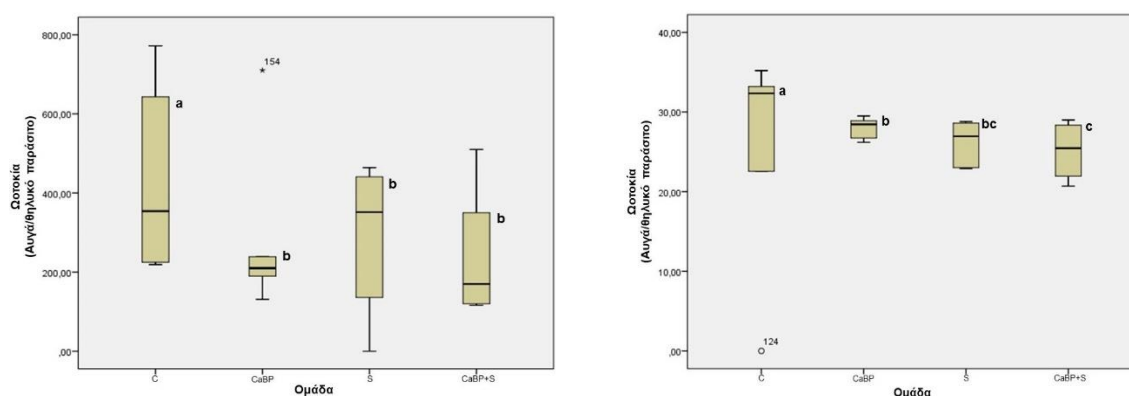
Όσον αφορά τα ενήλικα παράσιτα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ούτε στον αριθμό των *H. contortus*, ούτε των *Tr. colubriformis*, όπως παρουσιάζεται παρακάτω στον **Πίνακα 5.7**.

Πίνακας 5.7. Ενήλικα παράσιτα που βρέθηκαν μετά την νεκροψία, ανά ομάδα ζώων, όπου χορηγήθηκε διαφορετική πειραματική διατροφή [C (Ομάδα ελέγχου), CaBP (Χαρουπάλευρο), S (pellets ονοβρυχίδας), CaBP+S (Χαρουπάλευρο+pellets ονοβρυχίδας)]. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως αριθμητικοί μέσοι (\pm τυπική απόκλιση) των ενήλικων *H. contortus* και *Tr. colubriformis* (θηλυκών, αρσενικών, σύνολο) ανά πειραματική ομάδα

Πειραματική ομάδα	Ενήλικα <i>H. contortus</i>			Ενήλικα <i>Tr. colubriformis</i>		
	Θηλυκά	Αρσενικά	Σύνολο	Θηλυκά	Αρσενικά	Σύνολο
C	3.481,7 ($\pm 3.170,30$)	3.301,7 ($\pm 2.797,12$)	6.783,3 ($\pm 5.923,66$)	1.370,0 ($\pm 443,22$)	1.081,7 ($\pm 437,97$)	2.451,7 ($\pm 842,36$)
CaBP	2.086,7 ($\pm 2.339,17$)	2.288,3 ($\pm 2.562,27$)	4.375,0 ($\pm 4.787,54$)	1.140,0 ($\pm 372,99$)	1.051,7 ($\pm 258,57$)	2.191,7 ($\pm 617,33$)
S	1.315,0 ($\pm 1.594,31$)	1.255,0 ($\pm 1.707,25$)	2.570,0 ($\pm 3.286,05$)	1.735,0 ($\pm 1.414,42$)	1.453,3 ($\pm 1.029,27$)	3.188,3 ($\pm 2.406,46$)
CaBP+S	1.470,0 ($\pm 1.256,55$)	1.685,0 ($\pm 1.392,88$)	3.155,0 ($\pm 2.607,08$)	1.088,3 ($\pm 1.198,01$)	863,3 ($\pm 961,26$)	1.951,7 ($\pm 2.156,07$)

Για την ωοτοκία και των δύο ειδών παρασίτων, η μη παραμετρική δοκιμή Kruskal-Wallis Test έδειξε σημαντικές διαφορές ($P<0,05$) μεταξύ των ομάδων. Συγκεκριμένα, οι ομάδες ελέγχου

(C) εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές, ενώ οι τιμές ωοτοκίας για τα θηλυκά παράσιτα ήταν χαμηλότερες στην ομάδα που έλαβε σιτηρέσιο με χαρούπι και ονοβρυχίδα (CaBP+S). Η ανάλυση Tukey HSD, αποκάλυψε για την ωοτοκία των θηλυκών *H. contortus* σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας ελέγχου (C) και των CaBP, S και CaBP+S, ενώ για την ωοτοκία των *Tr. colubriformis* φάνηκε επιπλέον να διαφέρουν σημαντικά και οι ομάδες CaBP και CaBP+S μεταξύ τους.



i) *H. contortus*

ii) *Tr. colubriformis*

Γράφημα 5.6. Βoxplots με διάστημα εμπιστοσύνης 95%, που δείχνουν τον μέσο αριθμό των αυγών ανά θηλυκό παράσιτο για τις τρεις διατροφικές παρεμβάσεις [χαρουπάλευρου (CaBP), ονοβρυχίδας (S), συνδυασμού χαρουπάλευρου και ονοβρυχίδας (CaBP+S)] και την ομάδα ελέγχου (C) για τα παράσιτα i) *H. contortus* και ii) *Tr. colubriformis* κατά το **Πείραμα 3**. Οι τιμές των αυγών ανά θηλυκό παράσιτο με διαφορετικό εκθέτη (^{a,b,c}) διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ($P < 0,05$)

Οι ακριβείς τιμές P φαίνονται στους **Συμπληρωματικούς Πίνακες 5.10** και **5.11** του **Παράρτηματος Β**.

Ούτε σε αυτό το πείραμα βρέθηκαν προνύμφες νηματωδών παρασίτων μετά από την εφαρμογή της μεθόδου της τεχνητής πέψης. Κατά την ανάλυση των παθοφυσιολογικών παραμέτρων (PCV), δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ως προς τον αιματοκρίτη των ζώων (**Πίνακας 5.8**). Όσον αφορά την ΜΗΑ των αρνιών, αυτή υπολογίστηκε για ολόκληρη την διάρκεια του πειράματος για της ομάδες C, CaBP, S και CaBP+S, αυτή ήταν (Μέσος όρος±τυπική απόκλιση) 122,5±38,10, 88,2±39,22, 104,6±11,87 και 124,8±39,68 g αντίστοιχα, χωρίς να βρεθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

Πίνακας 5.8. Μέσοι όροι (\pm τ.α.) των τιμών αιματοκρίτη (%) ανά πειραματική ομάδα ζώων ανά διαστήματα 14 ημερών κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου του Πειράματος 3

Πειραματική ομάδα	Αιματοκρίτης %		
	Ημέρα 0	Ημέρα 14	Ημέρα 28
C	36,7 (\pm 3,50)	31,8 (\pm 5,38)	31,7 (\pm 3,39)
CaBP	37,8 (\pm 5,19)	35,5 (\pm 6,38)	33,0 (\pm 4,86)
S	34,2 (\pm 4,26)	29,5 (\pm 2,17)	31,3 (\pm 3,61)
CaBP+S	37,0 (\pm 2,37)	32,2 (\pm 4,31)	30,5 (\pm 4,37)

5.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για αρκετές δεκαετίες, οι διατροφικές μελέτες σύστηναν αποφυγή στη χρήση φυτικών ειδών που περιείχαν ταννίνες, εξαιτίας των αρνητικών επιπτώσεων που αναφέρονταν ότι προκαλούσαν στην πέψη και την παραγωγικότητα των ζώων (Mueller-Harvey, 2006). Βέβαια, οι περισσότερες περιπτώσεις με διαπίστωση αρνητικών επιπτώσεων αφορούσαν τα μονογαστρικά και όχι τα μηρυκαστικά ζώα. Όμως παρόλο που στο παρελθόν οι ταννίνες που περιέχονται στις ζωοτροφές θεωρούνταν αντιδιαιτητικοί παράγοντες, εξαιτίας των πιθανών αρνητικών επιδράσεών τους στην πρόσληψη, την πέψη και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών (Kumar & Singh, 1984), οι πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι συμπτυκνωμένες ταννίνες δεν έχουν αρνητική επίδραση στην πρόσληψη τροφής και την ημερήσια αύξηση βάρους των ζώων. Σύμφωνα με τους Méndez-Ortiz et al. (2018), μετά από μετα-ανάλυση που πραγματοποίησαν χρησιμοποιώντας πληροφορίες μόνο από πειράματα που συνέκριναν την απόδοση προβάτων που διατρέφονταν με CT, με ομάδες ελέγχου στις οποίες χορηγούνταν PEG, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι περιεχόμενες CT στην διατροφή των ζώων δεν επηρεάζουν αρνητικά την ημερήσια πρόσληψη τροφής στα πρόβατα. Οι περισσότερες μελέτες που καταλήγουν σε αντίθετα συμπεράσματα συγκρίνουν πρόβατα που καταναλώνουν ένα φυτό που περιέχει CT, με πρόβατα που καταναλώνουν ένα διαφορετικό φυτό (Wang et al., 1996; Ben Salem et al., 2005), αφήνοντας πάντα την αμφιβολία ότι αυτή η διαφορά μπορεί να προήλθε από τη διαφορετική χημική σύσταση των φυτών και τα διαφορετικά σιτηρέσια και όχι μόνο από τις CT.

Επιπλέον, μέχρι πρόσφατα, δίνονταν ελάχιστη προσοχή στους διαφορετικούς τύπους ταννινών, τη στιγμή που η πολυπλοκότητα της σύνθεσης των ταννινών είναι υψηλή και οι επιπτώσεις τους στην υγεία και την παραγωγή μπορεί να ποικίλουν ανάλογα:

- i) με το ποσοστό κατά το οποίο τα είδη που περιέχουν CT συμμετέχουν στο σιτηρέσιο του ζώου, και
- ii) με τις αλληλεπιδράσεις των CT με άλλα συστατικά της ζωοτροφής, τους ιστούς, τους ξενιστές, τα μικρόβια και τη φάση παραγωγής του ζώου, τις θρεπτικές απαιτήσεις και τη γενικότερη υγεία του (π.χ. παρασιτισμός) (Mueller-Harvey et al., 2019).

Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τη χρήση των ταννινών στη διατροφή των ζώων τα τελευταία χρόνια είναι ιδιαίτερα αυξημένο λόγω της βιοενεργούς δράσης που εμφανίζουν ενάντια στα παράσιτα. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές *in vivo* και *in vitro* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν κυρίως σε μικρά μηρυκαστικά και αξιολογούν την ανθελμινθική δράση φυτών που περιέχουν ταννίνες. Αυτές οι μελέτες εξέτασαν αρχικά ψυχανθή είδη (υπό μορφή

σανού, ενσιρώματος ή pellet), όπως η ονοβρυχίδα (Hoste et al., 2016; Legendre et al., 2018; Mueller-Harvey et al., 2019), η sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) (Burke et al., 2012a,b; Mechineni et al., 2014; Kommuru et al., 2014, 2015), και το ηδύσαρο/sulla (*Hedysarum coronarium*) (Niezen et al., 1995, 2002b). Αυξανόμενο ενδιαφέρον μάλιστα, παρουσιάζεται πρόσφατα για τα υποπροϊόντα από τις βιομηχανίες τροφίμων, που περιέχουν ταννίνες, όπως φαίνεται από μελέτες που αφορούν φλούδες φουντουκιών (*Corylus avellana*) (Desrues et al., 2012; Girard et al., 2013), καρπούς χαρουπιών (Manolaraki et al., 2010; Arroyo-Lopez et al., 2014) καθώς και φυτικά είδη που καταναλώνονται κατά τη βόσκηση, όπως η *Pistacia lentiscus* (Landau et al., 2010; Manolaraki et al., 2010), το *Quercus coccifera* (Manolaraki et al., 2010) και είδη *Salix* (Mupeyo et al., 2011).

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκαν *in vivo* οι επιδράσεις του χαρουπιού, που αντιπροσωπεύει μια κοινή πηγή τροφής για τα ζώα στην περιοχή της Μεσογείου και υπήρχαν ενδείξεις τόσο για τις ανθελμινθικές (Arroyo-Lopez et al., 2014), όσο και για τις αντικοκκιδιακές (Saratsis et al., 2016; Legendre et al., 2018) του ιδιότητες. Έτσι, εδώ εξετάστηκε η ανθελμινθική δράση υποπροϊόντων χαρουπιού (CaBP) έναντι δύο σημαντικών νηματωδών σε τρεις διαφορετικούς, αλλά συμπληρωματικούς πειραματισμούς. Με τον πρώτο πειραματισμό (**Πείραμα 1**) έγινε προσπάθεια να εντοπιστεί η βέλτιστη συγκέντρωση χαρουπιού στη διατροφή, ενώ με τον δεύτερο πειραματισμό (**Πείραμα 2**) και τη χορήγηση ενός αναστολέα ταννινών (PEG) (Waghorn, 2008), έγινε εκτίμηση του αν και κατά πόσο η δραστηριότητα αυτή οφείλονταν στις ταννίνες που περιέχονται στο χαρούπι. Τέλος, με τον τρίτο πειραματισμό (**Πείραμα 3**) εξετάστηκε η υπόθεση συνέργειας μεταξύ δυο φυτικών ειδών με διαφορετικούς τύπους ταννινών, δηλαδή του χαρουπιού με την ονοβρυχίδα. Κατά τη διάρκεια και των τριών πειραματισμών δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στη διασφάλιση ισορροπημένου και ελκυστικού σιτηρεσίου για όλα τα ζώα. Αυτό εξασφάλισε ότι οι μεταβολές στη βιολογία των παρασίτων δεν θα οφείλονταν σε διαφορές στη διατροφική σύνθεση, αλλά στη βιοδραστικότητα των ταννινών (Coop & Kyriazakis, 1999; Athanasiadou et al., 2008; Hoste et al., 2015).

Ο πειραματικός σχεδιασμός βασίστηκε σε πειραματική μόλυνση αρνιών με τα είδη *H. contortus* και *Tr. colubriformis*, τα οποία θεωρούνται δύο από τα πιο παθογόνα και συνηθέστερα γαστρεντερικά νηματώδη στις αίγες και τα πρόβατα (Charlier et al., 2017). Τα ζώα μολύνθηκαν και με τα δύο παρασιτικά είδη σε μία προσπάθεια προσομοίωσης των φυσικών μολύνσεων, καθώς τα ζώα στη φύση σπάνια μολύνονται μόνο από ένα είδος γαστρεντερικών παρασίτων. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι τα παρασιτικά αυτά είδη έχουν διαφορετική εντόπιση στο γαστρεντερικό σωλήνα (το *H. contortus* παρασιτεί στο ήνυστρο και

το *Tr. colubriiformis* το λεπτό έντερο), γεγονός που επηρεάζει το χρόνο έκθεσής τους στα βιοενεργά συστατικά των υπό μελέτη σιτηρεσίων, συνέβαλε στο να μελετηθούν και τυχόν διαφορές στην ανθελμινθική δράση λόγω του βαθμού έκθεσης (Desrues et al., 2017; Quijada et al., 2018).

Τα αποτελέσματα του **Πειράματος 1**, έδειξαν μειώσεις στις μέσες τιμές των αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων (FEC) και των ενήλικων παρασίτων (AWC), μόνο για τα ζώα της ομάδας όπου χορηγήθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση χαρουπιού (CaBP), παρόλο που δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Ωστόσο, υπήρξε αρνητική συσχέτιση των τιμών ωτοκίας των θηλυκών σε σχέση με τη συγκέντρωση CaBP στο σιτηρέσιο, υποδηλώνοντας δόσοεξαρτώμενη δράση. Η πιθανή ανθελμινθική δράση που παρουσιάζει το χαρούπι όταν χρησιμοποιείται σε ποσοστό 12% στο συνολικό σιτηρέσιο, φάνηκε να οφείλεται κυρίως στην παρεμπόδιση της ωτοκίας των θηλυκών παρασίτων (κυρίως του είδους *H. contortus*) και σε μικρότερο βαθμό στην εγκατάσταση και ανάπτυξη των ενήλικων ελμίνθων. Δεδομένου ότι τα παράσιτα του είδους *H. contortus* σημειώνουν ιδιαίτερα υψηλή ημερήσια παραγωγή αυγών σε σύγκριση με του *Tr. colubriiformis* (Besier et al., 2016), η μείωση των αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων (FEC) οφείλεται κυρίως στην επίδραση του χαρουπιού στα παράσιτα του είδους *H. contortus*. Γενικότερα λοιπόν, τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος φανερώνουν ότι όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του χαρουπιού στο σιτηρέσιο, τόσο υψηλότερη είναι και η ανθελμινθική του δράση. Δυστυχώς, υπάρχουν περιορισμοί στην ποσότητα του χαρουπιού, που μπορεί να συμμετέχει σε ένα ισορροπημένο σιτηρέσιο, καθώς οι λοβοί αυτού περιέχουν υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και χαμηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και λιπιδίων (Priolo et al., 1998; Karabulut et al., 2006).

Με το **Πείραμα 2**,

- i) επιβεβαιώθηκε η δράση του χαρουπιού στα αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων, τα οποία εμφάνισαν μειώσεις 20% έως 45% σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου,
- ii) φάνηκε ότι απαιτήθηκε χρονικό διάστημα τεσσάρων ημερών από την κατανάλωσή του, ώστε να παρατηρηθεί κάποια επίδραση στα αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων (FEC),
- iii) παρατηρήθηκε ότι οι εν λόγω μειώσεις οφείλονται στο είδος *H. contortus* (μείωση αριθμού παραγωγής αυγών για ένα πολύ παραγωγικό είδος) και όχι στο *Tr. colubriiformis*, ενώ δεν υπήρξε επίδραση του χαρουπιού στην ωτοκία των θηλυκών παρασίτων, και

- iv) η ανθελμινθική δράση του χαρουπιού αποδόθηκε στις CT, επειδή παρατηρήθηκε ότι η επίδραση του χαρουπιού στα FEC και τα ενήλικα *H. contortus* αναιρούνταν στις ομάδες ελέγχου (C, C+PEG, CaBP+PEG).

Το PEG είναι ένα μη θρεπτικό συνθετικό πολυμερές, ικανό να δεσμεύει και να αδρανοποιεί τις CT. Έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές διατροφικές μελέτες με στόχο την αύξηση πρόσληψης φυτών που περιέχουν CT και τη βελτίωση απορρόφησης πρωτεϊνών (Silanikove et al., 1996; Bermingham et al., 2001; Theodoridou et al., 2012). Αυτή η ιδιότητά του επίσης χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί εάν η ανθελμινθική δράση που παρατηρήθηκε σε *in vivo* πειραματισμούς συνδέεται με την παρουσία CT (Brunet et al., 2007; Brunet et al., 2008; Debela et al., 2012; Brito et al., 2018).

