

Ocena skuteczności rodentycydów

Badanie odporności gryzoni na rodentycydy o działaniu antykoagulacyjnym

Zakres

Niniejsza norma opisuje sposób prowadzenia badań odporności gryzoni na rodentycydy o działaniu antykoagulacyjnym.

Zatwierdzenie normy i poprawki

Po raz pierwszy zatwierdzona we wrześniu 1995.

Wprowadzenie

Wskaźniki, co do podatności lub odporności¹ gryzoni na rodentycydy o działaniu antykoagulacyjnym zostały już wcześniej opublikowane (OMS/WHO, 1982). Dokument ten opisuje ogólne zasady, które powinny mieć zastosowanie podczas badania gryzoni na odporność względem rodentycydów. Został on oparty głównie na doświadczeniach z użyciem rodentycydów o działaniu antykoagulacyjnym pierwszej generacji (np. warfaryny, komatetralylu). Najnowsze dane wskazują na fakt, że do zdefiniowania i wykrycia odporności na rodentycydy o działaniu antykoagulacyjnym drugiej generacji (np. bromadiolon, difenacoum) potrzebne jest bardziej złożone podejście. Norma ta ma na celu zidentyfikowanie metody oceny wyjściowego wskaźnika odporności na rodentycydy o działaniu antykoagulacyjnym drugiej generacji. Opisane jest zastosowanie badań określonych już dla gryzoni współżerujących, głównie szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*). Celem niniejszej normy jest standaryzacja definicji odporności i badań odporności wśród podmiotów członkowskich EPPO.

Przyczynkiem dla rozpoczęcia badań odporności gryzoni jest zazwyczaj pojawienie się problemu niemającego definiowalnej przyczyny. Wykrycie lub identyfikacja gryzoni odpornych na działanie rodentycydów przy pomocy badań laboratoryjnych

opisanych w niniejszej normie nie oznacza jednak, że badania kontrolne zakończą się niepowodzeniem. W niektórych przypadkach, stopień odporności może być wystarczająco niski do przeprowadzenia pomyślnego zwalczania, jeśli rodentycyd jest podawany zgodnie z załączonymi zaleceniami. Do ujęcia liczbowego współczynników odporności, dziedziczenia i wpływu stanu odporności na skuteczność zwalczania potrzebne są dodatkowe badania.

1. Metody badania odporności gryzoni na rodentycydy o działaniu antykoagulacyjnym.

1.1 Badania pokarmowe z użyciem trucizny

Podstawą niniejszych badań jest określenie krytycznej dawki rodentycydu, śmiertelnej dla 99 proc. badanej populacji. Rodentycydy są podawane w pokarmie, a odpowiednia dawka jest ustalana poprzez podawanie pokarmów zawierających rodentycydy przez zmienną liczbę dni. Gryzonie najbardziej podatne na działanie antykoagulantów zdychają w ciągu 21 dni po zakończeniu podawania pokarmu zawierającego rodentycydy. Odporne gryzonie pomimo spożywania dużych ilości przynęty podczas okresu karmienia nie zdychają (OMS/WHO, 1982).

1.2 Badania reakcji na krzepliwość krwi

Rodentycydy o działaniu antykoagulacyjnym hamują metabolizm wątrobowy witaminy K, potrzebnej do zamiany kwasu glutaminowego w pozostałości kwasu

γ -carboksylglutaminowego, w zależne od witaminy K proteiny, powodujące krzepnięcie krwi. Powodujące krzepnięcie krwi proteiny albo nie są wydzielane do krwiobiegu, albo ich działanie jest ograniczone. Zachodzą mechanizmy obronne, o których wiemy, że hamują przyswajanie witaminy K i jej metabolizm u odpornych szczurów, w porównaniu ze szczurami podatnymi. Tak więc poprzez zmierzenie reakcji krzepliwości krwi zwierząt w odpowiedzi na działanie antykoagulantu, i porównanie z poziomem krzepliwości przed podaniem preparatu, można dokonać rozróżnienia pomiędzy gryzoniami odpornymi na

¹ Aby w sposób spójny stosować termin "odporny" i "odporność" na innych obszarach stosowania środków ochrony roślin, odporne na działanie rodentycydów gryzonie powinny być w stanie przeżyć stosowane dawki, które uśmierciłyby "zwyczajne" lub "nieodporne" osobniki. Dodatkowo, cecha ta powinna być dziedziczna. Tak więc wykrycie i identyfikacja gryzoni odpornych na działanie antykoagulantów, wymaga uprzedniej charakterystyki podatności ogółu populacji (OMS/WHO, 1982). Ze względów praktycznych, dawka ta jest często określana jako dawka krytyczna, która może być zwyczajowo podawana gatunkom szkodników lub w przypadkach, gdy dowody wskazują na pojawienie się u zwierząt cechy odporności. Laboratoryjna dokumentacja odporności nie musi jednak oznaczać spadku skuteczności preparatu.

działanie antykoagulantów i podatnymi na działanie tych substancji. Zaletą takich badań jest przede wszystkim możliwość szybszego niż w testach pokarmowych uzyskania wyników, a reakcja ilościowa pozwala na estymację stopnia odporności zarówno poszczególnych zwierząt, jak i populacji. Aby uzyskać bardziej szczegółowe dane, można podawać zwierzętom również witaminę K w formie, która będzie działać jako antidotum u gryzoni odpornych, lecz niepodatnych na działanie substancji (Martin *et al.*, 1979; Gill *et al.*, 1993; MacNicol & Gill, 1993).