Ο στόχος του **Πειράματος 3**, ήταν να εξεταστούν δυο πολύ σημαντικές υποθέσεις. Αρχικά, ότι οι CT των χαρουπιών παρουσιάζουν ισχυρότερη ανθελμινθική δράση από αυτές της ονοβρυχίδας και έπειτα εάν είναι δυνατή η συνεργιστική δράση των δύο παραπάνω φυτικών ειδών. Το σκεπτικό πίσω από αυτές τις υποθέσεις είναι ότι τα δύο εν λόγω φυτικά είδη περιέχουν διαφορετικούς τύπους ταννινών και θα μπορούσαν να στοχεύουν σε διαφορετικά στάδια του βιολογικού κύκλου των γαστρεντερικών νηματωδών. Οι CT του χαρουπιού είναι προδελφινιδίνες με υψηλό ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ, ενώ αυτές της ονοβρυχίδας είναι μη εστεροποιημένες. Δύο δομικά χαρακτηριστικά των CT έχει αποδειχθεί ότι ενισχύουν ιδιαίτερα την *in vitro* ανθελμινθική δράση:

- i) οι προδελφινιδίνες είναι πιο δραστικές από τις προκυανιδίνες και
ii) η εστεροποίηση με γαλλικό οξύ αυξάνει την ανθελμινθική δράση των CT (Kommuru et al., 2014, 2015; Hoste et al., 2016).

Επομένως οι CT του χαρουπιού που έχουν υψηλό λόγο προδελφινιδίνες/προκυανιδίνες (96,7% προδελφινιδίνες/3,3% προκυανιδίνες), και ταυτόχρονα έχουν υψηλό βαθμό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (π.χ. 41,1% των υπομονάδων της φλαβαν-3όλης είναι εστεροποιημένες), θα μπορούσαν να παρουσιάζουν ισχυρότερη ανθελμινθική δράση από την ονοβρυχίδα, καθώς οι CT της ονοβρυχίδας έχουν λιγότερες προδελφινιδίνες (74,8%), που μάλιστα δεν είναι και εστεροποιημένες (**Πίνακας 5.3**). Υπάρχουν πολλοί λόγοι, οι οποίοι μπορούν να εξηγήσουν γιατί τα αποτελέσματα του πειράματος δεν υποστήριξαν καμία από τις παραπάνω υποθέσεις. Αρχικά, η ονοβρυχίδα χορηγήθηκε ως pellets και έχει αποδειχθεί στο παρελθόν ότι η διαδικασία αυτή έχει σημαντική επίδραση στις CT όσον αφορά την ανάλυσή τους (Mueller-Harvey et al., 2019). Αυτό φαίνεται και στον **Πίνακα 5.3.**, ο οποίος δείχνει ότι οι συγκεντρώσεις CT των pellets της ονοβρυχίδας διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δυο δοκιμών

(6,5 και 1,7 g CT / 100 g DW), σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του χαρουπάλευρου (5,8 και 7,2 g CT / 100 g DW). Ωστόσο, προς το παρόν δεν είναι γνωστό εάν η διαδικασία σύμπτυξης βελτιώνει ή όχι την ανθελμινθική δράση των CT.

Δεύτερον, οι μέχρι στιγμής περισσότερες προσπάθειες για να γίνουν κατανοητές οι σχέσεις μεταξύ των δομικών χαρακτηριστικών των CT και της ανθελμινθικής δράσης πραγματοποιήθηκαν με *in vitro* πειραματισμούς. Απαιτούνται όμως *in vivo* πειραματισμοί όπως οι παραπάνω, για να δοκιμαστούν τα εργαστηριακά δεδομένα. Είναι πιθανό να αποδειχθεί ότι οι εστέρες (εστεροποιημένες ομάδες) δεν παραμένουν σταθεροί στο πεπτικό σύστημα και ότι οι προδελφινιδίνες της ονοβρυχίδας και του χαρουπιού είναι οι δραστικές CT.

Τρίτον, είναι δυνατό οι CT του χαρουπιού και της ονοβρυχίδας να διαφέρουν και σε άλλα δομικά χαρακτηριστικά, όπως ο βαθμός πολυμερισμού και ο λόγος *cis/trans* των υπομονάδων φλαβανης-3όλης, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 5.3**. Ωστόσο, δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την πιθανή επίδρασή τους στην ανθελμινθική ικανότητα. Επομένως, τα προκαταρκτικά συμπεράσματα από τα δεδομένα του Πειράματος 3 θα μπορούσαν να είναι ότι η εστεροποίηση των CT με γαλλικό οξύ είναι απίθανο να ενισχύσει την ανθελμινθική τους δράση *in vivo*, όσον αφορά την ωοτοκία του *H. contortus* ή τον πληθυσμό των ενήλικων παρασίτων και τα pellets φυτών που περιέχουν CT μπορούν να οδηγήσουν σε χαμηλότερες τιμές FEC. Αυτές οι ενδείξεις όμως απαιτούν περαιτέρω πειραματισμούς στο μέλλον.

Οι θρεπτικές και ανθελμινθικές ιδιότητες της ονοβρυχίδας που χορηγείται είτε με άμεση βόσκηση, είτε ως σανός ή pellet, έχουν αξιολογηθεί στα αιγοπρόβατα, με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα όσον αφορά την ανθελμινθική δράση όταν δίνονται μόνα τους (Paolini et al., 2005; Heckendorn et al., 2006; Ríos-de Alvarez et al., 2008; Gaudin et al., 2016) ή σε συνδυασμό με άλλες πηγές CT (Girard et al., 2013). Σε αυτό το σημείο βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι η κατανάλωση ονοβρυχίδας υπό διαφορετικές μορφές κατανάλωσης, έχει συσχετιστεί με μείωση στα FEC και με επίδραση στην ωοτοκία των θηλυκών *H. contortus* (Manolaraki et al., 2010; Arroyo-Lopez et al., 2014) ή *Tr. colubriformis* (Manolaraki et al., 2010), αν και έχει παρατηρηθεί κάποια μεταβλητότητα στα αποτελέσματα (δηλαδή έλλειψη επιδράσεων) (Heckendorn et al., 2006). Το ζήτημα αυτό της μεταβλητότητας έχει εξεταστεί σε διάφορες ανασκοπήσεις (Hoste et al., 2015; Hoste & Niderkorn, 2019).

Με βάση τα τρέχοντα αποτελέσματα, πλήθος ερωτημάτων μπορούν να προκύψουν. Στο **Πείραμα 1** και το **Πείραμα 3**, τα διαφορετικά στάδια των πληθυσμών των παρασίτων εκτέθηκαν για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα (65 ημέρες) στο χαρούπι. Μάλιστα, δυο εβδομάδες πριν από την πειραματική μόλυνση είχε ξεκινήσει η πειραματική διατροφή και

έδειξε ότι οι κύριες σημαντικές επιδράσεις ήταν στην ωτοκία των θηλυκών και των δύο ειδών παρασίτων. Από την άλλη πλευρά, όταν το χαρούπι καταναλώθηκε για δυο εβδομάδες από ζώα που ήδη είχαν μολυνθεί με τα παράσιτα, το κύριο εύρημα ήταν μια σημαντική μείωση του αριθμού των ενηλίκων *H. contortus*. Τέλος, η παρούσα μελέτη ενισχύει την υπόθεση ότι το μεγαλύτερο μέρος της επίδρασης των CT σχετίζεται με παράσιτα που παρασιτούν στο ήνυστρο και όχι στη μεγάλη κοιλία και το λεπτό έντερο. Αυτό πιθανά, όπως φαίνεται ήδη σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για το παράσιτο *Ostertagia ostertagi* στα βοοειδή, οφείλεται στο υψηλότερο ποσοστό προδελφινιδίων (Desrués et al., 2016).

Συνοψίζοντας, τα κύρια αποτελέσματα αυτού του πειραματισμού ήταν:

- i) η επιβεβαίωση σημαντικών μειώσεων FEC λόγω τόσο της κατανάλωσης CaBP, όσο και του pellet ονοβρυχίδας,
- ii) η αύξηση της ανθελμινθικής δράσης της ονοβρυχίδας, αλλά όχι του χαρουπιού, και
- iii) η απουσία συνέργειας μεταξύ του χαρουπιού και της ονοβρυχίδας.

Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να εξηγηθούν από την σημαντική επίδραση στην ωτοκία των θηλυκών και των δυο παρασιτικών ειδών, όμως η δράση στους πληθυσμούς των παρασίτων είναι περιορισμένη. Για κανένα από τα δύο είδη παρασίτων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις στους ενήλικες έλμινθες (AWC), όμως τα ποσοστά μείωσης για το είδος *H. contortus* στις ομάδες CaBP, S, και CaBP+S σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ήταν αντίστοιχα 35,5%, 62,1% και 53,5%.

5.5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα αυτών των τριών *in vivo* πειραματισμών, που επικεντρώθηκαν στην κατανάλωση του χαρουπιού από τα ζώα, επιβεβαίωσαν ορισμένα προηγούμενα ευρήματα και έθεσαν μελλοντικά ερευνητικά ερωτήματα σχετικά με τί προκαλεί τις διαφορές στα αποτελέσματα, όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικές πηγές συμπυκνωμένων ταννινών και τι απαιτείται για μία πιο ορθολογική χρήση αυτών των πηγών ως ζωοτροφές σε διαφορετικά συστήματα εκτροφής (Hoste et al., 2015).

Τα αποτελέσματα της έρευνας επιβεβαιώνουν ότι:

- i) η κατανάλωση ζωοτροφών που περιέχουν συμπυκνωμένες ταννίνες επηρεάζει την βιολογία των γαστρεντερικών νηματωδών,
- ii) οι συμπυκνωμένες ταννίνες ευθύνονται για την ανθελμινθική δράση που παρουσιάζει το χαρούπι,
- iii) το ποσοστό συγκέντρωσης των συμπυκνωμένων ταννινών του χαρουπιού στο τελικό σιτηρέσιο επηρεάζει τον βαθμό της ανθελμινθικής τους δράσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί και για άλλα φυτά (ενδεικτικά τη *sericea lespedeza* (Shaik et al., 2004, 2006) και την ονοβρυχίδα (Brunet et al., 2007)) και
- iv) η μείωση του αριθμού των αυγών ανά γραμμάριο κοπράνων που παρατηρείται μετά από τη χορήγηση σιτηρεσίου πλούσιου σε συμπυκνωμένες ταννίνες είναι σύνθετο φαινόμενο και φαίνεται να οφείλεται σε διαφορετικούς μηχανισμούς όπως είναι η μειωμένη ωοτοκία των θηλυκών ενηλίκων ή/και η μείωση του αριθμού των ενήλικων παρασίτων.

Επίσης, οι τρεις αυτές μελέτες έδειξαν ότι η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων εξαρτάται από παράγοντες που σχετίζονται είτε με την εντόπιση του κάθε είδους παρασίτου στον γαστρεντερικό σωλήνα (ήνυστρο ή λεπτό έντερο) ή/και στην συγκεκριμένη περίπτωση με χημικό προφίλ των συμπυκνωμένων ταννινών αλλά και των άλλων πολυφαινολικών ενώσεων του κάθε φυτού (στην συγκεκριμένη περίπτωση, του χαρουπιού και της ονοβρυχίδας). Όπως μάλιστα αναφέρεται από τους Quijada (2015) και Desrues et al. (2016), οι ποσοτικές και οι ποιοτικές διαφορές των συμπυκνωμένων ταννινών μπορεί να επηρεάσουν την ανθελμινθική δράση ενάντια σε διαφορετικά είδη νηματωδών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

6.1. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα έρευνα, που αφορούσε στη διερεύνηση της ανθελμινθικής δράσης μεσογειακών φυτών πλούσιων σε δευτερογενείς μεταβολίτες έναντι των γαστρεντερικών νηματωδών (*Haemonchus contortus* και *Trichostrongylus colubriformis*) των μικρών μηρυκαστικών, προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- 1ον. Αρκετά από τα φυτικά είδη που μελετήθηκαν *in vitro*, εμφάνισαν, σε μικρό ή μεγάλο βαθμό, ανθελμινθική δράση, η οποία φαίνεται να οφείλεται στη δράση των ταννίνων που περιέχουν και συγκεκριμένα στην ιδιότητα αυτών να μπλοκάρουν τη εξέλιξη σταδίων των παρασίτων, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου. Όλα τα παραπάνω φυτά συναντώνται πολύ συχνά στη χώρα μας και αρκετά από αυτά αποτελούν ήδη συστατικά της διατροφής των μικρών μηρυκαστικών. Θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον λοιπόν, να διερευνηθεί περαιτέρω η ανθελμινθική δράση που καταγράψαμε, έτσι ώστε να εκμεταλλευτούμε με τον πιο ορθολογικό τρόπο τη βιοενεργή δράση των φυτών αυτών στη διατροφή των ζώων, ενσωματώνοντας τα στα σιτηρέσια με πιο συστηματικό τρόπο.
- 2ον. Ειδικά σε ότι αφορά τους καρπούς της χαρουπιάς, με βάση τα αποτελέσματα των μελετών που έγιναν στα ζώα, είμαστε σε θέση να επιβεβαιώσουμε ότι η προσθήκη τους στο σιτηρέσιο έχει τη δυνατότητα να μειώσει α) τον αριθμό των αυγών των παρασίτων που εκκρίνονται με τα κόπρανα των ζώων αλλά και β) τον αριθμό των ενήλικων παρασίτων που βρίσκονται στο γαστρεντερικό τους σωλήνα. Μειώνοντας τον αριθμό των ενήλικων παρασίτων, μειώνουμε την ένταση και τις συνέπειες του παρασιτισμού στα ζώα, ενώ με την μείωση του αριθμού των αυγών που εκκρίνονται από τα ζώα στο εξωτερικό περιβάλλον, επιτυγχάνεται έμμεσα και η μείωση της μόλυνσης στους λειμώνες. Ουσιαστικά δηλαδή προασπίζουμε την υγεία των ήδη μολυσμένων ζώων, ενώ ταυτόχρονα προστατεύουμε τα ζώα που βόσκουν στον ίδιο λειμώνα από τη μόλυνση. Επομένως, οι καρποί της χαρουπιάς όταν συμμετέχουν στο σιτηρέσιο των ζώων, πέρα από τη διατροφική τους αξία, ασκούν και ανθελμινθική δράση συμβάλλοντας, σε συνδυασμό με τη στρατηγική χορήγηση ανθελμινθικών φαρμάκων, σε μια πιο ολοκληρωμένη, αλλά και βιώσιμη αντιμετώπιση των παρασιτώσεων.

- 3ον. Η ανθελμινθική δράση της ονοβρυχίδας επιβεβαιώθηκε τόσο *in vitro* (όταν το εκχύλισμα της φάνηκε να διακόπτει τον βιολογικό κύκλο των παρασίτων κατά το στάδιο της προνύμφης γ' σταδίου), όσο και *in vivo* (όταν προστέθηκε στο σιτηρέσιο των προβάτων με τη μορφή pellet) επιδρώντας αρνητικά στην ωοτοκία των θηλυκών παρασίτων και μειώνοντας τον αριθμό των αυγών των παρασίτων που εκκρίνονται με τα κόπρανα στο εξωτερικό περιβάλλον. Σημαντικό είναι να τονίσουμε ότι για πρώτη φορά επιβεβαιώσαμε ότι ανθελμινθική δράση εκτός από το είδος *Onobrychis viciifolia*, το οποίο και καλλιεργείται ευρέως σε αρκετές ευρωπαϊκές χώρες, έχουν και ελληνικά αυτοφυή είδη ονοβρυχίδας όπως είναι η *On. alba subsp. laconica* και η *On. peloponnesiaca*. Θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον να διερευνηθεί η καλλιεργητική δυνατότητα των ειδών αυτών στην Ελλάδα, μιας και αποτελούν είδη που είναι προσαρμοσμένα στις ειδικές εδαφοκλιματολογικές συνθήκες της χώρας μας.
- 4ον. Παρόλο που και το χαρούπι και η ονοβρυχίδα παρουσίασαν ανθελμινθική δράση ξεχωριστά, όταν χορηγήθηκαν στα ζώα ταυτόχρονα δεν υπήρξαν σαφείς ενδείξεις συνεργιστικής δράσης.
- 5ον. Περαιτέρω διερεύνηση απαιτείται όσον αφορά α) τη στερεοχημική δομή των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών και β) τη δράση που μπορούν να παρουσιάσουν σε συνθήκες εκτροφής και κατόπιν φυσικής μόλυνσης, τόσο τα συγκεκριμένα φυτικά είδη, όσο και άλλα, τα οποία θα έχουν την δυνατότητα να δοθούν σαν ζωοτροφή ή σαν φυτοθεραπευτικό σκεύασμα στα μικρά μηρυκαστικά.