1.3 Gromadzenie danych wyjściowych przed rozpoczęciem testów pokarmowych z podawaniem trucizny

Podstawowa metodologia powinna być jednoznaczna z opisaną przez OMS/WHO (1982); jedynym wyjątkiem jest to, że w badanej grupie zamiast 20 zwierząt jednej płci powinno znaleźć się jedynie 10. Należy też zastosować następujące kryterium – każde zwierzę, które pierwszego dnia badania spożyło małą ilość przynęty (<20%), w porównaniu z pokarmem nieskażonym, jaki przyjmowało wcześniej, powinno zostać wykluczone z badań. Pokarmy zawierające antykoagulanty drugiej generacji powinny zostać przygotowane z wykorzystaniem rodentycydów. Antykoagulanty drugiej generacji są związkami rozpuszczalnymi w tłuszczach i mogą nie ulec rozpuszczeniu w przewodzie żołądkowo-jelitowym i tym samym w ogóle nie ulec rozpuszczeniu. Rozwiązaniem może być najpierw rozpuszczenie antykoagulantu w triethanolaminie, a następnie rozcieńczenie 99 objętościami polietylenu glikolu 200 (Załącznik I).

Zaaplikowana dieta nie powinna być jednoziarnista, tak jak ta używana podczas doświadczeń w warunkach polowych, lecz powinna charakteryzować się pełnym działaniem odżywczym. Ilość witaminy K1 i K3 w pożywieniu powinna zostać zredukowana do minimum, a następnie podawana w tych samych ilościach podczas trwania całego badania. Witamina K1 zniweluje działanie antykoagulacyjne rodentycydów, zarówno w przypadku gryzoni podatnych, jak i odpornych na działanie substancji. Witamina K3 w pokarmie podziela jako antidotum w przypadku *Rattus norvegicus* (Szczura wędrownego) odpornego na działanie antykoagulacyjne (MacNicol & Gill, 1993b), lecz nie na odmianę gatunkową myszy domowej *Mus musculus domesticus* (Marshall & Sage, 1981). Nie ma żadnych dostępnych informacji co do wpływu substancji na inne odmiany gatunkowe myszy domowej. Wiele rodentycydów drugiej generacji o działaniu antykoagulacyjnym działa śmiertelnie na gryzonie w pełni podatne na te środki, już po jednym dniu przyjmowania pokarmu. Stężenie antykoagulantu powinno być dobrane w taki sposób, aby część podatnej na jego działanie populacji przeżyła 4 – 6 dni karmienia pokarmem zawierającym substancję. Jest to niezbędne do pozyskania danych wystarczających do sporządzenia wiarygodnej analizy i obliczeń dotyczących okresów karmienia ze skutkiem śmiertelnym. Aby stwierdzić stężenie substancji powodujące śmierć u 99 proc. jednostek populacji

podatnej na działanie substancji, po jednym dniu karmienia (LC99), stężenie rodentycydu powinno być inne podczas każdego badania, przeprowadzanego jako seria ograniczonych badań pokarmowych. Ilość pokarmu zawierającego rodentycydy podawana każdemu osobnikowi powinna być niewiele niższa niż spodziewane, zwyczajowe dzienne spożycie pokarmu oraz waga osobnika – zapewni to spożycie całości pokarmu.

1.4 Gromadzenie danych wyjściowych przed rozpoczęciem badań nad reakcją na krzepliwość krwi

Należy przygotować roztwór antykoagulantu, odpowiedni do podawania doustnego. W przypadku warfaryny, może to zostać osiągnięte poprzez użycie rozpuszczalnej w wodzie soli (3.1). W przypadku antykoagulantów drugiej generacji, do sporządzenia roztworu można użyć detergentu (3.2). Należy też przygotować wodny roztwór MSB (menadione sodium bisulphite) lub innej rozpuszczalnej w wodzie soli menadionu (witaminy K3). Przed rozpoczęciem podawania substancji pobiera się próbki krwi i oblicza % aktywność krzepliwości krwi (PCA) (patrz Załącznik II) dla grup składających się z dziesięciu samców i dziesięciu samic, podatnych na działanie dowolnej dawki antykoagulantu. Roztwory rodentycydu o działaniu antykoagulacyjnym (Załącznik II) są podawane przez doustną intubację przy lekkim znieczuleniu ogólnym. Wielkość podawanej dawki zależy od gatunku i rodzaju antykoagulantu. Probki krwi należy pobrać po 24 i 96 godzinach od podania substancji, a następnie obliczyć % aktywności krzepliwości krwi. U zwierząt, na które zadziała podana dawka antykoagulantu, wartość % aktywności krzepliwości krwi znajdzie się poniżej wartości arbitralnej (np. 10 proc. wartości odnotowanej przed podaniem substancji). Wybór odstępów 24 lub 96 godzin dla zbadania osobników jest zależny od typu antykoagulantu. Pojedyncza dawka warfaryny zmniejszy % aktywność krzepliwości krwi po 24 godzinach, ale przez wpływem 96 godzin aktywność krzepliwości powróci do normy. W przypadku antykoagulantów drugiej generacji, pojedyncza dawka zmniejszy % aktywność krzepliwości krwi u podatnych gryzoni w przypadku obu odstępów czasowych.