6.2. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής φαίνεται ότι η περαιτέρω διερεύνηση της ανθελμινθικής δράσης φυτών πλούσιων σε δευτερογενείς μεταβολίτες, είναι απαραίτητη. Προς αυτήν την κατεύθυνση, παρουσιάζονται οι παρακάτω προτάσεις:

- 1η. Η αξιοποίηση στην πράξη των βιοενεργών συστατικών των φυτών της Ελληνικής χλωρίδας μέσα από την ενσωμάτωσή τους στα σιτηρέσια των ζώων. Αυτό απαιτεί την ανάπτυξη νέων μεθόδων, που θα εξασφαλίζουν τη ποιότητα των χαρακτηριστικών τους, τον τρόπο ενσωμάτωσης και τη σωστή συντήρησή τους (π.χ. καλλιεργούμενες ζωοτροφές, συμμετοχή σε μίγματα, pellet, ενσίρωμα κ.α). Αυτό, μπορεί να επιτευχθεί με α) την διεπιστημονική έρευνα μεταξύ των γεωπόνων, κτηνιάτρων, λιβαδοπόνων, τεχνολόγων τροφίμων, βιοτεχνολόγων και χημικών μηχανικών, αλλά και β) τη συνεργασία των βιομηχανιών τροφίμων με τις βιομηχανίες ζωοτροφών.
- 2η. Στην παρούσα διατριβή η *in vitro* αποτελεσματικότητα των φυτικών ειδών ελέγχθηκε με τη δοκιμή της έκδυσης προνυμφών. Θα ήταν σημαντικό να επαναληφθούν οι *in vitro* πειραματισμοί, με δοκιμές που ελέγχουν αν διακόπτεται ή επηρεάζεται και σε κάποιο άλλο στάδιο ο βιολογικός κύκλος των παρασίτων (βλ. κεφάλαιο 2.2.7.2.1.1.) σε μία προσπάθεια να κατανοήσουμε το τρόπο που ασκείται η ανθελμινθική τους δράση.
- 3η. Παρόλο που με τους πειραματισμούς της συγκεκριμένης μελέτης δεν υπήρξαν σαφείς ενδείξεις συνεργιστικής δράσης του χαρουπιού με την ονοβρυχίδα, θεωρούμε ότι η έρευνα σε ότι αφορά τη συνδυαστική χρήση φυτών με διαφορετικό προφίλ ταννινών σε σχέση με την ανθελμινθική τους δράση θα πρέπει να συνεχιστεί.
- 4η. Τέλος, στην παρούσα διατριβή όπως και στην πλειοψηφία δημοσιευμένων εργασιών όλες οι δοκιμές γίνονται με στελέχη παρασίτων ευαίσθητων στα ανθελμινθικά φάρμακα. Θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να διερευνηθεί η δράση που πιθανά παρουσιάζουν τα φυτικά είδη πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες έναντι και ανθεκτικών στελεχών των παρασίτων στα φάρμακα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acamovic, T., Brooker, J.D. 2005. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. In: *Proceedings of the Nutrition Society*, 64: 403-412.
- Albers, G.A.A., Gray, G.D., Le, J.L.F., Piper, L.R., Barger, I.A., Barker, J.S.F. 1989. The effect of *Haemonchus contortus* on liveweight gain and wool growth in young merino sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 40(2): 419–432.
- Al Kalalkeh, M., Gibson, J., Lee, S.H., Gondro, C., van der Werf, J.H. 2019a. Detection of genomic regions underlying resistance to gastrointestinal parasites in Australian sheep. *Genetics Selection Evolution* 51: 37.
- Al Kalalkeh, M., Gibson, J., Duijvesteijn, N., Daetwyler, H.D., MacLeod, I., Moghaddar N., Lee, S.H., van der Werf J.H. 2019b. Using imputed whole-genome sequence data to improve the accuracy of genomic prediction for parasite resistance in Australian sheep. *Genetics Selection Evolution* 51: 32.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Capetillo-Leal, C.M. 2010. Polyphenolic compounds of nutraceutical trees and the variability of their biological activity measured by two methods. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12: 649–656.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H. 2011. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 181: 360–364.
- Alvarez-Sanchez, M.A., Garcia, J.P., Bartley, D., Jackson, F., RojoVazquez, F.A. 2005. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Experimental Parasitology* 10: 56-61.
- Amarante, A.F.T., Pomroy, W.E., Charleston, W.A.G., Leathwick, D.M., Tornero, M.T.T. 1997. Evaluation of a larval development assay for the detection of anthelmintic resistance in *Ostertagia circumcincta*. *International Journal for Parasitology* 27(3): 305–311.
- Amarante, A.D., Bricarello, P., Rocha, R., Gennari, S. 2004. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Veterinary Parasitology* 120:91–106.
- Appel, H.M. 1993. Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology*, 19: 1521-1552.
- Archimède, H., Eugène, M., Marie Magdeleine, C., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D. P., Lecomte, P., Doreau, M., 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology* 166: 59-64.

- Arco-Pérez, A., Ramos-Morales, E., Yáñez-Ruiz, D.R., Abecia, L., Martín-García, A.I. 2017. Nutritive evaluation and milk quality of including of tomato or olive by-products silages with sunflower oil in the diet of dairy goats. *Animal Feed Science and Technology* 232, 57–70.
- Arroyo-Lopez, C., Manolaraki, F., Saratsis, A., Saratsi, K., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Voutzourakis, N., Hoste, H., Sotiraki, S. 2014. Anthelmintic effect of carob pods and sainfoin hay when fed to lambs after experimental trickle infections with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Parasite* 21: 71. doi:10.1051/parasite/2014074
- Assefa, G., Sonder, K., Wink, M., Kijora, C., Steinmueller, N., Peters, K.J. 2008. Effect of variety and harvesting management on the concentration of tannins and alkaloids in tagasaste (*Chamaecytisus palmensis*). *Animal Feed Science and Technology* 144: 242–256. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.10.017
- Athanasiadou S., Kyriazakis I., Jackson F. and Coop R.L. 2000a. Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitised with *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology* 30: 1025-1033.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L. 2000b. Effects of short-term exposure to condensed tannins on adults *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Record* 146: 728-732.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L. 2001a. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *In vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology* 99: 205-219.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L. 2001b. The effects of condensed tannins supplementation of foods with different protein content on parasitism, food intake and performance of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *British Journal of Nutrition* 86: 697–706.
- Athanasiadou, S., Tzamaloukas, O., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L. 2005. Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against *Trichostrongylus colubriformis* in grazing sheep. *Veterinary Parasitology* 127: 233–243.
- Athanasiadou, S., Gray, D., Younie, D., Tzamaloukas, O., Jackson, F., Kyriazakis I. 2007. The ewes of chicory for parasite control in organic ewes and their lambs. *Parasitology* 134: 299-307.
- Athanasiadou, S., Houdijk, J., Kyriazakis, I. 2008. Exploiting synergisms and interactions in the nutritional approaches to parasite control in sheep production systems. *Small Ruminant Research* 76: 2–11.
- Atlija, M., Arranz, J.J., Martinez-Valladares, M., Gutiérrez-Gil, B. 2016. Detection and replication of QTL underlying resistance to gastrointestinal nematodes in adult sheep using the ovine 50K SNP array. *Genetics Selection Evolution* 48: 4. doi: 10.1186/s12711-016-0182-4.

- Azuhnwi, B.N., Boller, B., Dohme-Meier, F., Hess, H.D., Kreuzer, M., Stringano, E., Mueller-Harvey, I. 2013. Exploring variation in proanthocyanidin composition and content of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(9): 2102-2109.
- Bahuaud, D., De Montellano, C.M.O., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H. 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132: 545–554.
- Bairden, K., Armour, J., Ducan, J.L. 1995. A 4-year study on the effectiveness of alternate grazing of cattle and sheep in the control of bovine parasitic gastroenteritis. *Veterinary Parasitology*, 60: 119-132.
- Barda, B., Ianniello, D., Salvo, F., Sadutshang, T., Rinaldi, L., Cringoli, G., Burioni, R., Albonico, M. 2013a. Freezing parasites in pre-Himalayan region, Himachal Pradesh: experience with mini-FLOTAC. *Acta Tropica* 130: 11–16.
- Barda, B., Rinaldi, L., Ianniello, D., Zepherine, H., Salvo, F., Sadutshang, T., Cringoli, G., Clementi, M., Albonico, M. 2013b. Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7: e2344 doi: 10.1371/journal.pntd.0002344
- Barbehenn R.V., Constabel C.P. 2011. Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry* 72: 1551–1565.
- Barger, I.A., Benyon, P.R., Southcott, W.H. 1972 Simulation of pasture larval populations of *Haemonchus contortus*. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production* 9: 38-42.
- Barone, C.D., Zajac, A.M., Manzi-Smith, L.A., Howell, A.B., Reed, J.D., Krueger, C.G., Petersson, K.H. 2018. Anthelmintic efficacy of cranberry vine extracts on ovine *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 253:122-129.
- Barone, C.D., Zajac, A.M., Ferguson, S.M., Brown, N.R., Reed, J.D., Krueger, C.G., Petersson, K.H. 2019. *In vitro* screening of 51 birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.; Fabaceae) strains for anti-parasitic effects against *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 146: 828–836. doi:10.1017/S0031182018002214
- Barragry, T. 1984. Anthelmintics - A Review. *New Zealand Veterinary Journal* 32: 161-164.
- Barragry, T. 1987. A review of the pharmacology and clinical uses of ivermectin. *Canadian Veterinary Journal*, 28: 512-517.
- Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H. 2005. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology* 131: 531–538.
- Barry, T.N., Manley, T.R., 1986. Interrelationships between the concentrations of total condensed tannin, free condensed tannin and lignin in *Lotus* sp. and their possible consequences in ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37: 248–254. doi: 10.1002/jsfa.2740370309

- Barry, T.N. 1989. Condensed tannins their role in ruminant protein and carbohydrate digestion and possible effect upon the rumen ecosystem. In: Nolan J.V., Leng, R.A. and Demeyer, D.I. (eds) *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*, pp. 153–169. Armidale, NSW, Australia: Penambul Books.
- Barry T.N. and McNabb W.C. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition* 81: 263-272.
- Battle, I., Tous, J. 1997. Carob tree *Ceratonia siliqua* L. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops 17, Institute of plant genetics and crop plant research, Gatersleben/International Plant Genetics Resources Institute, Rome, Italy 23pp.
- Baynes RE, Martin-Jimenez T, Craigmill AL, and Riviere J.E. 1999. Estimating Provisional Acceptable Residues for Extralabel Drug Use in Livestock. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 29: 287-99
- Beh, K.J., Hulme, D.J., Callaghan, M.J., Leish, Z., Lenane, I., Windon, R.G., Maddox, J.F., 2002. A genome scan for quantitative trait loci affecting resistance to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Animal Genetics* 33, 97–106.
- Ben Salem, H., Nefzaoui, A., Makkar, H.P.S.P.S., Hochlef, H., Ben Salem, I., Ben Salem, L., 2005. Effect of early experience and adaptation period on voluntary intake, digestion, and growth in Barbarine lambs given tannin-containing (*Acacia cyanophylla* Lindl. foliage) or tannin-free (oaten hay) diets. *Animal Feed Science and Technology* 122(1-2): 59–77. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.04.014.
- Davies, G., Steer, M.J., Benothman, M., Abuagob, O., Kerr, A., Mitchell, S., Bishop, S.C. 2006. Quantitative trait loci associated with parasitic infection in Scottish blackface sheep. *Heredity*, 96: 252-258.
- Beraldi, D., McRae, A.F., Gratten, J., Pilkington, J.G., Slate, J., Visscher, P.M. 2007. Pemberton, J.M., Quantitative trait loci (QTL) mapping of resistance to strongyles and coccidia in the free-living Soay sheep (*Ovis aries*). *International Journal for Parasitology* 37, 121–129.
- Berendsen B., Stolker L., De Jong J, Nielen M., Tserendorj E., Sodnomdarjaa R., Cannavan A., Elliott C. 2010. Evidence of natural occurrence of the banned antibiotic chloramphenicol in herbs and grass. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397: 1955-63.
- Beriajaya, Copeman, D.B. 2006. *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in pen-trials with Javanese thin tail sheep and Kacang cross Etawah goats. *Veterinary Parasitology*, 135: 315-323.
- Bermingham, E.N., Hutchinson, K.J., Revell, D.K., Brookes, I.M., McNabb, W.C. 2001. The effect of condensed tannins in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on the digestion of amino acids in sheep. *New Zealand Society of Animal Production Proceedings* 61:116-119.

- Bernays, E.A., Driver G.C., Bilgener M. 1989. Herbivores and plant tannins. *Advances in Ecological Research* 19: 263-302.
- Besier, R.B. 2008. Targeted treatment strategies for sustainable worm control in small ruminants. *Tropical Biomedicine* 25, 9-17.
- Besier, R.B., Love, S.C.J. 2003. Anthelmintic resistance in sheep nematodes in Australia: the need for new approaches. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 43: 1383-1391.
- Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D., Van Wyk, J.A. 2016. Chapter four - the pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. In: Gasser, R., von Samson-Himmelstjerna, G. (Eds.), *Haemonchus contortus* and Haemonchosis - Past, Present and Future trends. *Advances in parasitology* 93: 95-143.
- Bishop, S.C., Morris, C.A. 2007. Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Ruminant Research* 70:48–59.
- Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J. 2000. Drug Residues and Public Health. In: Fletouris, D.J., Botsoglou, N.A. eds. *Drug Residues in Food Pharmacology: Food Safety, and Analysis*. *CRC Press* 269-98.
- Boxall A. Crane M, Corsing C, Eirkson C., Tait A. 2009. Uses and inputs of veterinary medicines in the environment In: Crane M, Boxall ABA, Barrett K. eds *Veterinary medicines in the environment*. *SETAC Press* 7-20.
- Bravo, L., Grades, N. & Saura-Calixto, F. 1994. composition and potential uses of mesquite pods (*Prosopis pallida* L.): Comparison with carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 65: 303–306. doi:10.1002/jsfa.2740650307
- Brito, D.R.B., Costa-Júnior, L.M., Garcia, J.L., Torres-Acosta, J.F.J., Louvandini, H., Cutrim-Júnior, J.A.A., Araújo, J.F.M., Soares, E.D.S. 2018. Supplementation with dry *Mimosa caesalpiniiifolia* leaves can reduce the *Haemonchus contortus* worm burden of goats. *Veterinary Parasitology* 252: 47–51.
- Britt, D.P. 1984. The administration of anthelmintic drugs. *Animal Technology* 35: 47-53.
- Brunet, S., Aufrere, J., El Babili, F., Fouraste, I., Hoste, H. 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology* 134(9): 1253-1262. doi:10.1017/S0031182007002533
- Brunet, S., Martinez-Ortiz de Montellano, C., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilar-Caballero, A. J., Capetillo-Leal, C., Hoste, H. 2008. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology* 157: 81–88. doi:10.1016/j.vetpar.2008.07.013

- Burke, J.M., Miller, J.E. Sustainable Approaches to Parasite Control in Ruminant Livestock. 2020. *Veterinary Clinics of North America Food and Animal Practice* 36(1):89-107. doi: 10.1016/j.cvfa.2019.11.007.
- Burke, J.M., Miller, J.E., Olcott, D.D., Olcott, B.M., Terrill, T. 2004. Effect of copper oxide wire particles dosage and feed supplement level on *Haemonchus contortus* infection in lambs. *Veterinary Parasitology*, 123: 235-243.
- Burke, J.M., Morrill, D., Miller, J.E. 2006. Control of gastrointestinal nematodes with copper oxide wire particles in a flock of lactating Polypay ewes and offspring in Iowa, USA. *Veterinary Parasitology*, 146: 372-375.
- Burke, J.M., Kaplan, R.M., Miller, J.E., Terrill, T.H., Getz, W.R., Mobini, S., Valencia, E., Williams, M.J., Williamson, L.H., Vatta, A. 2007a. Accuracy of the FAMACHA system for on-farm use by sheep and goat producers in the southeastern United States. *Veterinary Parasitology*, 147: 89-95.
- Burke, J.M., Terrill, T.H., Kallu, R.R., Miller, J.E., Mosjidis, J. 2007b. Use of copper oxide wire particles to control gastrointestinal nematodes in goats. *Journal of animal Science*, 85: 2763-2781.
- Burke, J.M., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Terrill, T.H. 2012a. Grazing sericea lespedeza for control of gastrointestinal nematodes in lambs. *Veterinary Parasitology* 186: 507-512.
- Burke, J.M., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Terrill, T.H. 2012b. Use of a mixed sericea lespedeza and grass pasture system for control of gastrointestinal nematodes in lambs and kids. *Veterinary Parasitology* 186: 328-336.
- Burrit, E.A., Provenza, F.D. 2000. Role of toxins in intake of varied diets by sheep. *Journal of Chemical Ecology* 26: 1991–2005.
- Butler, M.S. 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery *Journal of Natural Products* 67, 12: 2141-2153.
- Cabaret, J. 2004. Efficacy evaluation of anthelmintics: which methods to use in the field? *Parasitologia*, 46: 241-243.
- Callinan, A.P. and Arundel, J.H. 1982. Population dynamics of the parasitic stages of *Ostertagia* spp in sheep. *International Journal of Parasitology*, 12: 531-535.
- Campbell, W.C. 1985. Ivermectin: An update. *Parasitology Today* 1: 10–16. doi:10.1016/0169-4758(85)90100-0
- Canhão-Dias, M., Paz-Silva, A., Madeira de Carvalho, L.M. 2020. The efficacy of predatory fungi on the control of gastrointestinal parasites in domestic and wild animals - A systematic review. *Veterinary Parasitology* 283:109173. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109173.
- Castañeda-Ramírez, G.S., Torres-Acosta, J.F.J., Mendoza-de-Gives, P., Chan-Peírez, J.I., Tun-Garrido, J., Rosado-Aguilar, J.A., 2014. *In vitro* anthelmintic effect of the foliage from three plant species of the Annonaceae family against *Haemonchus contortus*. In: 13th International Congress of Parasitology, August 10–15, 2014. Mexico City, Mexico.

- Celaya, R., Ferreira, L.M.M., Moreno-Gonzalo, J., Frutos, P., Hervás, G., Ferre, I., García, U., Ortega-Mora, L.M., Osoro, K. 2010. Effects of heather and oat supplementation on gastrointestinal nematode infections and performance of grazing *Cashmere* goats. *Small Ruminant Research* 91: 186–192.
- Chandrawathani, P., Jamnah, O., Adnan, M., Waller, P.J., Larsen, M., Gillepsie, A.T. 2004. Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology*, 120: 177-187.
- Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P., Vercruysse, J. 2014. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends Parasitol.* 30: 361–367.
- Charlier, J., Thamsborg, S.M., Bartley, D.J., Skuce, P.J., Kenyon, F., Geurden, T., Hoste, H., Williams, A.R., Sotiraki, S., Höglund, J., Chartier, C., Geldhof, P., van Dijk, J., Rinaldi, L., Morgan, E.R., von Samson-Himmelstjerna, G., Vercruysse, J., Claerebout, E. 2018. Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs. *Transboundary and Emerging Diseases* 65: 217–234. doi:10.1111/tbed.12707
- Coadwell, W.J., Ward, P.F. 1982. The use of faecal egg counts for estimating worm burdens in sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 85: 251-256.
- Cobon, D.H. and O’Sullivan, B.M. 1992. Effect of *Haemonchus contortus* on productivity of ewes, lambs and weaners in a semiarid environment. *The Journal of Agricultural Science* 118: 245–248.
- Coles, G.C., Simpkin, K.G. 1977. Resistance of nematode eggs to the ovicidal activity of benzimidazoles. *Research in Veterinary Science* 22: 386–387.
- Coles, G.C., Rhodes, A.C., Wolstenholme, A.J. 2005. Rapid selection for ivermectin resistance in *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 129: 345-347.
- Conder, G. A. and Campbell, W.C. 1995. Chemotherapy of Nematode Infections of Veterinary Importance, with Special Reference to Drug Resistance. *Advances in Parasitology* 35: 1-84.
- Conn E.E. 1979. Cyanide and cyanogenic glycosides. In: Rosental G.A. and Janzen T.H. (eds). *Herbivores. Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. London: *Academic Press*. p. 387-412.
- Coop, R.L., Sykes, A.R., Angus, K.W. 1976. Subclinical trichostrongylosis in growing lambs produced by continuous larval dosing. The effect on performance and certain plasma constituents. *Research in Veterinary Science* 21: 253–258.
- Coop, R.L., Sykes, A.R., Angus, K.W. 1982. The effect of 3 levels of intake of *Ostertagia circumcincta* larvae on growth-rate, food-intake and body-composition of growing lambs. *The Journal of Agricultural Science* 98: 247–255.
- Coop, R. L., Kyriazakis, I. 1999. Nutrition-parasite interaction. *Veterinary Parasitology* 84: 187–204. doi:10.1016/S0304-4017(99)00070-9.