1.5 Ocena dawki krytycznej

Zarówno w przypadku badań pokarmowych z podaniem trucizny, jak i badań reakcji na krzepliwość krwi, należy obliczyć dawkę, która będzie śmiertelna dla 99 proc. podatnej populacji, reagującej na działanie substancji (śmiercią lub mniejszą niż oznaczona % aktywnością krzepliwości krwi). Instrukcje OMS/WHO (1982) wskazują na zastosowanie analizy typu probit (Finney, 1971), lecz inne metody statystyczne mogą okazać się równie uzasadnione i również mogą zostać użyte, jeśli istnieje uzasadniony powód ich zastosowania². Niezależnie od użytej

² Analiza komparatywna kilku krzywych wskazujących reakcję na dawkę przy użyciu zarówno analiz typu probit, jak i logit pokazała, że w niektórych

metody analitycznej, dla najmniej pięciu dawek (lub okresów karmienia) powinny znaleźć się osobniki reagujące i niereagujące na działanie substancji. Obliczenia dla samców i samic wybranych gatunków powinny być sporządzane oddzielnie. Jeśli nie występują statystycznie istotne różnice pomiędzy płciami, dane mogą zostać zsumowane. W przypadku badania pokarmowego z podawaniem trucizny, będzie niezbędne ze względów praktycznych, aby okres karmienia został przedłużony o cały dzień ponad kalkulowaną dawkę. W testach badających reakcje na krzepliwość krwi, można również podwyższyć dawkę do poziomu niewymagającego wysokiej dokładności ważenia. W obu przypadkach zaowocuje to ostrożnymi ocenami co do wysokości dawki śmiertelnej, co w konsekwencji zmniejszy prawdopodobieństwo błędów.

2. Opublikowane badania dotyczące odporności szczura wędrownego *Rattus norvegicus* na rodentycydy o działaniu antykoagulacyjnym

Informacje zawarte poniżej (oraz w Sekcji 3) są zbiorem opublikowanych już wyników, które niekoniecznie są zgodne z niniejszą normą, ale zawarte w nich dane mogą okazać się przydatne.

2.1 Odporność na działanie warfaryny

Badanie oceniające dawkę śmiertelną substancji zostało obliczone na okres trwania 6 dni i podawania 0,005% dawki warfaryny (OEPP/EPPO, 1967; Drummond & Wilson, 1968). Poziom wyjściowy został opracowany na podstawie badań na podatnych szczurach, żyjących w jednym rejonie, zaś przynęta (niebędąca pełnowartościowym pokarmem) została przygotowana z suchej mieszanki, a nie roztworu.

Mieszanka wzorcowa warfaryny została przygotowana poprzez wymieszanie 0,1 g warfaryny (substancji technicznie aktywnej) z 99,9 g mąki razowej, a 50 g tej mieszanki wzorcowej zostało wymieszanych z 950 g mąki owsianej, do uzyskania ostatecznego stężenia warfaryny o wysokości 0,005% (OEPP/EPPO, 1975). Szczury zostały zważone, umieszczone w osobnych klatkach i karmione mieszanką (19:1) przez 3 dni. Przez 6 dni, pod koniec każdego dnia mierzono spożycie rodentycydu, zanim resztki zostały odsypane do pojemnika na żywność. Dieta zawierająca truciznę została zastąpiona zwyczajnym pokarmem laboratoryjnym, a wskaźniki przeżycia były monitorowane przez okres do 30 dni po zakończeniu badania, (choć w praktyce wystarczający jest okres 21 dni). Przez okres karmienia i obserwacji, szczurom podawano czystą wodę, niewzbogaconą żadnymi substancjami. Szczury odporne na działanie warfaryny przeżyły, pomimo spożycia pokarmu w dniach 5 i 6,

którego stężenie było o 50 proc. wyższe niż w dniach 1 i 2 (Drummond & Wilson, 1968).

2.2 Odporność na działanie difenacoum

Badanie pokarmowe zostało zaplanowane na okres 5 dni, w trakcie których podawano difenacoum o stężeniu 0,005% (Redfern & Gill, 1978). Poziom wyjściowy dla badanych gatunków nie został określony na podstawie obecnej normy, jako że w badaniu brały również udział szczury odporne na działanie warfaryny, dieta nie była pełnowartościowym pożywieniem dla tego gatunku, a difenacoum zostało podane w formie suchej mieszanki, a nie roztworu.

Mieszanka wzorcowa difenacoum została przygotowana poprzez wymieszanie 0,1 g difenacoum (substancji technicznie aktywnej) z 99,9 g mąki razowej, a 50 g tej mieszanki wzorcowej zostało wymieszanych z 950 g mąki owsianej, tak, aby uzyskać ostateczne stężenie difenacoum wysokości 0,005%. Badania pokarmowe zostały przeprowadzone w sposób opisany powyżej (2.1). Dieta zawierająca truciznę została zastąpiona zwyczajnym pokarmem laboratoryjnym, a wskaźniki przeżywalności były monitorowane przez 21 dni po zakończeniu badania. Szczury odporne na działanie difenacoum przeżyły po spożyciu pokarmu w dniach 4 i 5, w którym stężenie było o 50 proc. wyższe niż w dniach 1 i 2 (Drummond & Wilson, 1968).

2.3 Odporność na działanie brodifacoum

Badanie oceniające dawkę śmiertelną substancji zostało obliczone na okres 7 dni karmienia brodifacoum o stężeniu 0,0005% (Gill & MacNicol, 1991). Poziom wyjściowy dla wybranych gatunków nie został opracowany zgodnie z normą, jako że dieta nie była pełnowartościowym pożywieniem, a brodifacoum zostało podane w formie suchej mieszanki, a nie roztworu.