- Coop, R.L., Kyriazakis, I.K. 2001. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends in Parasitology* 17: 325–330.
- Crawford L., Kugler EG. 1986. Codex Committee on veterinary drug residues. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 6:381-4.
- Crawford, A.M., Paterson, K.A., Dodds, K.G., Tascon, C.D., Williamson, P.A., Thomson, M.R., Bisset, S.A., Beattie, A.E., Greer, G.J., Green, R.S., Wheeler, R., Shaw, R.J., Knowler, K., McEwan, J.C. 2006. Discovery of quantitative trait loci for resistance to parasitic nematode infection in sheep: I. Analysis of outcross pedigrees. *BMC Genomics* 7, 178.
- Cringoli, G. 2006. FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. *Parassitologia* 48: 381–384.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., Scala, A., 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology* 123: 121–131.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Mezzino, L., Vercruyssen, J., Jackson, F. 2009a. Evaluation of targeted selective treatments in sheep in Italy: Effects on faecal worm egg count and milk production in four case studies. *Veterinary Parasitology* 164: 36–43.
- Cringoli, G., Veneziano, V., Mezzino, L., Morgoglione, M., Pennacchio, S., Rinaldi, L., Salamina, V. 2009b. The effect of moxidectin 0.1% vs ivermectin 0,08% on milk production in sheep naturally infected by gastrointestinal nematodes. *BMC Veterinary Research* 5: 41.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Utzinger, J. 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols* 5: 503–515.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Albonico, M., Bergquist, R., Utzinger, J. 2013. Geospatial(s) tools: integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics. *Geospatial Health* 7: 399–404.
- Dawson, J.M., Buttery, P.J., Jenkins D., Wood C.D., Gill M. 1999. Effects of dietary *Quebracho* tannin on nutrient utilisation and tissue metabolism in sheep and rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1423-1430.
- Dekker, M. 2004. Phytochemicals in health and disease. *Free Radical Biology & Medicine* 37, 12:2082
- Demeler, J., Küttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzik, A., Varady, M., Kenyon, F., Coles, G., Höglund, J., Jackson, F., Vercruyssen, J., von Samson-Himmelstjerna, G. 2010. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastrointestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology* 174: 58-64.

- de la Chevrotière, C., Bishop, S.C., Arquet, R., Jacquiet, P., Mandonnet, N. 2012. Detection of quantitative trait loci for resistance to gastrointestinal nematode infections in Creole goats. *Animal Genetics* 43:768–775
- Debela, E., Tolera, A., Eik, L.O., Salte, R. 2012. Condensed tannins from *Sesbania sesban* and *Desmodium intortum* as a means of *Haemonchus contortus* control in goats. *Tropical Animal Health and Production* 44: 1939–1944.
- Desrues, O., Vargas-Magana, J., Manolaraki, F., Pardo, E., Girard, M., Mathieu, C., Vilarem, G., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Jean, H., Sampedro, R., Hoste, H. 2012. Can hazel-nut peels be used to control gastrointestinal nematodes in goats? In: *Book of abstracts, XI International Conference on Goats*. Gran Canaria, Spain, September 2012, pp 44.
- Desrues, O., Peña-Espinoza, M., Hansen, T.V., Mueller-Harvey, I., Enemark, H.L., Thamsborg, S.M. 2015. Anthelmintic effects of sainfoin against different cattle nematodes may be linked to concentration of condensed tannins in different gut compartments. In: *25th WAAVP Conference*. Liverpool, August 2015.
- Desrues, O., Fryganas, C., Ropiak, H.M., Mueller-Harvey, I., Enemark, H.L., Thamsborg, S.M. 2016. Impact of chemical structure of flavanol monomers and condensed tannins on *in vitro* anthelmintic activity against bovine nematodes. *Parasitology* 143: 444–454. doi:10.1017/S0031182015001912
- Desrues, O., Mueller-Harvey, I., Pellikaan, W.F., Enemark, H.L., Thamsborg, S.M., 2017. Condensed tannins in the gastrointestinal tract of cattle after sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) intake and their possible relationship with anthelmintic effects. *J. Agric. Food Chem.* 65, 1420-1427. doi:10.1021/acs.jafc.6b05830
- Dominik, S., 2005. Quantitative trait loci for internal nematode resistance in sheep: a review. *Genetics Selection Evolution* 37(1): 83-96
- Domke, A.V.M., Chartier, C., Gjerde, B., Leine, N., Vatn, S., Osteras, O., Stuen, S. 2011. Worm control practice against gastro-intestinal parasites in Norwegian sheep and goat flocks. *Acta Veterinaria Scandinavica* 53: 29. doi: 10.1186/1751-0147-53-29
- Dong G.Z., Wang X.J., Liu Z.B., Wang F. 2010. Effects of phytogenic products on *in vitro* rumen fermentation and methane emission in goats. *Journal of Animal and Feed Sciences* 19: 218–229.
- Eady, S.J., Woolaston, R.R., Barger, I.A. 2003. Comparison of genetic and nongenetic strategies for control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Livestock Production Science*, 81, 11-23.
- Edwards, N. J. 1999. A review of tannins and other secondary metabolites in the fodder shrub tagasaste (*Chamaecytisus proliferus*). In *Tannins in Livestock and Human Nutrition* (ed. Brooker, J. D.), pp. 160–164. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia

- Egwang, T.G., Slocombe, J.O. 1981. Efficiency and sensitivity of techniques for recovering nematode eggs from bovine feces. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 45: 243–248.
- Egwang, T.G., Slocombe, J.O. 1982. Evaluation of the Cornell-Wisconsin centrifugal flotation technique for recovering trichostrongylid eggs from bovine feces. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 46: 133–137.
- El-Makawy, A., Radwan, H.A., Ghaly, I.S., El-Raouf, A.A. 2006 Genotoxic, teratological and biochemical effects of anthelmintic drug oxfendazole Maximum Residue Limit (MRL) in male and female mice. *Reproduction Nutrition Development* 46:139-56.
- EMA/CVMP/ERA/430327/2009, 2011. Guideline on determining the fate of veterinary medicinal products in manure. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), 14 March 2011.
- FAO 2001. Pastoralism in the new millennium. FAO Animal Production and Health Paper (FAO), 150: 93
- Fekete S.G., Kellens, R.O. 2007. Interrelationship of feeding with immunity and parasitic infection: A review. *Veterinarni Medicina* 52: 131-143.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J.C. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 23: 4, 213-226.
- Frutos, P., Moreno-Gonzalo, J., Hervas, G., García, U., Ferreira, L.M., Celaya, R., Toral, P.G., Ortega-Mora, L.M., Ferre, I., Osoro, K. 2008. Is the anthelmintic effect of heather supplementation to grazing goats always accompanied by anti-nutritional effects? *Animal* 2: 1449-1456. doi:10.1017/S1751731108002681
- Gaudin, E., Simon, M., Quijada, J., Schelcher, F., Sutra, G.F., Lespine, A., Hoste, H. 2016. Efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multi resistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. *Veterinary Parasitology* 227: 122-129.
- Galicia-Aguilar, H.H., Rodríguez-González, L.A., Capetillo-Leal, C.M., Cámara-Sarmiento, R., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Torres-Acosta, J.F.J. 2012. Effect of *Havardia albicans* supplementation on feed consumption and dry matter digestibility of sheep and the biology of *Haemonchus contortus*. *Animal Feed Science and Technology* 176: 178–184.
- García-Rodríguez, J., Mateos, I., Saro, C., González, J.S., Carro, M.D., Ranilla, M.J. 2020. Replacing Forage by Crude Olive Cake in a Dairy Sheep Diet: Effects on Ruminal Fermentation and Microbial Populations in Rusitec Fermenters. *Animals*, 10: 2235. doi:10.3390/ani10122235
- Gauly, M. and Ebrahdt, G. 2001. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Rhön sheep following natural infection. *Veterinary Parasitology* 13: 253-259.

- Gavalchin, J., Katz, S. E. 1994. The persistence of fecal-borne antibiotics in soil. *Journal of AOAC International*, 77: 481-485. doi:10.1093/jaoac/77.2.481
- Gea, A., Stringano, E., Brown, R.H., Mueller-Harvey, I. 2011. *In situ* analysis and structural elucidation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) tannins for high-throughput germplasm screening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 495–503.
- Geary, T.G., Sims, S.M., Thomas, E.M., Vanover, L., Davis, J.P., Winterrowd, C.A., Klein, R.D., Ho, N.F.H., Thompson, D.P. 1993. *Haemonchus-contortus* – ivermectin-induced paralysis of the pharynx. *Experimental Parasitology* 77: 88–96.
- Gershenzon, J. 1984. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In B.N. Timmermann, C. Steelink and F.A. Loewus (Eds), *Phytochemical adaptations to stress*, Plenum, New York, 273-320 pp.
- Gershenzon, J. 2002. Secondary metabolites and plant defences. In: Taiz L. and Zeiger E. (eds). *Plant Physiology*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates. p. 283-308.
- Geurden, T., Hoste, H., Jacquiet, P., Traversa, D., Sotiraki, S., Frangipane di Regalbono, A., Tzanidakis, N., Kostopoulou, D., Gaillac, C., Privat, S., Giangaspero, A., Zanardello, C., Noé, L., Vanimisetti, B., Bartram D. 2014. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Veterinary Parasitology* 201(1-2): 59-66.
- Gill, J.H., Redwin, J.M., van Wyk, J.A., Lacey, E. 1991. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus-contortus*. *International Journal for Parasitology* 21: 771–776.
- Girard, M., Gaid, S., Mathieu, C., Vilarem, G., Gerfault, V., Gombault, P., Manolaraki, F., Hoste, H. 2013. Effects of different proportions of sainfoin pellets combined with hazel nut peels on infected lambs. In: *Book of abstracts of the 64th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science*. Nantes, 26-30th August 2013, pp.506
- Githigia, S.M., Thamsborg, S.M., Lasrsen, M., Kyvsgaard, N.C., Nansen, P. 1997. The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of lambs on pasture. *International Journal of Parasitology*, 27: 931-939.
- Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M. 2006 Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology* 31;139(4):308-20. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.04.021.
- Godber, O.F., Phythian, C.J., Bosco, A., Ianniello, D., Coles, G., Rinaldi, L., Cringoli, G. 2015 A comparison of the FECPAK and Mini-FLOTAC faecal egg counting techniques. *Veterinary Parasitology* 207: 342-345.
- Good, B., Hanrahan, J., Crowley, B., Mulcahy, G. 2006. Texel sheep are more resistant to natural nematode challenge than Suffolk sheep based on faecal egg count and nematode burden. *Veterinary Parasitology* 136:317– 327.
- Gordon, H.M., Whitlock, H.V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research* 12: 50–52.

- Grabber, J.H., Zeller, W.E., Mueller-Harvey, I. 2013. Acetone enhances the direct analysis of procyanidin- and prodelfphinidin-based condensed tannins in *Lotus* species by the butanol-HCl-iron assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 2669–2678.
- Grabber, J.H., Riday, H., Cassida, K.A., Griggs, T.C., Min, D.H., MacAdam, J.W. 2014. Yield, morphological characteristics, and chemical composition of European- and Mediterranean-derived birdsfoot trefoil cultivars grown in the colder continental United States. *Crop Science* 54(4): 1893–1901
- Greer, A.W., McKenzie, J.L., McAnulty, R.W., Huntley, J.F., McNeilly, T.N. 2018. Immune development and performance characteristics of Romney sheep selected for either resistance or resilience to gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 250: 60–67. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.12.013.
- Greer, A.W., Van Wyk, J.A., Hamie, J.C., Byaruhanga, C., Kenyon, F. 2020. Refugia-Based Strategies for Parasite Control in Livestock, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 36 (1):31-43
- Gruner, L., Bouix, J., Brunel, J.C. 2004 High genetic correlation between resistance to *Haemonchus contortus* and to *Trichostrongylus colubriformis* in INRA 401 sheep. *Veterinary Parasitology* 119: 51-58.
- Gudej, J., Tomczyk, M. 2004. Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus* L. species. *Archives of Pharmacal Research* 27: 1114–1119. doi: 10.1007/BF02975114
- Gunes, G., Liu, R.H., Watkins, C.B. 2002. Controlled-atmosphere effects on postharvest quality and antioxidant activity of cranberry fruits. *Journal of Agricultural and food Chemistry* 50(21): 5932-5938.
- Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow *Molecular aspects of medicine*, 27: 1-93.
- Gustavson, K.H. 1956. The Chemistry of Tanning Processes. Academic Press Inc., New York.
- Gutiérrez-Gil, B., Pérez, J., Álvarez, L., Martínez-Valladares, M., de la Fuente, L.F., Bayón, Y., Meana, A., San Primitivo, F., Rojo-Vázquez, F.A., Arranz, J.J. 2009. Quantitative trait loci for resistance to trichostrongylid infection in Spanish Churra sheep. *Genetics Selection Evolution* 41: 46
- Hadjigeorgiou I., Osoro K., Frago de Almeida, J.P., Molle G. 2005. Southern European grazing lands: production, environmental and landscape management aspects. *Livestock Production Science* 96: 51-59.
- Hagerman, A.E. and Butler, L.G., 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26: 809-812.
- Hamie, J.C., McAnulty, R.W., Logan, C.M., Lundberg, S., Greer, A.W. 2019. Comparison of the timing of development of immunity in Romney lambs from resistant and resilient selection lines. *Veterinary Parasitology* 270:49-55. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.04.014.

- Hammond, J.A., Fielding, D., Bishop, S.C. 1997. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Veterinary Research Communication*, 21: 213–228.
- Harborne, J.B. 1990. Constraints on the evolution of biochemical pathways. *Journal of the Linnean Society (Biology)*. 39: 135-151
- Harborne, J.B. 1998. *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, Chapman & Hall, 3rd edition, London: Academic Press, London. 4-7, 17, 20, 22, 41, 42, 60, 90-92.
- Harborne, J.B. and Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- Haslam E. 1979. Vegetable tannins. In Swain T, Harborne JB, Van Sumere CF (eds) Recent advances in phytochemistry: Biochemistry of plant polyphenolics, *Plenum Press (New York and London)* 12: 475-523.
- Haslam, E. 1986. Secondary metabolism – Fact and Fiction. *Natural Product Reports*
- Haslam, E. 1998. Practical polyphenolics: From structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Hayot Carbonero, C., Mueller-Harvey, I., Brown, T., Smith, L. 2011. Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*): a beneficial forage legume. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 9: 70-85. doi:10.1017/S1479262110000328
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H. 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Veterinary Parasitology* 142: 293–300.
- Henkel, T., Brunne, R.M., Muller, H., Reichel F. 1999. Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angewandte Chemie International Edition* 38: 5, 643-647.
- Hiraku Y, Sekine A., Nabeshi H., Midorikawa K., Murata M., Kumagai Y., Kawanishi S. 2004 Mechanism of carcinogenesis induced by a veterinary antimicrobial drug, nitrofurazone, via oxidative DNA damage and cell proliferation. *Cancer Letters* 215:141-50.
- Hoste H., Chartier, C. 1998 Response to challenge infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in dairy goats. Consequence on milk production. *Veterinary Parasitology* 74: 43-54.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J. 2011. Non chemical control of helminths in ruminants adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology* 180: 144–154.
- Hoste, H., Niderkorn, V. 2019. Sainfoin and chicory: using two model plants with bioactive compounds to tackle agroecological challenges in ruminant livestock farming. [Le sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) et la chicorée (*Cichorium intybus*): Deux modèles de plantes bioactives pour répondre aux défis agroécologiques en élevage de ruminants]. *Fourrages* 2019(238): 171-180.

- Hoste, H., Guitard, J.P., Pons, J.C. 2003. Paturage mixte entre ovins et bovines interekt dans la gestion des strongyloses gastro intestinalis. *Fourrages*, 176: 425-436.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J. F., Paolini, V., Aguilar-Caballero, A., Etter, E., Lefrileux, Y., Chartier, C. and Broqua, C. 2005. Interactions between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. *Small Ruminant Research* 60: 141–151.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology* 22: 253-261.
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A. 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology* 186: 18-27.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C. A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborg, S.M., Terrill, T.H. 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology* 212(1-2): 5–17.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Quijada, J., Chan-Perez, I., Dakheel, M.M., Kommuru, D.S., Mueller-Harvey, I., Terrill, T.H., 2016. Chapter seven - interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. In: Gasser, R., von Samson-Himmelstjerna, G. (Eds.), *Haemonchus contortus* and Haemonchosis-Past, Present and Future Trends. *Advances in Parasitology* 93: 239–351.
- Hubert, J., Kerboeuf, D. 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *The Veterinary Records* 130: 442–446.
- Hümmer, W., Schreier, P. 2008. Analysis of proanthocyanidins. *Molecular Nutrition & Food Research* 52: 1381–1398 doi:10.1002/mnfr.200700463
- Hussain, A., Khan, M.N., Iqbal, Z., Sajid, M.S., Khan, M.K. 2011. Anthelmintic activity of *Trianthema portulacastrum* L. and *Musa paradisiaca* L. against gastrointestinal nematodes of sheep. *Veterinary Parasitology* 179: 92–99.
- Hristov, A. N., Oh, J., Lee, C., Meinen, R., Montes, F., Ott, T., Firkins, J., Rotz, A., Dell, C., Adesogan, A., Yang, W., Tricarico, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Dijkstra, J., Oosting, S. 2013. Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production - A review of technical options for non-CO2 emissions, In: Gerber, P. J., Henderson, B., Makkar, H. P. S. (Eds.). *FAO Animal Production and Health Paper No. 177*. FAO, Rome, Italy.
- Jabalbarezi Hukerdi, Y., Fathi Nasri, M.H., Rashidi, L., Ganjkhanlou, M., Emami, A. 2020. Supplementing kids diet with olive leaves: Effect on meat quality. *Small Ruminant Research*, 193, 106258.
- Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M.N., Afaq, M. 2006. Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Science* 79: 2413-2431.

- Jackson, F. 2000. Options for the sustainable control of gastrointestinal nematode infections in goat production systems in Europe. In: Proceedings of the 7th International Conference on Goats, Tours, France, 15–21 May 2000, pp. 789–792.
- Jackson, F., Coop, R.L. 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120: 95-107.
- Jackson, F., Waller, P. 2008. Managing refugia. *Tropical Biomedicine* 25: 34-40.
- Jackson, F., Hoste, H. 2010. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: Vercoe, P.E., Makkar, H.P.S., Schlink, A.C. (Eds.), *In Vitro* Screening of Plant Resources for Extra Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies. FAO/IAEA Springer Edition, pp. 24–45.
- Jackson, F., Bartley, D., Bartley Y., Kenyon F. 2009. Worm control in sheep in the future. *Small Ruminant Research* 86: 40-45.
- Jackson, F., Varady, M., Bartley, D. J. 2012. Managing anthelmintic resistance in goats – can we learn lessons from sheep? *Small Ruminant Research* 103 (1): 3-9.
- Jacobs, C.T., Scholtz, C.H. 2015. A review on the effect of macrocyclic lactones on dung-dwelling insects: Toxicity of macrocyclic lactones to dung beetles. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 82(1): 858. doi: 10.4102/ojvr.v82i1.858.
- Kao, R.R., Leatherwick, D.M., Roberts, M.G., Sutherland, I.A. 2000. Nematode parasites of sheep: a survey of epidemiological parameters and their application in a simple model. *Parasitology* 121: 85-103.
- Kahn, L.P. and Diaz-Hernandez, A. 2000. Tannins with anthelmintic properties. In: Brooker, J.D. (Ed.), Tannins in livestock and Human Nutrition. ACIAR Proceedings No. 92 International Workshop. Adelaide, Australia, pp. 140–149
- Kahn, L.P., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L. 2000. Temporal effects of protein nutrition on the growth and immunity of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology* 30(2):193-205. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00192-7.
- Kahn, K.P., Knox, M.R., Walkden-Brown, S.W., Lea, J.M., 2003. Regulation of the resistance to nematode parasites of single and twin-bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. *Veterinary Parasitology*, 114, 15-31.
- Kambara, T., McFarlane, R.G., Abell, T.J., McAnulty, R.W., Sykes, A.R. 1993. The effect of age and dietary protein on immunity and resistance in lambs vaccinated with *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal of Parasitology*, 23: 471-476.
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N. 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 186(1-2): 70–78.
- Kaplan, R.M. 2020. Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Management of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Livestock, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 36(1): 17-30. doi: 10.1016/j.cvfa.2019.12.001

- Karabulut, A., Canbolat, O., Kamalak, A. 2006. Evaluation of carob, *Ceratonia siliqua* pods as a feed for sheep. *Livestock Research for Rural Development* 18: 104. doi: lrrd.org/lrrd18/7/kara18104.htm
- Keane, O. M., Keegan, J. D., Good, B., De Waal, T., Fanning, J., Gottstein, M., Casey, M., Hurley, C., Sheehan, M. 2014. High level of treatment failure with commonly used anthelmintics on Irish sheep farms, *Irish Veterinary Journal* 67: 16. doi: 10.1186/2046-0481-67-16
- Kenyon, F., Greer, A.W., Coles, G.C., Cringoli, G., Papadopoulos, E., Cabaret, J., Berrag, B., Varady, M., Van Wyk, J.A., Thomas, E., Vercruysse, J., Jackson, F. 2009. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology*, 164: 3-11.
- Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B., Kanner, J., Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods 1993. *Food Technology*, 47: 85-89.
- Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A.R., Williamson, E., Mueller-Harvey, I., Hoste, H. 2015. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 5: 127–134.
- Kloosterman, A., Albers, G. A. A., Van Den Brink, R. 1978. Genetic variation among calves in resistance to nematode parasites. *Veterinary Parasitology* 4: 353–368.
- Knox, M.R., Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A.J. 2006. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 139, 385-393.
- Kommuru, D.S., Barker, T., Desai, S., Burke, J.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Kamiseti, N., Terrill, T.H. 2014. Use of pelleted sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) for natural control of coccidia and gastrointestinal nematodes in weaned goats. *Veterinary Parasitology* 204: 191–198.
- Kommuru, D.S., Whitley, N.C., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Burke, J.M., Gujja, S., Mechineni, A., Terrill, T.H. 2015. Effect of sericea lespedeza leaf meal pellets on adult female *Haemonchus contortus* in goats. *Veterinary Parasitology* 207: 170-175.
- Koski, K.G. and Scott, M.E. 2003. Gastrointestinal nematodes, trace elements and immunity. *The Journal of Trace elements in Experimental Medicine*, 16: 237-251.
- Kotze, A.C., O’Grady, J., Emms, J., Toovey, A.F., Hughes, S., Jessop, P., Bennell, M., Vercoe, P.E., Revell, D.K. 2009. Exploring the anthelmintic properties of Australian native shrubs with respect to their potential role in livestock grazing systems. *Parasitology* 136(9): 1065-1080.
- Kozukue, N., Friedman, M. 2003. Tomatine, chlorophyll, β -carotene and lycopene content in tomatoes during growth and maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 195–200. doi: 10.1002/jsfa.1292

- Kumar, R., Singh, M., 1984. Tannins: Their Adverse Role in Ruminant Nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32: 447–453.
- Kyriazakis, I. and Houdijk, J. 2006. Immunonutrition: nutritional control of parasites. *Small Ruminant Research*, 62: 79-82.
- Landau, S., Azaizeh, H., Muklada, H., Glasser, T., Ungar, E.D., Baram, H., Abbas, N., Markovics, A. 2010. Anthelmintic activity of *Pistacia lentiscus* foliage in two Middle Eastern breeds of goats differing in their propensity to consume tannin-rich browse. *Veterinary Parasitology* 173: 280-286.
- Larsen, M. 2000. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology*, 120: 121-131.
- Le Jambre, L.F., Whitlock, J.H. 1976. Changes in the hatch rate of *Haemonchus contortus* eggs between geographic regions. *Parasitology*, 73: 233-238.
- Leathwick, D.M., Hosking, B.C., Bisset, S.A., McKay, C.H. 2009. Managing anthelmintic resistance: is it feasible in New Zealand to delay the emergence of resistance to a new anthelmintic class? *New Zealand Veterinary Journal*, 57: 181-192.
- Lee, H.S., Widmer, B.W. 1996. Phenolic compounds in *Handbook of Food Analysis*, Volume 1, L.M.L. Nollet (ed). Marcel Dekker, *New York*. 821-894.
- Legendre, H., Saratsi, K., Voutzourakis, N., Saratsis, A., Stefanakis, A., Gombault, P., Hoste, H., Gidenne, T., Sotiraki, S. 2018. Coccidiostatic effects of tannin-rich diets in rabbit production. *Parasitology Research* 117: 3705-3713. doi:10.1007/s00436-018-6069-2
- Legendre, H., Hoste, H., Gidenne, T. 2017. Nutritive value and anthelmintic effect of sainfoin pellets fed to experimentally infected growing rabbits. *Animal* 11(9): 1464-1471. doi: 10.1017/S1751731117000209
- Lionis, C., Faresjo, A., Skoula M., Kapsokefalou M., Faresjo T. 1998. Antioxidant effects of herbs in Crete, *Lancet* 352: 1987-1988
- Liu Y, Huang L., Wang Y, Yang B., Ishan A., Fang K., Peng D., Liu Z., Dai M., Yuan Z. 2010. Tissue depletion and concentration correlations between edible tissue and biological fluids of 3-Amino-2-oxazolidinone in pigs fed with a afurazolidone-medicated feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 6774-9.
- Loke, M.L., Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B., Tjørnelund, J. 2000. Stability of Tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. *Chemosphere* 40(7): 759-765. doi:10.1016/S0045-6535(99)00450-6.
- Luginbuhl, J.M., Glennon, H.M., Mueller, J.P. 2006. Effect of copper-oxide needles on gastrointestinal parasites in weanling meat goats control-grazed on bermudagrass pastures. *Journal of Animal Science*, 84: 21.
- Lumaret, J.P., Errouissi, F., Floate, K., Römbke, J., Wardhaugh, K. 2012. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 13(6): 1004-1060. doi: 10.2174/138920112800399257.

- Lyman, T.D., Provenza, F.D., Villalba, J.J. 2008. Sheep foraging behaviour in response to interactions among alkaloids, tannins and saponins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88(5): 824–831.
- Mabry, T.J. and Gill, J.E. 1979. Sesquiterpenes lactones and other terpenoids. In: Rosental G.A. and Janzen T.H. (eds). *Herbivores. Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. London: *Academic Press*. p. 501-537.
- MAFF, 1986. Ministry of agriculture, fisheries and food. *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
- Makkar, H.P. 2003. Quantification of tannins in tree and shrub foliages. *A Laboratory Manual Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy (FAO/IAEA)*, 49–53.
- Malešev, D., Kuntić, V. 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of The Serbian Chemical Society* 72(10): 921-939.
- Malisch, S.C., Lüscher, A., Baert, N., Engström, M.T., Studer, B., Fryganas, C., Suter, D., Mueller-Harvey, I., Salminen, J.P. 2015. Large variability of proanthocyanidin content and composition in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of Agricultural and food Chemistry* 63(47): 10234-10242.
- Manolaraki, F., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Volanis, M., Hoste, H. 2010. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 137: 685–696. doi:10.1017/S0031182009991399
- Maphosa, V., Masika, P.J. 2012a. *In vivo* validation of *Aloe ferox* (Mill). *Elephantorrhiza elephantina* Bruch. Skeels. and *Leonotis leonurus* (L) R. BR as potential anthelmintics and antiprotozoals against mixed infections of gastrointestinal nematodes in goats. *Parasitology Research* 110: 103–108.
- Maphosa, V., Masika, P.J. 2012b. The potential of *Elephantorrhiza elephantina* as an anthelmintic in goats. *Parasitology Research* 111: 881–888.
- Marais, J.P.J., Mueller-Harvey, I., Brandt, E.V., Ferreira, D. 2000. Polyphenols, condensed tannins, and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *J. Agric. Food Chem* 48: 3440-3447.
- Marakis, S. 1996. Carob bean in food and feed: current status and future potentials—a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology* 33: 365-383.
- Margaritis, E., Jones, M. 2008. Crop processing of *Olea europaea* L: an experimental approach for the interpretation of archaeobotanical olive remains. *Vegetation History and Archaeobotany* 17: 381–392.
- Marie-Magdeleine, C., Mahieu, M., Philibert, L., Despois, P., Archimède, H. 2010. Effect of cassava (*Manihot esculenta*) foliage on nutrition, parasite infection and growth of lambs. *Small Ruminant Research* 93: 10–18.

- Marley, C.L., Fraser, M.D., Davies, D.A., Rees, M.E., Vale, J.E., Forbes, A.B. 2006a. The effect of mixed or sequential grazing of cattle and sheep on the faecal egg counts and growth rates of weaned lambs when treated with anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, 142:134-141.
- Marley, C.L., Cook R., Barrett J. Keatinge R. and Lampkin N.H. 2006b. The effects of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) when compared with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on ovine gastrointestinal parasite development, survival and migration, *Veterinary Parasitology* 138: 280-90.
- Marriner, S. 1986. Anthelmintic drugs. *Veterinary Record*, 118: 181-184.
- Marshall, K., Maddox, J.F., Lee, S.H., Zhang, Y., Kahn, L., Graser, H.U., Gondro, C., Walkden-Brown, S.W., van der Werf, J.H.J. 2009. Genetic mapping of quantitative trait loci for resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Animal Genetics* 40(3): 262–272.
- Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E. 2008. Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 142: 317–329.
- Martínez-Ortíz-de Montellano, C., Vargas-Magãna, J.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Cob-Galera, L., May-Martínez, M., Miranda-Soberanis, R., Hoste, H., Cámara Sarmiento, R., Torres-Acosta, J.F. 2007. Combining the effects of supplementary feeding and copper oxide needles for the control of gastrointestinal nematodes in browsing goats. *Veterinary Parasitology* 146: 66-76.
- Martínez-Ortíz-De-Montellano, C., Vargas-Magãna, J.J., Canul-Ku, H.L., Miranda-Soberanis, R., Capetillo-Leal, C., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J. 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant, *Lysiloma latisiliquum*, on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology* 172: 283–290.
- Mathams, R. H. and Sutherland, A. K. 1952. The oxalate content of some Queensland pasture plants. *Queensland Journal of Agricultural Science* 9: 317–334.
- Matika, O., Pong-Wong, R., Woolliam, J.A., Bishop, S.C. 2011. Confirmation of two quantitative trait loci regions for nematode resistance in commercial British terminal sire breeds. *Animal* 5, 1149–1156.
- McKellar, Q.A. 1997. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology* 72: 413-435.
- Mechineni, A., Kommuru, D.S., Gujja, S., Mosjidis, J.A., Miller, J.E., Burke, J.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Kannan, G., Lee, J.H., Kouakou, B., Terrill, T.H. 2014. Effect of fall-grazed sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) on gastrointestinal nematode infections of growing goats. *Veterinary Parasitology* 204: 221–228.
- Méndez-Ortiz, F.A., Sandoval-Castro, C.A., Ventura-Cordero, J., Sarmiento-Franco, L.A., Torres-Acosta, J.F.J. 2018. Condensed tannin intake and sheep performance: a meta-analysis on voluntary intake and live weight change. *Animal Feed Science and Technology* 245: 67-76.

- Milgate J. and Roberts D.C.K. 1995. The nutritional and biological significance of saponins. *Nutrition Research* 15: 1223-1249.
- Min, B.R., Hart, S.P. 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science* 81: 102-109.
- Min, B.R., Barry, T.N. Attwood, G.T., McNabb, W.C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology* 106(1-4): 3-19.
- Min, B.R., Hart, S.P., Miller, D., Tomita, G.M., Loetz, E., Sahlu, T. 2005. The effect of grazing forage containing condensed tannins on gastrointestinal parasite infection and milk composition in Angora does. *Veterinary Parasitology* 130: 105–113.
- Mittermeier, R.A., Robles Gil, P., Hoffman, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Goettsch Mittermeier, C., Lamoreux, J., da Fonseca, G.A.B. 2004. Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Threatened Terrestrial Ecoregions. Conservation International, Washington, D.C., USA. 390 pp.
- Molan A.L., Hoskin S.O., Barry T.N., McNabb W.C. 2000. Effect of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes, *Veterinary Record* 147: 44-48.
- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S. 2003a. Effect of flavan-3-ols *in vitro* hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology* 33: 1691–1698.
- Molan, A.L., Duncan, A., Barry, T.N., McNabb, W.C. 2003c. Effects of condensed tannins and sesquiterpene lactones extracted from chicory on the viability of deer lungworm larvae. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 60: 26-29.
- Molan, A.L., Sivakumaran, S., Spencer, P.A., Meagher, L.P. 2004. Green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins inhibit the motility of infective larvae of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*. *Research in Veterinary Science* 77: 239–243.
- Mole, S., Rogler, J.C., Morell, C.J., Butler, L.G. 1990. Herbivore growth reduction by tannins: Use of Waldbauer ratio technique and manipulation of salivary protein production to elucidate mechanisms of action, *Biochemical Systematics and Ecology* 18: 183-197.
- Molina-Alcaide, E., Yáñez-Ruiz, D.R. 2008. Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. *Animal Feed Science and Technology* 147(1-3): 247-264.
- Montmollin, B. de and Strahm, W. (Eds). 2007. Τα 50 Κορυφαία (TOP 50) Φυτά των Νησιών της Μεσογείου: Άγρια φυτά στο χείλος της εξαφάνισης - τι χρειάζεται να γίνει για να σωθούν. IUCN/SSC *Mediterranean Islands Plant Specialist Group*. IUCN, Gland, Switzerland. x + 110 pp.
- Moreno, F.C., Gordon, I.J., Knox, M.R., Summe, P.M., Skerrat, L.F., Benvenuti, M.A., Saumell, C.A. 2012. Anthelmintic efficacy of five tropical native Australian plants

- against *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in experimentally infected goats (*Capra hircus*). *Veterinary Parasitology* 187:237–243.
- Moreno-Gonzalo, J., Ferre, I., Celaya, R., Frutos, P., Ferreira, L.M.M., Hervás, G., García, U., Ortega-Mora, L.M., Osoro, K. 2012. Potential use of heather to control gastrointestinal nematodes in goats. *Small Ruminant Research* 103: 60–68.
- Moreno-Gonzalo, J., Manolaraki, F., Frutos, P., Hervas, G., Celaya, R., Osoro, K., Ortega-Mora, L.M., Hoste, H., Ferre, I. 2013a. *In vitro* effect of heather (Ericaceae) extracts on different stages of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 197: 235-243.
- Moreno-Gonzalo, J., Manolaraki, F., Frutos, P., Hervas, G., Celaya, R., Osoro, K., Ortega-Mora, L.M., Hoste, H., Ferre, I. 2013b. *In vitro* effect of heather extracts on *Trichostrongylus colubriformis* eggs, larvae and adults. *Veterinary Parasitology* 197: 586-594.
- Moreno-Gonzalo, J., Osoro, K., Garcia, U., Frutos, P., Celaya, R., Ferreira, L.M.M., Ortega-Mora, L.M., Ferre, I. 2014. Anthelmintic effect of heather in goats experimentally infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Parasitology Research* 113: 693-699.
- Morgan E.R., van Dijk, J. 2012. Climate and the epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe. *Veterinary Parasitology* 189: 8-14.
- Morgan, E. R., Aziz, N. A., Blanchard, A., Charlier, J., Charvet, C., Claerebout, E., Geldhof, P., Greer, A. W., Hertzberg, H., Hodgkinson, J., Höglund, J., Hoste, H., Kaplan, R. M., Martínez-Valladares, M., Mitchell, S., Ploeger, H. W., Rinaldi, L., von Samson-Himmelstjerna, G., Sotiraki, S., Schnyder, M., Skuce, P., Bartley, D., Kenyon, F., Thamsborg, S.M., Rose Vineer, H., de Waal, T. Williams, A.R., van Wyk J.A., Vercruyse, J. 2019. 100 Questions in Livestock Helminthology Research. *Trends in Parasitology* 35(1): 52–71.
- Mothes, K. 1955. Physiology of alkaloids. *Annual Review of Plant Physiology* 6: 393-432.
- Moure, A., Cruz J.M., Franco d., Manuel Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J., Carlos Parajó, J. 2001. Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, 72: 145-171.
- Moussavou-Boussougou, M.N., Silvestre, A., Cortet, J., Sauve, C., Cabaret, J. 2007. Substitution of benzimidazole-resistant nematodes for susceptible nematodes in grazing lambs. *Parasitology* 134: 553-560.
- Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(13): 2010–2037.
- Mueller-Harvey, I., Bee, G., Dohme-Meier, F., Hoste, H., Karonen, M., Kolliker, R., Lüscher, A., Niderkorn, V., Pellikaan, W.F., Salminen, J.P., Skot, L., Smith, L.M.J., Thamsborg, S.M., Totterdell, P., Wilkinson, I., Williams, A.R., Azuhnwi, B.N., Baert, N., Grosse Brinkhaus A., Copani, G., Desrues, O., Drake, C., Engstrom, M., Fryganas, C., Girard, M., Huyen, N.T., Kempf, K., Malisch, C., Mora-Ortiz, M., Quijada, J., Ramsay, A., Ropiak, H.M., Waghorn, G.C. 2019. Benefits of condensed tannins in forage legumes

- fed to ruminants: importance of structure, concentration and diet composition. *Crop Science* 59: 861-885.
- Mugambi, J., Wanyangu, S., Bain, R., Owango, M., Duncan, J., Steer, M. 1996. Response of Dorper and Red Maasai lambs to trickle *Haemonchus contortus* infections. *Research in Veterinary Science* 61:218–221.
- Mupeyo, B., Barry, T.N., Pomroy, W.E., Ramírez-Restrepo, C. A., López-Villalobos, N., Pernthaler, A. 2011. Effects of feeding willow (*Salix* spp.) upon death of established parasites and parasite fecundity. *Animal Feed Science and Technology* 164(1-2): 8–20.
- Naczki, M., Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054(1-2): 95-111.
- Naczki, M., Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(5): 1523-1542.
- Nair, R.M., Whittall, A., Revell, D.K., Dowling, K., Hughes, S., Craig, A.D., Auricht, G.C. 2006. Effect of defoliation stress on 2-hydroxy cinnamic acid content at different growth stages in *Melilotus albus*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 46: 1601–1603. doi: 10.1071/EA05284
- Ncube, N.S., Afolayan, A.J., Okoh, A.I. 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Afr J Biotech.* 7(12): 1797-1806.
- Nery, P.S., Nogueira, F.A., Oliveira, N.J., Martins, E.R., Duarte, E.R. 2012. Efficacy of extracts of immature mango on ovine gastrointestinal nematodes. *Parasitology Research* 111: 2467–2471.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70: 461.
- Nicholls, J., Obendorf, D.L. 1994. Application of a composite faecal egg count procedure in diagnostic parasitology. *Veterinary Parasitology* 52: 337–342.
- Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Charleston, W.A.G., Waghorn, G.C. 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *The Journal of Agricultural Science* 125: 281–289.
- Niezen, J.H., Robertson, H.A., Waghorn, G.C., Charleston, W.A. 1998a. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Veterinary Parasitology*, 80: 25-27.
- Niezen, J.H., Waghorn G.C., Charleston W.A.G. 1998b Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in lambs fed lotus (*Lotus pedunculatus*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Veterinary Parasitology* 78: 13-21.