Mieszanka wzorcowa o wadze 10 mg została przygotowana ze 100 g maki razowej, a 50 g mieszanki wzorcowej zostało wymieszanych z 950 g mąki owsianej, aby uzyskać ostateczne stężenie brodifacoum o wysokości 0,0005%. Badania pokarmowe zostały przeprowadzone w sposób opisany powyżej (2.1). Szczury odporne na działanie brodifacoum przeżyły pomimo spożycia w 6 i 7 dniach badania o 50 proc. więcej pokarmu niż w dniach 1 i 2 (Drummond & Wilson, 1968). Ponieważ stężenie brodifacoum wykorzystane w tym badaniu jest niższe, niż to, które było zazwyczaj stosowane w doświadczeniach polowych, szczury, które okazały się odporne na działanie brodifacoum podczas badań laboratoryjnych, mogą zdechnąć podczas praktycznych badań na obiektach kontrolnych.

3. Opublikowane badania nad odpornością szczura wędrownego *Rattus norvegicus* na obniżoną krzepliwość krwi

Badania reakcji na krzepliwość krwi szybko dostarczają wyników dotyczących odporności na działanie substancji, zachodzi również związek

przypadkach analiza typu probit dostarczyła bardziej miarodajny wykres krzywej, choć w innych przypadkach lepiej sprawdziła się analiza typu logit. Analizy probit lub logit zazwyczaj dostarczają innych ocen dot. Reakcji w 99 proc. przypadków. Choć ekstrapolacja transformacji probit i logit nie jest najlepszą do identyfikacji dawki krytycznej dla 99 proc. Przypadków, są one najlepszymi dostępnymi obecnie metodami analizy statystycznej.

odwrotny pomiędzy istotą reakcji a stopniem odporności. Ssaki podatne na działanie substancji nie powinny zdechnąć, i mogą zostać później wykorzystane w badaniach na odporność względem innych antykoagulantów. W trakcie następujących badań należy uważnie porównywać reakcje na krzepliwość krwi z poziomem krzepliwości w spoczynku, mierzonym przed podaniem każdego z antykoagulantów.

3.1 Odporność na warfarynę

Martin et al. (1979) opracował unikalną metodę badania odporności szczurów na działanie warfaryny; metoda ta została później uzupełniona (MacNicoll & Gill, 1993a). Na potrzeby metody, która opracował Martin et al. (1979), wolną zasadę warfaryny (0.125 g) należy rozpuścić w niewielkiej objętości roztworu wodorotlenku sodu (1 M), a następnie zneutralizować do odczynu pH 7.0. Roztwór chlorku sodu (0,85%, w/v) został dodany do uzyskania ostatecznej objętości 100 ml. 0,025 g witaminy K1 2,3-epoksydu (nieдоступnego w regularnej sprzedaży) zostało rozpuszczone najpierw przez wymieszanie z 0.4 g detergentu Tween 80, a później przez dodanie 25 ml roztworu chlorku sodu (0,85%, w/v). Roztwór warfaryny (100 mL) i roztworu witaminy K1 2,3-epoksydu (25 ml) zostały wymieszane, aby uzyskać końcowe stężenie o wysokości odpowiednio 1,0 i 0,2 g na ml⁻¹. Roztwór został podany poprzez wstrzyknięcie do otrzewnej szczura (0,5 ml na 100 g masy ciała) pod lekkim znieczuleniem, a % aktywność krzepliwości krwi została zbadana po upływie doby (Załącznik II). Szczury o % aktywności krzepliwości krwi wyższym, niż 17 proc. po 24 godzinach były klasyfikowane jako odporne na działanie warfaryny. Przez czas badania, szczurom podawano czystą, niewzbogaconą wodę.

Zweryfikowana metoda opracowana przez MacNicoll & Gill (1993a) zamienia witaminę K1 2,3-epoksydu na rozpuszczalny w wodzie i dostępny w regularnej sprzedaży menadion sodium bisulphite (MSB; witamina K3), oraz na rozpuszczalną w wodzie warfarynę sodowaną. Warfaryna sodowana (0,136 g) została rozpuszczona w roztworze 100 ml roztworu sodium chloride (0,85%, w/v). MSB (0,025 g) został rozpuszczony w 25 ml roztworu chlorku sodu (0,85%, w/v). Oba roztwory (100 ml i 25 ml) zostały wymieszane w taki sposób, że ostateczne stężenia wyniosły 1,08 mg mL⁻¹ warfaryny sodowanej i 0.2 mg mL⁻¹ MSB. Roztwór został podany szczurom doustnie (0,5 ml na 100 g masy ciała) pod lekkim znieczuleniem, a % aktywność krzepliwości krwi zmierzona po upływie doby (Załącznik II). Tak jak w przypadku poprzednich badań, szczury, u których % aktywność krzepliwości krwi była wyższa niż 17 proc., zostały uznane za odporne na działanie warfaryny. Podczas badania, szczurom podawano wodę wzbogaconą MSB.

3.2 Odporność na difenacoum

Badania reakcji na krzepliwość krwi, określające stopień odporności szczurów na difenacoum zostały

opublikowane (Gill et al., 1993) w oparciu o aktywność krzepliwości, zmierzoną po upływie 96 godzin po podaniu pojedynczej dawki difenacoum. Dawka ta została dobrana na podstawie korelacji statusu odporności poprzez reakcje na aktywność krzepliwości krwi na przeprowadzane badania pokarmowe stwierdzające odporność na difenacoum (Redfern & Gill, 1978; 2.2).