- Niezen, J.H., Charleston W.A.G., Hodgson, J., Miller, C.M., Waghorn, T.S., Robertson, H.A. 1998c. Effect of plant species on the larvae of gastrointestinal nematodes which parasitise sheep. *International Journal for Parasitology* 28: 791-803.
- Niezen, J.H., Robertson, H.A., Sidey, A., Wilson, S.R. 2002a. The effect of pasture species on parasitism and performance of lambs grazing one of the tree grass-white clover pasture swards. *Veterinary Parasitology*, 105, 305-315.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Robertson, H.A., Shelton, D., Waghorn, G.C., Green, R. 2002b. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 105: 229–245.
- Niezen, J.H., Waghorn, G.C., Graham, T., Carter, J.L., Leathwick, D.M. 2002c. The effect of diet fed to lambs on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae in vitro and on pasture. *Veterinary Parasitology* 105: 269–283.
- Novobilský, A., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M. 2011. Condensed tannins act against cattle nematodes. *Veterinary Parasitology* 182(2-4): 213–20.
- Novobilsky, A., Stringano, E., Hayot Carbonero, C., Smith, L.M.J., Enemark, H.L., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M. 2013. *In vitro* effects of extracts and purified tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against two cattle nematodes. *Veterinary Parasitology* 196: 532-537.
- NRC (National Research Council) 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Washington: The National Academies Press.
- O' Connor, L., Stephen, W., Brown, W.W. 2006. Ecology of the free living stages of major Trichostrongyloid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology* 142: 1-15.
- O'Grady, J., Kotze, A.C. 2004. *Haemonchus contortus*: *in vitro* drug screening assays with the adult life stage. *Experimental Parasitology* 106 (3–4): 164–172.
- Oleszek, W. 2003. Dietary phytochemicals and human health. *Phytochemistry Reviews*, 1: 163–166.
- Olson, D. & Dinnerstein, E. 1998. The Global 200: A representative approach to conserving the Earth's most biologically valuable ecoregions. *Conservation Biology* 12: 502-515
- Olson, M.M., Roseland, C.R. 1991. Induction of the coumarins Scopoletin and ayapin in sunflower by insect-feeding stress and effects of coumarins on the feeding of sunflower beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology* 20: 1166–1172. doi: 10.1093/ee/20.4.1166
- Osoro, K., Celaya, R., Moreno-Gonzalo, J., Ferreira, L.M.M., García, U., Frutos, P., Ortega-Mora, L.M., Ferre, I. 2009. Effects of stocking rate and heather supplementation on gastrointestinal nematode infections and host performance in naturally-infected Cashmere goats. *Rangeland Ecology & Management* 62: 127–135.
- Paech, K. 1950. Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. Springer, Berlin Heidelberg.

- Paolini, V., Frayssines, A., De La Farge, F., Dorchies, P., Hoste, H. 2003. Effects of condensed tannins on established populations and oncoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Veterinary Research* 34: 331–339.
- Paolini, V., Fouraste, I., Hoste, H. 2004. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on 3rd-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology* 129: 69–77.
- Paolini, V., De La Farge, F., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H. 2005. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 127: 277–283.
- Papachristou, T.G., Dziba, L.E., Provenza, F.D. 2005. Foraging ecology of goats and sheep on wooded rangelands. *Small Ruminant Research* 59: 141-156.
- Parr, A.J. and Boldwell, G.P. 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 985-1012.
- Peña, M.T., Miller, J.E., Fontenot, M.E., Gillespie, A., Larsen, M. 2002. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in feces of sheep. *Veterinary Parasitology* 103, 259-265.
- Perry, B.D., Randolph, T.F. 1999. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Veterinary Parasitology* 84: 145-168.
- Pickering, N.K., Dodds, K.G., Blair, H.T., Hickson, R.E., Johnson, P.L., McEwan, J.C. 2012. Genetic parameters for production traits in New Zealand dual-purpose sheep, with an emphasis on dagginess. *Journal of Animal Science* 90:1411–1420.
- Piluzza G., Sulas, L., Bullita, S. 2014. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass and Forage Science* 69: 32-48.
- Phelan, P., Morgan, E.R., Rose, R., Grant, J., O' Kiely, P. 2015. Predictions of future grazing season length for European dairy, beef and sheep farms based on regression with bioclimatic variables. *Journal of Agricultural Science* 154:765-781
- Plants of the world online. 2020. [online] Διαθέσιμο στο: <http://www.plantsoftheworldonline.org/> [ανάκτηση 15/04/2020].
- Pokorný, J. 1991. Natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science Technology*, 9: 223-227.
- Preston, S.J.M., Sandeman, M., Gonzalez, J., Piedrafita, D. 2014. Current Status for Gastrointestinal Nematode Diagnosis in Small Ruminants: Where Are We and Where Are We Going? *Journal of Immunology Research* Article ID 210350: 12 pages.

- Priolo, A., Lanza, M., Biondi, L., Pappalardo, P., Young, O.A. 1998. Effect of partially replacing dietary barley with 20 % carob pulp on post- weaning growth, and carcass and meat characteristics of Comisana lambs. *Meat Science* 50: 355–363.
- Priolo, A., Waghorn, G.C., Lanza, M., Biondi, L., Pennisi P. 2000. Polyethylene glycol as a means to reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: effect on lamb growth and meat quality. *Journal of Animal Science* 78: 810-816.
- Priolo, A., Lanza, M., Bella, M., Pennisi, P., Fasone, V., Biondi, L. 2002. Reducing the impact of condensed tannins in a diet based on carob pulp using two levels of polyethylene glycol: lamb growth, digestion and meat quality. *Animal Research* 51: 305-313.
- Quijada, J. 2015. Relation structure/activité De Tanins Bioactifs Contre Les Nématodes Gastrointestinaux (*Haemonchus contortus*) Parasites Des Petits Ruminants. Doctorat de l'Université de Toulouse 235pp.
- Quijada, J., Fryganas, C., Ropiak, H.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Hoste, H. 2015. Anthelmintic activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 6346–6354. doi:10.1021/acs.jafc.5b00831
- Quijada, J., Drake, C., Gaudin, E., El-Korso, R., Hoste, H., Mueller-Harvey, I. 2018. Condensed tannin changes along the digestive tract in lambs fed with sainfoin pellets or hazelnut skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66: 2136-2142.
- Rabel, B., McGregor, R., Douch, P.G.C. 1994. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *International Journal for Parasitology* 24: 671–676.
- Ramsay, A., Williams, A.R., Thamsborg, S.M., Mueller-Harvey, I. 2016. Galloylated proanthocyanidins from shea (*Vitellaria paradoxa*) meal have potent anthelmintic activity against *Ascaris suum*. *Phytochemistry* 122: 146–153. doi:10.1016/j.phytochem.2015.12.005.
- Rang H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. 1999. Pharmacology, 4th Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Rashid, M.H., Stevenson, M.A., Waenga, S., Mirams, G., Campbell, A.J.D., Vaughan, J.L., Jabbar, A. 2018. Comparison of McMaster and FECPAK^{G2} methods for counting nematode eggs in the faeces of alpacas. *Parasites and Vectors* 11, 10–13.
- 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* 45(3): 321-342.
- Roeber F, Morrison A, Casaert S, Smith L, Claerebout E, Skuce P. 2017. Multiplexed-tandem PCR for the specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in sheep: an European validation study. *Parasites and Vectors* 8;10(1):226.

- Rochfort, S., Parker, J.A., Dunshea, R.F. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* 69: 299-322.
- Reed, J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science* 73: 1516-1528.
- Ribéreau-Gayon P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. 2000. Handbook of Enology, Vol. 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2: 152-159
- Rinaldi, L., Levecke, B., Bosco, A., Ianniello, D., Pepe, P., Charlier, J., Cringoli, G., Vercruysse, J. 2014. Comparison of individual and pooled faecal samples in sheep for the assessment of gastrointestinal strongyle infection intensity and anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC. *Veterinary Parasitology* 205: 216–223.
- Rinaldi, L., Coles, G.C., Maurelli, M.P., Musella, V., Cringoli, G. 2011. Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Veterinary Parasitology* 177, 345–352.
- Ríos-de Alvarez, L., Greer, A.W., Jackson, F., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Huntley, J.F. 2008. The effect of dietary sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on local cellular responses to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Parasitology* 135: 1117–1124.
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Garcia, P., Lefebvre, L.R., Sanchez, E., Romero, L. 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*, 160: 315-321.
- Riviere, J.E., Papich, M.G., 2009. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 9th edition. Wiley-Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Robbins, R.J. 2003. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2866-2887.
- Robbins, C.T., Hagerman, A.E., Austin, P.J., McArthur, C. and Hanley, T.A. 1991. Variation in mammalian physiological responses to a condensed tannin and its ecological implications. *Journal of Mammalogy* 72: 480-486.
- Roepstorff, A., Nansen, P. 1998. Epidemiology Diagnosis and Control of Helminth Parasites of Swine. FAO Animal Health Manual Rome, 51-56pp.
- Ropiak, H.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I. 2016. Condensed tannins in extracts from European medicinal plants and herbal products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 121: 225–231.
- Roy, R.M. and Sukhla, S.S. 2003. Oxyclozanide-activity against *Fasciola gigantica* in naturally infected buffalo, cattle, sheep and goats. *Tropical Animal Health and Production*, 3: 26-31.
- Rugini, E. 1986. *Olive (Olea europaea L.)*. In: Y.P.S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 1. Trees I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 253-267.

- Ryan, D., Robards, K., Prenzler, P., Antolovich, M. 1999a. Applications of mass spectrometry to plant phenols. *Trends in Analytical Chemistry* 18: 362-372.
- Ryan, D., Robards, K., Lavee, S. 1999b. Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science & Technology* 34: 265–274. doi: 10.1046/j.1365-2621.1999.00261.x
- Safari, E., Fogarty, N.M., Gilmour, A.R. 2005. A review of genetic parameter estimates for wool, growth, meat and reproduction on traits in sheep. *Livestock Production Science* 92(3) :271–289.
- Sager, H., Hosking, B., Bapst, B., Stein, P., Vanhoff, K., Kaminsky, R. 2009. Efficacy of the amino-acetonitrile derivative, monepantel, against experimental and natural adult stage gastro-intestinal nematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology* 159: 49-54.
- Salem, A.F.Z.M., 2007. Corrigendum to “Impact of season of harvest on *in vitro* gas production and dry matter degradability of *Acacia saligna* leaves with inoculum from three ruminant species” [*Animal Feed Science and Technology* 123-124 (2005) 67-79] (doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.04.042). *Animal Feed Science and Technology* 134: 180. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.10.008
- Salle, G., Jacquet, P., Gruner, L., Cortet, J., Sauve, C., Preuvot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.P., Schibler, L., Tircazes, A., Francois, D., Pery, C., Bouvier, F., Thouly, J.C., Brunel, J.C., Legarra, A., Elsen, J.M., Bouix, J., Rupp, R., Moreno, C.R. 2012. A genome scan for QTL affecting resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. *Journal of Animal Science* 90: 4690–4705.
- Sandoval-Castro, C.A., Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H., Salem, A.F., Chan-Perez, J.I. 2012. Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock. *Animal Feed Science and Technology* 176: 192–201.
- Sansoucy, R., Alibes, X., Berge, Ph., Martilotti, F., Nefzaoui, A., Zoïopoulos, P., 1985. Olive by-products for animal feed. FAO Animal Production and Health Paper 43. ISBN 92-5-101488-4.
- Saratsis, A., Voutzourakis, N., Theodosiou, T., Stefanakis, A., Sotiraki, S. 2016. The effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and carob pods (*Ceratonia siliqua*) feeding regimes on the control of lamb coccidiosis. *Parasitology Research* 115: 2233-2242. doi:10.1007/s00436-016-4966-9
- Sayers, G. and Sweeney, T. 2005. Gastrointestinal nematode infection in sheep – a review of the alternatives to anthelmintics in parasite control. *Animal Health Research Reviews*, 6: 159-171.
- Scalbert, A., Morand, Ch., Manach, Cl., Rémésy, Ch. 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 56: 276-282.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. 2001. Analysis of condensed tannins; a review. *Animal Feed Science and Technology* 91:21–40 doi:10.1016/S0377-8401(01)00228-0

- Skuce, P.J., Morgan, E.M., van Dijk, J., Mitchell, M. 2013. Animal health aspects of adaptation to climate change: beating the heat and parasites in a warming Europe. *Animal* 7(2): 333–345
- Seigler, D.S. 1998. In Plant secondary metabolism, Kluwer Academic Publishers: Norwell
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kallu, R.K., Mosjidis, J.A. 2004. Effects of feeding sericea lespedeza hay to goats infected with *Haemonchus contortus*. *South African Journal of Animal Science* 34: 248-250.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A. 2006. *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Veterinary Parasitology* 139: 150-157.
- Silanikove, N., Gilboa, N., Nir, I., Perevolotsky, A., Nitsan, Z. 1996. Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Quercus calliprinos*, *Pistacia lentiscus* and *Ceratonia siliqua*) by goats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 199–205.
- Silanikove, N., Landau, S., Or, D., Kababya, D., Bruckental, I., Nitsan, Z. 2006. Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (*Ceratonia siliqua*) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids. *Livestock Science* 99: 29-38.
- Silva, B.D.M., Castro, E.A., Souza, C.J.H., Paiva, S.R., Sartori, R., Franco, M.M., Azevedo, H.C., Silva, T.A.S.N., Vieira, A.M.C., Neves, J.P., Melo, E.O. 2011. A new polymorphism in the Growth and Differentiation on Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovula on rate and prolificacy in homozygous sheep. *Animal Genetics* 42:89–92.
- Silva, M.V.B., Sonstegard, T.S., Hanotte, O., Mugambi, J.M., Garcia, J.F., Nagda, S., Gibson, J.P., Iraqi, F.A., McClintock, A.E., Kemp, S.J., Boettcher, P.J., Malek, M., Van Tassell, C.P., Baker, R.L., 2012. Identification of quantitative trait loci affecting resistance to gastrointestinal parasites in a double backcross population of Red Maasai and Dorper sheep. *Animal Genetics* 43, 63–71.
- Silva, L.M.R., Vila-Vicosa, M.J.M., Maurelli, M.P., Morgoglione, M.E., Cortes, H.C.E., Cringoli, G., Rinaldi, L. 2013. Mini-FLOTAC for the diagnosis of Eimeria infection in goats: an alternative to McMaster. *Small Ruminant Research*, 114: 280–283.
- Silva Soares, S.C., de Lima, G.C., Laurentiz, A.C., Féboli, A., dos Anjos, L.A., de Paula Carlis, M.S., da Silva Filardi, R., da Silva de Laurentiza, R. 2018. *In vitro* anthelmintic activity of grape pomace extract against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 6: 243–247.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Siskos, E.P., Konstantopoulou, M.A., Mazomenos, B.E., Jervis, M. 2007. Insecticidal activity of *Citrus aurantium* fruit, leaf, and shoot extracts against adult olive fruit flies (Diptera:

- Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 100: 1215–1220. doi: 10.1093/jee/100.4.1215
- Sissay, M.M., Asefa, A., Ugglä, A., Waller, P.J. 2006. Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: exploitation of refugia to restore anthelmintic efficacy. *Veterinary Parasitology*, 135: 337-346.
- Sommer, C., Steffansen, B., Overgaard Nielsen, B., Grønvold, J., Vagn Jensen, K.-M., Brøchner Jespersen, J., Springborg, J., Nansen, P. 1992. Ivermectin excreted in cattle dung after subcutaneous injection or pour-on treatment: concentrations and impact on dung fauna. *Bulletin of Entomological Research*, 82(02): 257-264. doi:10.1017/s0007485300051804
- Soobrette, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579: 200-213.
- Speranza, A. 2010. Into the world of steroids, a biochemical “keep in touch” in plants and animals. *Plant signaling & behavior* 5(8): 940-943.
- Stafford, K.A., Morgan, E.R., Coles, G.C. 2009. Weigh-based targeted selective treatment of gastrointestinal nematodes in a commercial sheep flock. *Veterinary Parasitology*, 164: 59-65.
- Staudt, M. and Lhoutellier, L. 2007. Volatile organic compound emission from hohn oak infested by gypsy moth larvae: evidence for distinct responses in damaged and undamaged leaves. *Tree Physiology* 27: 1433–1440.
- Stear, M.J., Doliglska, M., Donskow-Schmelter, K. 2007. Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology* 134: 139-151. doi:10.1017/S0031182006001557
- Steel, J.W., Symons, L.E.A., Jones, W.O. 1980. Effects of level of larval intake on the productivity and physiological and metabolic responses of lambs infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Australian Journal of Agricultural Research* 31: 821–838.
- Steel, J.W. 1993. Pharmacokinetics and metabolism of avermectins in livestock. *Veterinary Parasitology* 48: 45–57. doi:10.1016/0304-4017(93)90143-B
- Steel, J.W. 2003. Effects of protein supplementation of young sheep on resistance development and resilience to parasitic nematodes. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 43, 1469-1476.
- Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M. M. B., Allen, S. K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P. M. (eds.) 2014. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press
- Strack, D. 1997. Phenolic Metabolism, in *Plant Biochemistry*, P.M. Day & J.B. Harborne (ed.), Academic Press Ltd, U.K. 387-416.

- Strain, S.A. and Stear, M.J. 2001. The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology*, 23, 527-531.
- Stromberg, B.E. 1997. Environmental factors influencing transmission. *Veterinary Parasitology*, 72: 247-256.
- Strong, L. 1993. Overview: the impact of avermectins on pastureland ecology. *Veterinary Parasitology*, 48:3-17.
- Sutherland, I.A., Leathwick, D.M., Moen, I.C., Bisset, S.A. 2002. Resistance to therapeutic treatment with macrocyclic lactone anthelmintics in *Osteraia circumcineta*. *Veterinary Parasitology*, 109: 91-99.
- Sykes, A. R. 1994. Parasitism and production in farm animals. *Animal Production* 59: 155–172.
- Szumacher-Strabel M., Zmora P., Roj E., Stochmal A., Pers-Kamczyc E., Urbańczyk A., Oleszek W., Lechniak D., Cieślak A. 2011. The potential of the wild dog rose (*Rosa canina*) to mitigate *in vitro* rumen methane production. *Journal of Animal and Feed Science* 20: 285–299.
- Swain T., Harborne J.B., Van Sumere, C.F. 1979. Recent advances in phytochemistry: biochemistry of plant polyphenolics, *Plenum Press (New York and London)*, 12: 617-640.
- Sweeney, T., Hanrahan, J.P., Ryan, M.T., Good, B. 2016 Immunogenomics of gastrointestinal nematode infection in ruminants - breeding for resistance to produce food sustainably and safely. *Parasite Immunology* 38(9):569-86. doi: 10.1111/pim.12347.
- Taylor, M.A. 1990. A larval development test for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. *Research in Veterinary Science* 49: 198–202.
- Taylor C.E., Murant A.F. 1966. Nematicidal activity of aqueous extracts from raspberry canes and roots. *Nematologica*, 12: 488-494.
- Taylor, M.A., Hunt, K.R., Goodyear, K.L. 2002. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology* 103: 183-194.
- Taylor, M.A., Coop, R. L., Wall, R.L. 2007. *Veterinary Parasitology*. 3rd edition, Blackwell publishing.
- Terrill, T.H., Waghorn, G.C., Woolley, D.J., McNabb, W.C., Barry, T.N. 1994. Assay and digestion of ¹⁴C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. *British Journal of Nutrition* 72(3): 467–477.
- Terrill, T.H., Dykes, G.S., Shaik, S.A., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Burke, J.M., Mosjidis, J.A. 2009. Efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats: dose titration study. *Veterinary Parasitology* 163: 52–56
- Terrill, T.H., Miller, J.E., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., Kaplan, R.M. 2012. Experiences with integrated concepts for the control of *Haemonchus contortus* in sheep and goats in the United States. *Veterinary Parasitology* 186: 28-37.

- ThePlantList. 2013. Version 1.1. [online] Διαθέσιμο στο: <http://www.theplantlist.org/> [ανάκτηση 15/04/2020].
- Theodoridou, K., Aufrère, J., Andueza, D., Pourrat, J., Le Morvan, A., Stringano, E., Mueller-Harvey, I., Baumont, R. 2010. Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 160(1-2): 23-38.
- Theodoridou, K., Aufrère, J., Andueza, D., Le Morvan, A., Picard, F., Stringano, E., Pourrat, J., Mueller-Harvey, I., Baumont, R. 2011. Effect of plant development during first and second growth cycle on chemical composition, condensed tannins and nutritive value of three sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) varieties and lucerne. *Grass and Forage Science* 66(3): 402–414.
- Theodoridou, K., Aufrère, J., Andueza, D., Le Morvan, A., Picard, F., Pourrat, J., Baumont, R. 2012. Effects of condensed tannins in wrapped silage bales of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. *Animal* 6: 245–253.
- Tomczyk, M., Latté, K.P. 2009. *Potentilla* - A review of its phytochemical and pharmacological profile. *Journal of Ethnopharmacology* 122: 184-204.
- Torres-Acosta, J.F., Hoste, H. 2008. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing/browsing sheep and goats. *Small Ruminant Research* 77: 159-173.
- Torres-Acosta, J.F.J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A.J., Cueíllar-Ordaz, J.A. 2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology* 189: 89-96.
- Torres-Fajardo, R.A., González-Pech, P.G/, Sandoval-Castro, C.A., Torres-Acosta, J.F.J. 2020. Small Ruminant Production Based on Rangelands to Optimize Animal Nutrition and Health: Building an Interdisciplinary Approach to Evaluate Nutraceutical Plants. *Animals* 10:1799. doi: 10.3390/ani10101799. PMID: 33023017.
- Trapp, S.C., Croteau, R.B. 2001. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* 158: 811-832.
- Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E., Hollman, P., Chamalides, Ch., Foufa, E., Kaloudis, Tr., Kromhout, D., Miskaki, Ph., Petrochilou, I., Poulima, E., Stafilakis, K., Theophilou, D. 2000. Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. *Food Chemistry* 70: 319-323.
- Tzamaloukas, O., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L. 2005. The consequences of short-term grazing of bioactive forages on established adult and incoming larvae populations of *Teladorsagia circumcincta* in lambs. *International Journal for Parasitology* 35: 329-335.
- Urquiaga, I., Leighton, F. 2000. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biological Research* 33(2): 55-64.

- van Dijk, J., David G.P., Baird, G., Morgan E.R. 2008. Back to the future: developing hypotheses on the effects of climate change on ovine parasitic gastroenteritis from historical data. *Veterinary Parasitology* 158: 73–84
- van Dijk, J., de Louw, M.D.E., Kalis, L.P.A., Morgan, E.R. 2009. Ultraviolet light increases mortality of nematode larvae and can explain patterns of larval availability at pasture. *International Journal for Parasitology* 39: 1151-1156.
- van Dijk, J., Sargison, N.D., Kenyon, F., Skuce, P.J. 2010. Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperate regions. *Animal* 4: 377–392
- van Houtert, M.F.J., Sykes, A.R. 1996. Implications of Nutrition for the ability of ruminants to withstand gastrointestinal nematode infections. *International Journal for Parasitology* 26: 1151-1168.
- van Wyk, J.A., van Schalkwyk, P.C. 1990. A novel approach to the control of anthelmintic-resistant *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 35: 61-69.
- van Wyk, J.A., Bath, G.F. 2002. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research* 33: 509-529.
- van Wyk, J.A., Hoste, H., Kaplan, R.M., Besier, R.B. 2006. Targeted selective treatment for worm management-how do we sell rational programs to farmers? *Veterinary Parasitology* 139: 336-346.
- Varady, M., Corba, J. 1999. Comparison of six in vitro tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. *Veterinary Parasitology* 80: 239–249.
- Vargas-Magaña, J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Chan-Pérez, J.I. 2014a. Anthelmintic activity of acetone–water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Veterinary Parasitology* 206(3-4): 322–327.
- Vargas-Magaña, J.J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Chan-Pérez, J.I., Mathieu, C., Vilarem, G. 2014b. *In vitro* susceptibility to tannin rich extracts differs amongst *Haemonchus contortus* isolates from tropical and temperate regions. In: 13th International Congress of Parasitology, August 10–15, 2014, Mexico city, Mexico.
- Velagaleti, R., Burns, P.K., Gill, M., Prothro, J. 2002. Impact of current good manufacturing practices and emission regulations and guidances on the discharge of pharmaceutical chemicals into the environment from manufacturing, use and disposal. *Environmental Health Perspectives* 110: 213-20
- VICH Expert Working Group. 2004. Environmental Impact assessment for veterinary medicinal products, Phase II, Guidance. *International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products* 38: 1–36.

- Villalba, J.J., Miller, J., Ungar, E.D., Landau, S.Y., Glendinning, J. 2014. Ruminant self-medication against gastrointestinal nematodes: evidence, mechanism, and origins. *Parasite* 21:31. doi: 10.1051/parasite/2014032.
- Visioli, F., Vinceri, F.F., Galli, C. 1995. 'Waste waters' from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia* 51(1): 32-34.
- Vogiatzakis, I.N., Mannion A.M., Griffiths G.H. 2006. Mediterranean ecosystems: problems and tools for conservation. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment* 30: 175–200.
- Voutzourakis, N., Tzanidakis, N., Stergiadis, S., Rempelos, L., Eyre, M., Atsali, I., Franceschin, E., Leifert, C., Stefanakis, A., Sotiraki, S., Butler, G. 2020. Sustainable Intensification? Increased Production Diminishes Omega-3 Content of Sheep Milk. *Sustainability* 12(3):1228. doi: 10.3390/su12031228.
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 147: 116–139.
- Waghorn, G.C. and McNabb, W.C. 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* 62: 383–392
- Waghorn, T.S., Leathwick, D.M., Chen, L.Y., Gray, R.A., Skipp, R.A. 2002. Influence of nematophagous fungi, earthworms and dung burial on development of the free-living stages of *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta* in New Zealand. *Veterinary Parasitology* 104: 119-129.
- Waller, P. J. 1985. Resistance to anthelmintics and the implications for animal production. In "Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs" (N. Anderson and P. J. Waller, eds), pp.1-11, CSIRO, Division of Animal Health, Australia.
- Waller, P.J. 1993. Towards sustainable nematode parasite control of livestock. *Veterinary Parasitology* 48: 295-309.
- Waller, P.J. 2006. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Animal Feed Science and Technology* 126(3-4): 277–289.
- Waller, P.J., Chandrawathani, P. 2005. *Haemonchus contortus*: Parasite problem No.1 from tropics – Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical Biomedicine* 22: 131-137.
- Waller, P.J., Thamsborg, S.M. 2004. Nematode control in green ruminant production system. *Trends in Parasitology* 20: 493–497.
- Waller, P.J., Rydzik, A., Ljungström, B.L., Törnquist, M. 2004. Towards the eradication of *Haemonchus contortus* from sheep flocks in Sweden. *Veterinary Parasitology* 136: 367-372.

- Wang, Y., Douglas, G. B., Waghorn, G. C., Barry, T. N., Foote, A. G. & Purchas, R. W. 1996. Effect of condensed tannins upon the performance of lambs grazing *Lotus corniculatus* and lucerne (*Medicago saliva*). *Journal of Agricultural Science* 126: 87–98.
- Wang, T., Rose Vineer, H., Morrison, A., van Wyk, J.A., Bolajoko M.B., Bartley, D.J., Morgan, E.R. 2018. Microclimate has a greater influence than macroclimate on the availability of infective *Haemonchus contortus* larvae on herbage in a warmed temperate environment. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 265: 31 – 36.
- Wardhaugh, K.G., Rodriguez-Menendez, H. 1988. The effects of the antiparasitic drug, ivermectin, on the development and survival of the dung-breeding fly, *Orthelia cornicina* (F.) and the scarabaeine dung beetles, *Copris hispanus* L., *Bubas bubalus* (Oliver) and *Onitis belial* F. *Journal of Applied Entomology* 106: 381–389. doi:10.1111/j.1439-0418.1988.tb00607.x
- Webb, G.P. 2006. Dietary supplements and functional foods. Blackwell Publishing, Ltd. Oxford, UK, 5, 109-111, 8, 165-166.
- Whitlock, H.V., 1948. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*, 21: 177–180.
- Williams, A.R., Fryganas, C., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M. 2014. Direct anthelmintic effects of condensed tannins from diverse plant sources against *Ascaris suum*. *PLoS ONE*, 9(5): e97053. doi:10.1371/journal.pone.0097053
- Wink M. The role of quinolizidine alkaloids in plant insect interactions, in *Insect–Plant Interactions*, Vol. IV (ed. Bernays E.A.), CRC Press, Boca Raton, pp. 133–69. 1992.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.C. 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology* 20: 469–476.
- Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, Jr JB, Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M., Vercruysse, J. 1995. World Association for the Advancement of (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology* 58: 181–213.
- Yahia, Y., Benabderrahim, M.A., Tlili, N., Bagues, M., Nagaz, K. 2020. Bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from different plant parts of two *Ziziphus* Mill. Species. *Plos ONE* 15(5): e0232599 doi: 10.1371/journal.pone.0232599
- Ye, W., Xu, P., Zhong, S., Jen, R., Threlfall W.R., Frasure C.V., Feng E., Li H, Lin S.H., Liu J.Y, Lin Y.C. 2011. *In vitro* transformation of MCF-10A cells by cera harvested from heifers two months post-Zeranol implantation. *International Journal of Oncology* 38: 985-92.
- Zajac, A.M., Garza, J. 2020. Biology, epidemiology and control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 36: 73-87. doi: 10.1016/j.cvfa.2019.12.005

- Zeller, W.E. 2019. Activity, purification, and analysis of condensed tannins: Current state of affairs and future endeavors. *Crop Science* 59: 886–904 doi: 10.2135/cropsci2018.05.0323
- Zohary, D. 1995. Olive. *Olea europaea* (Oleaceae). In: Smartt, J. and Simmonds, N.W. (Eds.) *Evolution of crop plants*. London: Longman, pp 379–382.
- Zohary, D. & Hopf, M. 2000. *Domestication of plants in the Old World*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press.
- Zoiopoulos, P.E. 1983. Study on the use of olive by-products in feeding in Greece. *Animal Production and Health Division*, FAO, Rome.
- Zvinorova, P.I., Halimani, T.E., Muchadeyi, F.C., Matika, O., Riggio, V., Dzama, K. 2016. Breeding for resistance to gastrointestinal nematodes - the potential in low-input/output small ruminant production systems. *Veterinary Parasitology* 30: 225:19-28. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.05.015.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Αθανασιάδης, Ν. Η. 1986. Δασική Βοτανική (Δένδρα και θάμνοι των δασών της Ελλάδος). Μέρος ΙΙ. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη.
- Αρβανιτογιάννης, Ι.Σ., Τζούρος, Ν. 2006. Όροι και ορισμοί Στο : Αρβανιτογιάννης, Ι.Σ., Τζούρος, Ν. Το νέο πρότυπο για ποιότητα και ασφάλεια τροφίμων ΙΣΟ 22000. Παρουσίαση και ερμηνεία. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε. 37-40.
- ΕΟΦ, Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων, επίσημος ιστότοπος (<http://www.eof.gr/web/guest/searchvet>)
- Ιγνατιάδου-Ραγκούση, Β. 1998 Χημεία Φυσικών Προϊόντων Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Κανονισμός (ΕΕ) 2019/6 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 11ης Δεκεμβρίου 2018, για τα κτηνιατρικά φάρμακα και για την κατάργηση της οδηγίας 2001/82/ΕΚ, ΕΕ L 4 της 7.1.2019, σ. 43.
- Καραμπουρνιώτης, Γ. 2003 Δευτορογενείς Μεταβολίτες Στο: Γαλάτης, β., Γανωτάκης, Δ., Γκανή-Σπυροπούλου, Κ., Καραμπουρνιώτης, Γ., Κοτζαμπάσης, Κ., Κωνσταντινίδου, Ε.Ι., Μανέτας, Ι., Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Κ.Α., Φυσιολογία Φυτών-από το μόριο στο περιβάλλον, *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, Κεφάλαιο 10, 337.
- Κοτσερίδης, Γ. 2005. Οινολογία Ι & ΙΙ, Σημειώσεις, Αθήνα.
- Μούζουρας, Σ. 1996. Κτηνιατρική Φαρμακολογία. Κεφάλαιο 5ο: Αντιπαρασιτικά, 204-265. Αθήνα.
- Παπαδόπουλος, Η., Πτωχός, Σ., Φθενάκης, Γ. 2011. Μεταβολές με την πάροδο του χρόνου στις παρασιτώσεις από γαστρεντερικά νηματώδη σε μικρά μηρυκαστικά στην Ελλάδα.

Σμοκοβίτης Α. 1985. Εισαγωγή Στο: Σμοκοβίτης Α. Η επίδραση της ρύπανσης και της μόλυνσης του περιβάλλοντος στο έμβρυο 19-49.

Σπάης Α. 1997. Ζωοτροφές και σιτηρέσια. *Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία*, Θεσσαλονίκη.

COM128 2019. Στρατηγική προσέγγιση της Ευρωπαϊκής Ένωσης σχετικά με τα φάρμακα στο περιβάλλον (final) 11.3.2019, Ευρωπαϊκή Επιτροπή, Βρυξέλλες.

ΥΠΑΑΤ, Γενική Διεύθυνση Ζωικής Παραγωγής, 2011. Ελληνική Κτηνοτροφία, Ζωική Παραγωγή, Αθήνα 2011.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Συμπληρωματικός Πίνακας 4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης (εκφρασμένη σε µg/100g ξηρού βάρους του φυτικού μέρους) των επιμέρους πολυφαινόλων που εμπεριέχονται στα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στους *in vitro* πειραματισμούς.