Difenacoum (0,125 g) zostało rozpuszczone w 2 mL trójchlorometanu, razem z 0,4 g detergentu Tween 80. Trójchlorometan został usunięty strumieniem azotu lub stężonego powietrza, a do roztworu dodano silnie mieszając 100 ml separowanego fosfatu soli fizjologicznej (phosphate-buffered saline - PBS). MSB (0,05 g) został rozpuszczony w 25 ml PBS, po czym oba roztwory wymieszano, tak że ostateczne stężenia miały wartość 1 mg mL⁻¹ difenacoum i 0,4 mg mL⁻¹ MSB. Roztwór został podany szczurom doustnie (0.5 mL na 100 g masy ciała) a % aktywności krzepliwości krwi został obliczony na podstawie próbek krwi podanych po upływie 96 godzin (Załącznik II). Szczury, u których % aktywność krzepliwości krwi miała wartość wyższą niż 10 proc., zostały uznane za odporne na działanie difenacoum. W trakcie badania, zwierzętom podawano wodę wzbogaconą MSB. Porównawcze dane dla tego badania (Gill et al., 1993) wskazywały, że zwierzęta, u których % aktywności krzepliwości krwi zmierzony po 96 godzinach był bliski poziomowi zarejestrowanemu przed badaniem, mogą zostać uznane za posiadające wyższy stopień odporności na difenacoum, niż zwierzęta, u których poziom ten wynosi od 10 do 20 proc.

3.3 Odporność na bromadiolon

Badanie reakcji na krzepliwość krwi, określające stopień odporności szczurów na bromadiolon zostało już opublikowane (Gill et al., 1994). W czasie badania stosowano oddzielne dawki dla samców i samic, które zostały dobrane poprzez obliczenie ED99 potrzebnego do zmniejszenia % aktywności krzepliwości krwi poniżej 10 proc. zwyczajowego poziomu. Zwierzęta wykorzystane do badań poziomu wyjściowego były szczepem wyhodowanym w warunkach laboratoryjnych, a nie podatnymi na działanie antykoagulantu szczurami odłowionymi w warunkach naturalnych, jak opisano to powyżej (1.3).

Przygotowano osobne roztwory bromadiolonu do podania samcom i samicom. Bromadiolon (0.025 g i 0.06 g) został rozpuszczony w 2 ml trójchlorometanu razem z 0.4 g detergentu Tween 80. Trójchlorometan został usunięty strumieniem azotu lub powietrza pod ciśnieniem, po czym energicznie mieszając do roztworu dodano 100 ml PBS. MSB (0.5 g) został rozpuszczony w 50 ml PBS, a 25 ml wymieszane ze 100 ml każdego z obu roztworów bromadiolonu. Wysokość ostatecznych stężeń wyniosła 0.2 mg mL⁻¹ i 0.48 mg mL⁻¹ bromadiolonu odpowiednio dla samców i samic. W obu przypadkach stężenie MSB wyniosło 2.0 mg mL⁻¹. Roztwory podano szczurom doustnie (0.5 ml na 100 g masy ciała) pod lekkim znieczuleniem, a wartość % aktywności krzepliwości krwi zostały obliczone na

podstawie próbek krwi pobranych po upływie 96 godzin. Szczury, u których % aktywność krzepliwości przekroczyła 10 proc., zostały uznane za odporne na działanie bromadiolonu. Podczas badania zwierzętom podawano wodę wzbogaconą MSB. Tak jak w przypadku badań stwierdzających reakcje na krzepliwość krwi i tym samym odporność na difenacoum, porównywalne dane (Gill et al., 1994) wskazują, że wyższa wartość % aktywności krzepliwości krwi ma związek z wyższym stopniem odporności na bromadiolon.

4. Opublikowane wyniki badań pokarmowych z użyciem rodentycydów o działaniu antykoagulacyjnym na szczurze śniadym *Rattus rattus*

Odporność na warfarynę

Badanie pokarmowe dotyczące krytycznej dawki rodentycydu zostało opracowane na okres 28 dni podawania warfaryny o stężeniu 0.025% (Greaves et al., 1976). Przynęta, niebędąca pełnowartościową karmą, została przygotowana z suchej mieszanki, a nie roztworu.

Mieszanka wzorcowa warfaryny została przygotowana przez wymieszanie (OEPP/EPPO, 1975) 0,50 g warfaryny (substancji aktywnej technicznie) z 99,50 g mąki razowej, a 50 g mieszanki wzorcowej zostało wymieszane z 950 g mąki owsianej, tak, aby otrzymać ostateczne stężenie warfaryny o wysokości 0.025%. Badanie pokarmowe zostało przeprowadzone tak, jak to opisano powyżej (2.1). Dieta zawierająca rodentycyd została zastąpiona zwyczajową dietą laboratoryjną po 28 dniach badania. Szczury odporne na działania warfaryny przeżyły co najmniej 14 dni po zakończeniu badania pokarmowego.

5. Badania nad odpornością myszy domowej *Mus musculus domesticus* na działanie rodentycydów

Badania nad krytyczną dawką warfaryny dla gatunku myszy domowej zostały oparte na danych dotyczących zwyczajów pokarmowych gatunku, pozyskanych z badań przeprowadzonych w Wielkiej Brytanii (Rowe & Redfern, 1964). Myszy odporne na działanie warfaryny przeżyły okres karmienia warfaryną o stężeniu 0,025% przez 21 dni. Zaleca się, aby ta określona dawka krytyczna nie była podawana w krajach innych niż Wielka Brytania, ponieważ w różnych krajach Europy żyją różne podgatunki myszy domowej (Marshall & Sage, 1981). Warto natomiast zbierać dane dotyczące wskaźnika wyjściowego, tak jak opisano to powyżej (1.4, 1.5), używając reprezentatywnych osobników myszy domowej, aby móc prawidłowo dobrać badania nad dawką krytyczną rodentycydu.