(NF: Δεν ανιχνεύτηκε, Nd: Κάτω από το όριο ανίχνευσης, TR: Ίχνη)

	<i>Pyracantha coccinea</i> M.Roem.		<i>Pyrus spinosa</i> Forssk.	<i>Rosa canina</i> L.		<i>Rosa sempervirens</i> L.	
	Υπέργειο	Σπόρος	Υπέργειο	Υπέργειο	Καρπός	Υπέργειο	Καρπός
Κατεχίνη	261,2	790	188,9	Nd	13480	Nd	2550
Ρουτίνη	1634,8	2580	186,3	123,4	2560	Nd	260
Καμφερόλη	Nd	10	2,1	Nd	50	2	Nd
Γαλλικό οξύ	Nd	Nd	Nd	98,5	221	2,4	50
Γαλλοκατεχίνη	Nd	NF	Nd	5,8	NF	Nd	NF
Χλωρογενικό οξύ	457,9	480	35173,6	10,4	Nd	Nd	Nd
Καφεϊκό οξύ	Nd	150	8,4	4,5	Nd	1,8	Nd
Συριγγικό οξύ	18,3	620	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>p</i> -Κουμαρικό Οξύ	0,6	Nd	1,1	7,7	240	Nd	Nd
Φερουλικό οξύ	Nd	NF	Nd	Nd	NF	Nd	NF
Ελλαγικό οξύ	Nd	NF	Nd	Nd	NF	18,1	NF
Κερκετίνη	16	10	38,2	25,6	70	Nd	20
<i>trans</i> -Κινναμωμικό οξύ	8,7	NF	4,4	3,8	NF	Nd	NF
Κινικό οξύ	NF	Nd	NF	NF	110260	NF	39000
Πρωτοκατεχικό οξύ (Διυδροξυ-βενζοϊκό οξύ)	NF	Nd	NF	NF	210	NF	Nd
Επικατεχίνη	NF	1020	NF	NF	12100	NF	3400
Υπεροσίδιο (3-Ο-γαλακτοσιδής της κερσετίνης)	NF	17070	NF	NF	30810	NF	830
Ταξιφολίνη	NF	10	NF	NF	Nd	NF	Nd
Βανιλίνη	NF	790	NF	NF	Nd	NF	Nd
Αστραγαλίνη	NF	910	NF	NF	17250	NF	920
Φλοριζίνη	NF	Nd	NF	NF	340	NF	Nd
Εριοδικτυόλη	NF	10	NF	NF	Nd	NF	10
Κερκιτρίνη	NF	Nd	NF	NF	Nd	NF	50
Γενιστεΐνη	NF	Nd	NF	NF	Nd	NF	10
Ισοχαρμετίνη	NF	Nd	NF	NF	Nd	NF	Nd
Ισοσακουρανετίνη	NF	10	NF	NF	Nd	NF	Nd
Βητουλινικό οξύ	NF	Nd	NF	NF	50	NF	Nd
Ουρσολικό οξύ	NF	Nd	NF	NF	13820	NF	Nd

συνεχίζεται....

συνέχεια....

	<i>Ceratonia siliqua</i> L.	<i>Onobrychis alba subsp. laconica</i> Orph ex Boiss.	<i>Onobrychis peloponnesiaca</i> Iatrou & Kit Tan	<i>Olea europaea</i> L.		
	Καρποί	Υπέργειο	Υπέργειο	Φύλλα	νοπή πούλπα	ξηρή πούλπα
Κατεχίνη	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Ρουτίνη	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Καμφορόλη	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Γαλλικό οξύ	285000	53000	4000	NF	NF	254000
Χλωρογενικό οξύ	NF	104000	17000	NF	NF	NF
Καφεϊκό οξύ	NF	1000	1000	1000	22000	1000
Συριγγικό οξύ	4000	4000	2000	3000	10000	3000
p-Κουμαρικό οξύ	NF	3000	3000	TR	12000	2000
Φερούλικό οξύ	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Κερκετίνη	NF	28000	1000	26000	13000	2000
Πρωτοκατεχικό οξύ (Διυδροξυ-βενζοϊκό οξύ)	NF	NF	12000	NF	NF	28000
Επικατεχίνη	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Ισοχαρμετίνη	NF	2000	NF	3000	NF	NF
Υδροξυτυροσόλη	4000	NF	4000	16000	12000	10000
Καφταρικό οξύ	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Προκυανιδίνη B1	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Προκυανιδίνη B2	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Επιγαλλοκατεχίνη	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού εστέρα	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Οινίνη (3-γλυκοσίδης της μαλβιδίνης)	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Κουταρικό οξύ	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Φερταρικό οξύ	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Εσπεριδίνη	16000	2093000	287000	379000	NF	19000
3-β-D-γλυκοσίδης της κερκετίνης	NF	28000	52000	12000	NF	NF
Πολυδατίνη	NF	NF	25000	NF	NF	NF
Γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης	0,01	NF	12000	NF	NF	NF
Προκυανιδίνη A2	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Σιναπικό οξύ	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Μυρισετίνη	NF	NF	NF	NF	NF	NF
ο-κουμαρικό οξύ	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Κονιφερλική αλδεϋδη (4-υδροξυ-3- μεθοξυκινναμαλδεϋδη)	NF	NF	NF	TR	NF	NF
Ρεσβερατρόλη	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Απιγενίνη	NF	NF	NF	6000	NF	NF

συνεχίζεται...

συνέχεια....

	<i>Alchemila bulgarica</i> Rothm.	<i>Alchemila xanthochlora</i> Rothm.	<i>Aremonia agrimonoides</i> (L.) DC	<i>Crataegus orientalis</i> Pall. ex M. Bieb.	<i>Fragaria vesca</i> L.	<i>Geum urbanum</i> L.	<i>Potentilla haynaldiana</i>	<i>Potentilla pedata</i> Willd. ex Hornem.
	Υπέργειο	Υπέργειο	Υπέργειο	Υπέργειο	Υπέργειο	Υπέργειο	Υπέργειο	Υπέργειο
Κατεχίνη	Nd	18,3	386,1	Nd	22,1	Nd	18,9	28,6
Ρουτίνη	Nd	98,7	Nd	253	Nd	Nd	Nd	171,9
Καμφερόλη	Nd	6,1	5,1	Nd	12,1	2	3,6	6,1
Γαλλικό οξύ	9,2	35,7	9,4	Nd	63,1	11,5	61,9	12,5
Γαλλοκατεχίνη	Nd	Nd	Nd	Nd	27,9	Nd	243,1	Nd
Χλωρογενικό οξύ	Nd	71,4	Nd	516,3	101,9	Nd	26,9	Nd
Καφεϊκό οξύ	1,9	7,4	7,8	7,4	6,3	4,4	Nd	5,2
Συριγγικό οξύ	Nd	18,5	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
p-Κουμαρικό οξύ	0,6	14,5	7,7	2,2	1,1	1,8	Nd	3
Φερουλικό οξύ	4,2	11,6	6,3	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Ελλαγικό οξύ	1281,5	2226,9	714,3	Nd	1019,4	153,5	8,3	312,5
Κερκετίνη	7,6	13,4	Nd	12,4	38,8	Nd	Nd	1,4
trans-Κιναμωμικό οξύ	1,7	6,1	5,8	5	Nd	4,1	7,8	4,9

συνεχίζεται...

συνέχεια....

	<i>Potentilla recta</i> L.	<i>Potentilla speciosa</i> Willd.	<i>Prunus mahaleb</i> L.	<i>Prunus prostrata</i> Labill.	<i>Prunus webbii</i> (Spach) Vierh.	<i>Rosa pulverulenta</i> M. Bieb.	<i>Rosa idaeus</i> L.	<i>Rubus sanctus</i> Schreb. (=R. <i>creticus</i> L.)	<i>Sorbus umbellata</i> (Desf.) Fritsch (=Aria <i>umbellata</i> Desf)
	Υπέργειο	Υπέργειο	Υπέργειο	Υπέργειο	Υπέργειο	Υπέργειο	Υπέργειο	Υπέργειο	Υπέργειο
Κατεχίνη	26,5	Nd	Nd	Nd	57,4	Nd	23,7	Nd	195,6
Ρουτίνη	128,1	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	86,7
Καμφορόλη	Nd	Nd	4,8	Nd	3,4	Nd	10,5	Nd	4,8
Γαλλικό οξύ	Nd	40,1	Nd	Nd	17,8	140	17,6	381,6	Nd
Γαλλοκατεχίνη	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	15,5	Nd	Nd	Nd
Χλωρογενικό οξύ	415,7	45,6	989,6	Nd	3989,1	Nd	Nd	71,4	1723,8
Καφεϊκό οξύ	Nd	8,3	4,5	21,8	9,7	9,8	10,5	8,6	Nd
Συριγγικό οξύ	1,7	Nd	Nd	12,2	7,1	Nd	Nd	Nd	Nd
p-Κουμαρικό οξύ	Nd	1,9	0,5	28,5	11,6	5,9	2,3	4,9	Nd
Φερουλικό οξύ	1,3	6,2	5,9	53,7	13,7	Nd	8,9	Nd	Nd
Ελλαγικό οξύ	Nd	4127	Nd	Nd	Nd	1545,5	499,5	Nd	Nd
Κερκετίνη	0,8	15,3	0,5	90,6	13,7	12,3	2,9	39,7	6,9
trans- Κινναμωμικό οξύ	Nd	5,6	3,4	Nd	6,1	Nd	7,9	6,4	Nd

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Συμπληρωματικός Πίνακας 5.1. Συστατικά και υπολογισμένη με βάση τα χαρακτηριστικά των πρώτων υλών, χημική σύνθεση του πειραματικού σιτηρεσίου διατροφής για α) το Πείραμα 1 και β) το Πείραμα 3

α)

Πείραμα 1					
Συστατικά (%)	0% CaBP	3% CaBP	6% CaBP	9% CaBP	12% CaBP
Barley Straw/Άχυρο κριθαριού	19.5	14.5	8.0	6.5	9.5
Alfalfa hay/Σάνος μηδικής	30.5	30.5	42.0	40.0	20.0
Corn Grain/Καρπός αραβοσίτου	35.0	26.6	25.5	28.0	32.0
Wheat bran/Πίτυρα σίτου	0.0	13.1	7.0	0	0
Soyabean meal/Σογιάλευρο	12.0	8.8	8.0	5.0	0
Sunflower meal/ Ηλιάλευρο	0	0	0	8.0	23.0
Dried carob pods (flour meal)/ Χαρουπάλευρο (αποξηραμένο)	0	3.0	6.0	9.0	12.0
NaCl	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
CaCO ₃	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Mineral and Vitamins premix/ Πρόμγμα μακροστοιχείων και ιχνοστοιχείων	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Total Σύνολο	100.0	100.0	100	100.0	100.0
Chemical composition % of DM/ Χημική σύνθεση % DM					
Dry matter/Ξηρή ουσία	84.4	84.1	83.9	84.0	84.1
Crude fibre/ολικές ινώδεις ουσίες	21.7	21.2	22.1	22.0	20.0
Crude protein (Nx6.25)/Ολικές αζωτούχες ουσίες (Nx6.25)	15.0	15.1	15.2	15.0	15.1
NDF	38.3	41.0	39.6	38.6	38.9
ADF	26.3	26.1	26.7	26.7	24.9
Crude fat/Ολικά λιπαρά	3.1	2.6	2.5	2.5	3.1
Met. Energy (MJ/kg) / Μεταβολιστέα Ενέργεια (MJ/kg)	9.0	8.9	8.9	8.8	8.7
Ca	1.4	1.5	1.5	1.4	1.4
P	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

β)

Πείραμα 3				
Συστατικά (%)	C	CaBP	S	CaBP+S
Barley Straw/Άχυρο κριθαριού	11.0	8.0	7.0	7.0
Dehydrated Alfalfa/Αφυδατωμένη μηδική	30.0	20.0	0	0
Sainfoin/Σανός Ονοβρυχίδας σε μορφή πέλλετ	0	0	35.0	25.0
Dried carob pods (flour meal)/ Χαρουπάλευρο (αποξηραμένο)	0	12.0	0	9.0
Corn Grain/Καρπός καλαμποκιού	30.0	30.0	31.0	31.0
Soyabean meal/Σογιάλευρο	8.0	3.0	0	3.0
Sunflower meal/Ηλιάλευρο	7.5	23.5	23.5	21.5
NaCl	1.0	1.0	1.0	1.0
CaCO ₃	2.0	2.0	2.0	2.0
Mineral and Vitamins premix/ Πρόμικμα μακροστοιχείων και ιχνοστοιχείων	0.5	0.5	0.5	0.5
Total Σύνολο	100.0	100.0	100.0	100.0
Chemical composition % of DM/ Χημική σύνθεση % DM				
Dry matter/Ξηρή ουσία	84.4	84.6	84.6	84.6
Crude fibre/Ολικές ινώδεις ουσίες	20.5	19.5	22.2	19.8
Crude protein (Nx6.25)/ Ολικές αζωτούχες ουσίες (Nx6.25)	16.5	16.4	16.6	16.4
NDF	38.6	38.0	39.3	37.6
ADF	24.3	24.5	25.9	24.4
Crude fat/Ολικά λιπαρά	3.0	3.1	3.2	3.1
Met. Energy (MJ/kg)/ Μεταβολιστέα Ενέργεια (MJ/kg)	9.0	8.8	8.7	8.8
Ca	1.4	1.4	1.5	1.4
P	0.5	0.5	0.4	0.5

Συμπληρωματικός Πίνακας 5.2. Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης για την ωοτοκία των ενήλικων ελθμίνθων του είδους α) *Haemonchus contortus* και β) *Trichostrongylus colubriformis* του Πειράματος 1.

α)

Coefficients ^a								
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95,0% Confidence Interval for B	
		B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	513,857	21,060		24,400	,000	472,437	555,277
	Group	-65,857	6,350	-,486	-10,372	,000	-78,346	-53,368

a. Dependent Variable: fecundity *Haemonchus contortus*

β)

Coefficients ^a								
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95,0% Confidence Interval for B	
		B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
1	(Constant)	24,992	,750		33,304	,000	23,516	26,469
	Group	-,802	,236	-,186	-3,400	,001	-1,266	-,338

a. Dependent Variable: fecundity *Trichostrongylus colubriformis*

Συμπληρωματικός Πίνακας 5.3. Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) επαναληπτικών μετρήσεων για τα αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων των παρασίτων κατά το Πείραμα 2.

Univariate and Multivariate Repeated Measures Analysis					
Between Subjects -----					
Source	SS	df	MS	F	P
GROUP	1743742.781	3	581247.594	5.289	0.008
Error	2197953.708	20	109897.685		

Συμπληρωματικός Πίνακας 5.4. Αποτελέσματα ανάλυσης date-by-date ANOVA για τα αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων των παρασίτων, την Ημέρα 29 κατά το Πείραμα 2.

Analysis of Variance					
Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
GROUP	452013.833	3	150671.278	4.349	0.016
Error	692854.000	20	34642.700		

Συμπληρωματικός Πίνακας 5.5. Αποτελέσματα ανάλυσης date-by-date ANOVA για τα αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων των παρασίτων, την Ημέρα 33 κατά το Πείραμα 2.

Analysis of Variance					
Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
GROUP	1275005.500	3	425001.833	2.690	0.074
Error	3160006.333	20	158000.317		

Συμπληρωματικός Πίνακας 5.6. Αποτελέσματα ανάλυσης date-by-date ANOVA για τα αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων των παρασίτων, την Ημέρα 37 κατά το Πείραμα 2.

Analysis of Variance					
Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
GROUP	336918.792	3	112306.264	1.678	0.204
Error	1338716.167	20	66935.808		

Συμπληρωματικός Πίνακας 5.7. Αποτελέσματα Ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) επαναληπτικών μετρήσεων για τα αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων των παρασίτων κατά το Πείραμα 3, βασισμένη σε τρεις ημερομηνίες.

Univariate and Multivariate Repeated Measures Analysis					
Between Subjects -----					
Source	SS	df	MS	F	P
GROUP	5856129.931	3	1952043.310	2.681	0.074
Error	1.45603E+07	20	728012.647		

Συμπληρωματικός Πίνακας 5.8. Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης με το κριτήριο Bonferroni, για τα αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων των παρασίτων, την Ημέρα 37 κατά το Πείραμα 3.

Bonferroni Adjustment				
Matrix of pairwise comparison probabilities:				
	C	CaBP	S	CaBP+S
C	1.000			
CaBP	1.000	1.000		
S	0.060	0.479	1.000	
CaPB+S	0.053	0.426	1.000	1.000

Συμπληρωματικός Πίνακας 5.9. Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) επαναληπτικών μετρήσεων για τα αυγά ανά γραμμάριο κοπράνων των παρασίτων κατά το Πείραμα 3.

Analysis of Variance					
Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
GROUP	3313030.125	3	1104343.375	4.093	0.200
Error	5396031.500	20	269801.575		

Συμπληρωματικός Πίνακας 5.10. Μη παραμετρική δοκιμή Kruskal-Wallis Test για την ωοτοκία των θηλυκών παρασίτων του είδους α) *Haemonchus contortus* και β) *Trichostrongylus colubriformis*.

α)

Test Statistics^{a,b}

	Fecundity
Chi-Square	17.914
df	3
Asymp. Sig.	0.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Group

β)

Test Statistics^{a,b}

	Fecundity
Chi-Square	33.488
df	3
Asymp. Sig.	0.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Group

Συμπληρωματικός Πίνακας 5.11. Ανάλυση Tukey HSD για το είδος α) *Haemonchus contortus* και β) *Trichostrongylus colubriformis*

α)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Fecundity *Haemonchus contortus*

Tukey HSD

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	CaBP	146.167*	42.666	0.004	35.74	256.59
	S	163.520*	44.509	0.002	48.32	278.72
	CaBP+S	188.500*	42.666	0.000	78.07	298.93
CaBP	Control	-146.167*	42.666	0.004	-256.59	-35.74
	S	17.353	44.509	0.980	-97.84	132.55
	CaBP+S	42.333	42.666	0.754	-68.09	152.76
S	Control	-163.520*	44.509	0.002	-278.72	-48.32
	CaBP	-17.353	44.509	0.980	-132.55	97.84
	CaBP+S	24.980	44.509	0.943	-90.22	140.18
CaBP+S	Control	-188.500*	42.666	0.000	-298.93	-78.07
	CaBP	-42.333	42.666	0.754	-152.76	68.09
	S	-24.980	44.509	0.943	-140.18	90.22

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

β)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Fecundity *Trichostrongylus colubriformis*

Tukey HSD

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	CaBP	2.945*	1.029	0.024	0.28	5.61
	S	4.813*	1.033	0.000	2.14	7.49
	CaBP+S	6.424*	1.142	0.000	3.47	9.38
CaBP	Control	-2.945*	1.029	0.024	-5.61	-0.28
	S	1.869	0.982	0.230	-0.67	4.41
	CaBP+S	3.480*	1.096	0.009	0.64	6.32
S	Control	-4.813*	1.033	0.000	-7.49	-2.14
	CaBP	-1.869	0.982	0.230	-4.41	0.67
	CaBP+S	1.611	1.099	0.460	-1.24	4.46
CaBP+S	Control	-6.424*	1.142	0.000	-9.38	-3.47
	CaBP	-3.480*	1.096	0.009	-6.32	-0.64
	S	-1.611	1.099	0.460	-4.46	1.24

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.