6. Identyfikowanie i pobieranie próbek od podatnych osobników

Ogólne zasady opisane wcześniej (OMS/WHO, 1982) powinny zostać również stosowane w pobieraniu próbek potrzebnych do zebrania wyjściowych danych od żyjących na wolności zwierząt. Istotnym warunkiem jest, aby badane zwierzęta pochodziły z różnych okolic;

najlepiej jednak, gdyby „zestaw badań został przeprowadzony na zwierzętach z wielu różnych populacji. Populacje, z których wybiera się zwierzęta do ustalenia wskaźnika wyjściowego, powinny otrzymywać przed rozpoczęciem badań najmniej jak to tylko możliwe antykoagulantów, przy czym nie powinny być spożywać ich w ogóle w ciągu sześciu miesięcy poprzedzających badanie”. Dodatkowo, gryzonie powinny być podatne na działanie wszystkich koagulantów, jako że gryzonie odporne na jeden rodzaj antykoagulantu, mogą w pewnym, choć niewielkim stopniu, być odporne krzyżowo na inne antykoagulanty. Może to doprowadzić do błędnych ocen dawek krytycznych.

W niektórych krajach może okazać się trudnym znalezienie takiej populacji gryzoni, która z pewnością jest podatna na działanie antykoagulantów i nie zetknęła się z nimi w ciągu poprzedzającego półrocza. Można temu zaradzić hodując w warunkach laboratoryjnych populację gryzoni, o których wiadomo, że są podatne na działanie antykoagulantów, a pochodzących od okazów żyjących na wolności, schwytanych w miejscach o jak największym zróżnicowaniu. Warunki kojarzenia osobników powinny wpływać na jak największe zróżnicowanie genetyczne wewnątrz populacji, na przykład poprzez unikanie kojarzenia rodzeństwa.

Niektóre gryzonie odporne na działanie warfaryny wykazują zwiększone zapotrzebowanie na witaminę K (Hermodson et al., 1969). Dzikie gryzonie przez kilka dni po schwytaniu znajdują się pod wpływem stresu, a niektóre odporne osobniki mogą zdychać z powodu braku witaminy K. Problem ten w przypadku gatunku *Rattus norvegicus* (szczura wędrownego) został rozwiązany poprzez dodawanie witaminy K3 (menadione sodium bisulphite) w ilości 100 mg L⁻¹. Woda pitna wzbogacana w ten sposób powinna być świeża, przygotowywana co 3 – 4 dni.

7. Sekwencyjne badanie odporności na rodentycydy o działaniu antykoagulacyjnym

Istnieją poważne dowody na to, że obecność rodentycydów o działaniu antykoagulacyjnym może zostać wykryta w wątrobach zarówno gatunków ssaków, jak i ptaków w kilka tygodni po podaniu. Nie jest jednak jasne, jak te pozostałości wpływają na funkcje krzepliwości krwi, lub jednocześnie działanie tego samego lub innego antykoagulantu. Często zachodzi potrzeba badania tych samych osobników na odporność wobec kilku rodentycydów o działaniu koagulacyjnym, aby ustalić, zastosowanie którego z nich da najlepsze rezultaty. W tym przypadku jako pierwsze powinny zostać przebadane antykoagulanty pierwszej generacji (np. coumatetralyl, diphacinon lub warfaryna). Jeśli któreś z gryzoni są odporne na te składniki, powinny zostać następnie przebadane na odporność wobec antykoagulantów drugiej generacji (bromadiolon lub difenacoum). Na ostateczną grupę składników do przebadania powinny składać się pojedynczo podawane rodentycydy o działaniu antykoagulacyjnym (brodifacoum, difethialon lub flocoumafen). Pomiędzy badaniami odpornościowymi

należy zostawić co najmniej trzytygodniowe odstępy, by zwierzęta mogły powrócić do zwykłego poziomu krzepliwości krwi³. Razem z badaniami pokarmowymi, zbiegają się one w czasie z trzytygodniowym okresem obserwacji. Krótsze okresy odpoczynku mogą być stosowane podczas badań reakcji na krzepliwość krwi, ze względu na niższy poziom stosowanych dawek. Jednak przed rozpoczęciem kolejnego badania należy sprawdzić, czy organizm zwierzęcia powrócił do pierwotnego poziomu krzepliwości krwi.

8. Interpretacja badań na odporność

Najlepszym rozwiązaniem jest stosowanie badań na odporność wobec rodentycydów o działaniu antykoagulacyjnym do rutynowego zwalczania populacji polowych. Możliwa byłaby wtedy identyfikacja i eliminacja populacji z odpornymi osobnikami. Jest jednak bardziej prawdopodobne, że takie badania będą stosowane w celu stwierdzenia, czy fizjologiczna odporność jest czynnikiem wpływającym na niepowodzenie działań dotyczących zwalczania. Należy również pamiętać, że około 1 proc. gryzoni podatnych na działanie rodentycydów, zostanie błędnie zakwalifikowanych do grupy odpornej na działanie substancji. W każdym przypadku wykrycia nieznanego wcześniej typu odporności, w zależności od gatunku, umiejscowienia geograficznego lub użytego rodentycydu, przypadek taki winien zostać potwierdzony podczas badań rozmnażania osobników w warunkach laboratoryjnych tak, aby wykazać dziedziczność tej cechy. Dodatkowo, czynniki odporności powinny zostać oszacowane dla gryzoni odpornych w odniesieniu do zwyczajowej, podatnej na działanie substancji populacji gatunku.. Wysokość współczynnika odporności może zostać wykorzystana jako wskaźnik odporności w próbie kontrolowanego niepowodzenia. Rzeczywisty wpływ na działania przeprowadzane w praktyce jest bardzo trudny do określenia, z powodu wielu zróżnicowanych czynników mogących wpływać na sukces badań polowych. Nawet niewielki czynnik odporności może mieć pewien wpływ, powodując wzrost spożycia przynęty w ilości niezbędnej do dawki śmiertelnej.

9. Przyszłe osiągnięcia

Dopóki antykoagulanty będą składnikiem najczęściej używanym do regulacji liczebności gryzoni, dopóty wymagane będą badania odporności na nie. Badania reakcji na krzepliwość krwi mają wiele zalet w porównaniu z badaniami pokarmowymi z podawaniem substancji trujących, biorąc pod uwagę badania sekwencyjne, humanitarność oraz pozyskiwanie informacji na temat stopni odporności. Badania pokarmowe z użyciem substancji trujących pozostają jednak istotnymi metodami wyodrębniania gryzoni odpornych i nieodpornych. Trwające badania mogą prowadzić do nowych testów, począwszy od badań na

³ Doświadczenie wskazuje jednak, że okres ten może być wydłużony lub skrócony, zależnie od użytego antykoagulantu, gatunku gryzoni oraz odporności badanych zwierząt.

śmiertelność, przeprowadzanych przez wstrzykiwanie dawek śmiertelnych, po przeprowadzanie badań genetycznych, celem wyodrębnienia osobników noszących geny odporne na działanie omawianych substancji. Pewnego nakładu pracy wymaga również określenie korelacji czynników odporności obliczonych podczas badań laboratoryjnych kontrolowanego sukcesu i porażki. Przyszły rozwój rodentycydów niedziałających w sposób koagulacyjny będzie potencjalnie prowadzić do wyodrębnienia nowej grupy metod badania odporności. Niemniej jednak, zasady wyszczególnione w niniejszej normie powinny mieć zastosowanie w odniesieniu do tych nowych obszarów.

ZAŁĄCZNIK I

Przygotowanie pokarmu na potrzeby badania

Niektóre przynęty zawierające rodentycydy o działaniu antykoagulacyjnym drugiej generacji przygotowywane są ze stężonych roztworów polietylenu glikolu: triethanolaminy (99:1). Jeśli jest to konieczne, roztwory te można przygotować z materiałów krystalicznych, jak opisano poniżej (MacNicoll & Gill, 1993b). Odpowiednia dawka antykoagulantu w formie krystalicznej jest rozpuszczana w 1 ml triethanolaminy i 2-3 ml polietylenu glikolu 200 poprzez mieszanie i delikatne podgrzewanie do temperatury 60°C. W ten sposób powstaje 100 ml roztworu z polietylenem glikolu 200. Jeśli jest to możliwe, roztwory powinny być świeżo przygotowywane; jeśli nie jest to możliwe, substancje muszą być przechowywane w ciemnych pomieszczeniach, aby nie dopuścić do zajścia fotolizy. Najlepszym miejscem do przechowywania będzie chłódnia. Materiał badawczy jest przygotowywany poprzez wymieszanie 50 ml rodentycydu z 1 kg pokarmu, będącego pełnowartościowym pożywieniem dla określonego gatunku gryzoni. Najlepiej użyć pokarmu laboratoryjnego lub pokarmu przeznaczonego dla świń lub drobiu. Skład diety powinien zostać rejestrowany, zwłaszcza zawartość witaminy K, która zgodnie z założeniami nie powinna przekraczać 2 mg kg⁻¹ diety (MacNicoll & Gill, 1993b). Ten sam pokarm powinien być użyty do ustalenia wskaźnika wyjściowego reakcji gatunku i wszystkich przyszłych zastosowań testu badającego odporność.

ZAŁĄCZNIK II

Badania reakcji na krzepliwość krwi

Przygotowanie roztworów rodentycydów o działaniu antykoagulacyjnym

Wodny roztwór warfaryny może zostać pozyskany dzięki użyciu soli warfaryny lub wolnej zasady rozpuszczonej w zasadzie (MacNicoll & Gill, 1993a). Roztwór antykoagulantów drugiej generacji może zostać przygotowany z glikolu polietylenu i triethanolaminy (99:1), tak jak zostało to opisane w Załączniku I, lub w wodzie za pomocą detergentu (3.2, 3.3; Gill *et al.*, 1993, 1994). Roztwory powinny być przygotowywane codziennie, tak, aby zachować świeżość.

Mierzenie reakcji krzepliwości krwi

Rodentycydy o działaniu antykoagulacyjnym niwelują koncentrację zależnych od witaminy K czynników odpowiadających za krzepnięcie krwi u gryzoni. Jest to taki sam efekt, jaki dają antykoagulanty stosowane w medycynie przy leczeniu zaburzeń krzepliwości krwi. Większość szpitalnych oddziałów hematologicznych jest zazwyczaj w posiadaniu zestawów do badania % aktywności krzepliwości krwi w pobranych próbkach krwi. Choć wykorzystywany do tych celów sprzęt jest automatyczny lub półautomatyczny, możliwe jest mierzenie czasów krzepnięcia krwi ze stoperem i kąpielą wodną o temperaturze 37°C. W praktyce, czasy krzepnięcia krwi u odpornych i nieodpornych na działanie rodentycydów gryzoni są łatwo odróżnialne, jeśli tylko dawka krytyczna została dobrana we właściwy sposób.

Próbki krwi (0.2 ml) pobierane są z żyły ogonowej szczurów lub pozaoczdolowej zatoki u myszy, pod znieczuleniem, i mieszane z 0.02 ml roztworu cytrynianu trójsodowego o stężeniu 3.13%, a następnie przechowywanego w lodzie. Odczynnik badania (np. badanie trombocytozy) prowadzony jest zgodnie z zaleceniami dostawcy o podawaniu substancji ludziom. Próbki krwi (0.05 ml), inkubowane wcześniej przez 3 do 5 min. w temperaturze 37°C, są dodawane do odczynnika (0.25 ml). Następnie mierzy się czas, który upłynie, zanim krew i odczynnik skrzepną. Jeśli jest to możliwe, pomiar czasu krzepnięcia każdej próbki krwi powinien być dokonywany trzy razy.

Każda porcja odczynnika badania na krzepliwość krwi nieco się różni, dlatego należy sporządzić standardowe wykresy czasu krzepnięcia w odniesieniu do % aktywności krzepnięcia dla każdej partii odczynnika, dla obu płci. Aby to osiągnąć, łączy się próbki krwi czterech samców i czterech samic podatnych na działanie warfaryny zwierząt, oddzielnie dla każdej płci. Połączone próbki są rozcieńczane cytrynianem salinu (0.77% w/v sodium chloride, 0.42% w/v tri-sodium citrate), aby uzyskać dane standardowe 100, 50, 25, 12.5 oraz 6.25% aktywności krzepnięcia. Standardowe wykresy sporządza się w oparciu o czasy krzepnięcia rozcieńczonych substancji połączonych w odniesieniu do odwrotności rozcieńczenia (1/% aktywności krzepnięcia), i umieszcza się wykresy w odniesieniu do prostej linii. Standardowe krzywe dla samców i samic są stosowane do przekształcenia czasów krzepnięcia krwi wobec % aktywności krzepnięcia.

Bibliografia

DRUMMOND, D.C. & WILSON, E.J. (1968) Laboratory investigations of resistance to warfarin of *Rattus norvegicus* in Montgomeryshire and Shropshire. *Annals of Applied Biology* **61**, 303-312.

FINNEY, D.J. (1971) *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press (GB).

GILL, J.E. & MACNICOLL, A.D. (1991) Determination of the susceptibility of wild populations of Norway rat (*Rattus norvegicus*) to the anticoagulant

rodenticide brodifacoum. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie* **78**, 101-117.

GILL, J.E., KERINS, G.M., LANGTON, S.D. & MACNICOLL, A.D. (1993) Development of a blood clotting response test for discriminating between difenacoum-resistant and susceptible Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **104C**, 29-36.

GILL, J.E., KERINS, G.M., LANGTON, S.D. & MACNICOLL, A.D. (1994) Blood clotting response test for bromadiolone resistance in Norway rats. *Journal of Wildlife Management* **58**, 454-461.

GREAVES, J.H., RENNISON, B.D. & REDFERN, R. (1976) Resistance of the ship rat, *Rattus rattus*, to warfarin. *Journal of Stored Product Research* **12**, 65-70.

HERMODSON, M.A., SUTTIE, J.W. & LINK, K.P. (1969) Warfarin metabolism and vitamin K requirement in the warfarin resistant rat. *American Journal of Physiology* **217**, 1316-1319.

MACNICOLL, A.D. & GILL, J.E. (1993a) Revised methodology for a blood-clotting response test for identification of warfarin-resistant Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **23**, 701-707.

MACNICOLL, A.D. & GILL, J.E. (1993b) Vitamin K3 in feedstuffs acts as an antidote to anticoagulant rodenticides in anticoagulant-resistant Norway rats. *Journal of Wildlife Management* **57**, 835-841.

MARSHALL, J.T. & SAGE, R.D. (1981) Taxonomy of the house mouse. *Symposium of the Zoological Society, London* **47**, 15-25.

MARTIN, A.D., STEED, L.C., REDFERN, R., GILL, J.E. & HUSON, L.W. (1979) Warfarin-resistance genotype determination in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Laboratory Animals* **13**, 209-214.

OEPP/EPPO (1967) A criterion for identifying warfarin-resistant individuals of *Rattus norvegicus*. *EPPO Publications Series A* no. 41, 45-48.

OEPP/EPPO (1975) Guidelines for the development and biological evaluation of rodenticides. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **5**, 7-20.

OMS/WHO (1982) Instructions for determining the susceptibility or resistance of rodents to anticoagulant rodenticides. *World Health Organization Technical Report Series* no. 843.

REDFERN, R. & GILL, J.E. (1978) The development and use of a test to identify resistance to the anticoagulant difenacoum in the Norway rat. *Journal of Hygiene* **81**, 427-431.

ROWE, F.P. & REDFERN, R. (1964) The toxicity of 0.025% warfarin to wild house mice (*Mus musculus*). *Journal of Hygiene* **62**, 389-393.