

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet  
Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap  
Institutt for sports- og familiedyrmedisin  
Seksjon for smådyrsykdommer

Fordypningsoppgave 2014, 16,5 stp  
Smådyr

## **Forekomst av superwarfariner hos hund**

### **- kartlegging av bakgrunnsnivåer i leverprøver hos obduserte hunder**

Prevalence of superwarfarins in dogs – a survey of  
background levels in liver samples of autopsied dogs

Forfattere: Sara Olerud, Jeanette Pedersen, Eiril Pettersen  
Kull 2009

Veiledere: Lars Moe, Andreas Lervik, Gjermund Gunnes,  
Jens Børsum

## Innhold

Forord .....	6
Sammendrag .....	7
Definisjoner .....	8
Innledning .....	9
Bakgrunn .....	12
Generelt om hemostase .....	12
Den klassiske koagulasjonskaskaden .....	12
Cellebasert koagulasjonsmodell .....	15
Vitamin K i hemostase .....	16
Påvirkning av hemostase ved rottegiftsforgiftning .....	16
Antikoagulerende rottegifter .....	18
Virkningsmekanismer til antikoagulerende rottegifter .....	19
Toksikokinetikk .....	20
Biotilgjengelighet .....	20
Distribusjon .....	20
Eliminasjon .....	21
Kliniske tegn hos hunder med rottegiftsforgiftning .....	24
Diagnostiske hjelpemidler .....	25
Behandling .....	27
Diagnostisk praksis i Norge .....	28
Lovverk og rottegiftsprodukter i Norge .....	29
Materiale og Metoder .....	31
Bakgrunnsinformasjon/litteraturodel .....	31

Analytisk del .....	31
Studiedesign .....	31
Statistisk analyse .....	33
Kjemikalier .....	33
Prøveopparbeiding .....	34
Kromatografi og massespektrometri .....	34
Resultater.....	36
Kjønnfordeling.....	36
Aldersfordeling.....	36
Kommunefordeling .....	37
Rasefordeling .....	37
Fordeling basert på sykdomsdiagnoser .....	38
Diskusjon.....	40
Kjønnfordeling.....	41
Aldersfordeling.....	42
Kommunefordeling .....	43
Rasefordeling .....	43
Fordeling basert på sykdomsdiagnoser .....	44
Hvordan får hundene i seg rottegift?.....	44
Konklusjon .....	48
Takk til bidragsytere.....	49
Summary .....	50
Referanser.....	52
Vedlegg 1 .....	58
Liste over koagulasjonsfaktorene.....	58

Vedlegg 2 .....	59
Figur 1, Intrinsic og extrinsic reaksjonsvei .....	59
Figur 2, Levermetabolisme av vitamin K.....	60
Figur 3, Forholdet mellom extrinsic, intrinsic og common reaksjonsvei.....	61
Tabell 1, Kjente parametre ved rottegiftsforgiftning hos hund .....	62
Tabell 2, Tolkning av parametre ved rottegiftsforgiftning.....	62
Vedlegg 3 .....	63
Tabell 1, LC-MS/MS parametre.....	63
Figur 1, MS/MS kromatogrammer av lever fra hunder positive for rottegift .....	64
Vedlegg 4 .....	65
Molekylstrukturer.....	65
Vedlegg 5 .....	66
Tabell 1, Beregning av utvalgsstørrelse .....	66
Vedlegg 6, Figurer.....	67
Figur 1, Forekomst av superwarfariner .....	67
Figur 2, Fordeling av superwarfariner i positive leverprøver .....	68
Figur 3, Fordeling mellom kjønn .....	69
Figur 4, Fordeling av aldersgrupper .....	69
Figur 5, Fordeling mellom kommuner .....	70
Figur 6, Fordeling mellom rasegrupper.....	71
Figur 7, Fordeling mellom sykdomsgrupper .....	72
Vedlegg 7, Tabeller .....	73
Tabell 1, Prevalens og RR for kjønnsfordeling.....	73
Tabell 2, Data plottet inn for Fisher eksakt test. ....	73
Tabell 3, Prevalens og RR for aldersgrupper. ....	74

Tabell 4, Prevalens og RR for kommunefordeling. ....	75
Tabell 5, prevalens og RR for rasegrupper. ....	76
Tabell 6, Prevalens og RR for sykdomsgrupper. ....	77

## **Forord**

Vi har alle tre jobbet på smådyrsklinikker under studietiden. Her har vi opplevd at hunder har kommet inn med mistanke om rottegiftsforgiftninger. Noen har presentert seg med økt blødningstendens, andre har kommet inn rett etter antatt inntak. I slike tilfeller kan det være vanskelig for veterinæren å stille riktig diagnose, ettersom utbredelsen av rottegiftsforgiftning er vanskelig å anslå, samt at diagnostikken i stor grad bygger på klinisk presentasjon og anamnese.

I tillegg til pasienter med mistenkt rottegiftsforgiftning, kan komplikasjoner som uforklarlig økt blødningstendens intra- eller postoperativt sees hos en ellers frisk pasient.

Lars Moe og Andreas Lervik fanget vår interesse da de presenterte en oppgave som omhandlet kartlegging av bakgrunnsnivåer av antikoagulerende rottegifter hos hunder i Norge. De ønsket blant annet å undersøke sannsynligheten for at slike pasienter kan være utsatt for rottegiftsforgiftninger. Ved å gjennomføre en kartlegging av den generelle hundepopulasjonen i Norge, ønsker vi å få et innblikk i hvor utbredt problemet er.

I tillegg går vi inn på diagnostikken ved slike kasus, og muligheter for nye verktøy som kan gjøre diagnostikken mer presis.

Formålet med oppgaven i sin helhet er å oppdatere og øke mengden kunnskap om superwarfarinforgiftning hos hund i Norge.

På grunn av nyhetsverdien temaet har både for dyreeiere, allmennheten og miljøvernmyndigheter, ser vi for oss at en publikasjon i Norsk Veterinærtidsskrift eller i et annet tidsskrift kunne vært av interesse for flere.

## **Sammendrag**

*Tittel:* Forekomst av superwarfariner hos hund - kartlegging av bakgrunnsnivåer i lever hos obduserte hunder.

*Forfattere:* Sara Olerud, Jeanette Pedersen og Eiril Pettersen

*Veiledere:* Lars Moe, Andreas Lervik, Gjermund Gunnes og Jens Børsum, Institutt for sports- og familiedyrmedisin, Institutt for basalfag og akvamedisin, og Veterinærinstituttet.

Antikoagulerende rottegifter av warfarintypen er mye brukt i Norge og effekter og bivirkninger har vært dårlig kontrollert. Med nye mer potente rottegifter som superwarfariner (SW), kan disse persistere over lang tid hos både dyr og i miljøet. I en norsk studie fra 2009-2011 ble det funnet SW i leveren hos 70 % av kongeørnene og 50 % av hubroene. På bakgrunn av dette ble en gruppe døde hunder fra den norske hundepopulasjonen undersøkt for SW i leveren. Leverprøver fra 63 døde hunder ble samlet inn kort tid etter avlivning over et halvt års tid. Hele 20,6 % (13/63) av hundene hadde forekomst av SW (bromadiolon, difenakum, dieftialon eller flokumafen) i leveren. De inkluderte hundene var tilfeldig utvalgt uavhengig av sykdom, eller symptomer og de representerer en bakgrunnspopulasjon. Vi kan konkludere med at resultatene viser at norske hunder i overraskende stor grad er eksponert for rottegift. Arbeidet diskuterer dagens diagnostikk ved rottegiftsforgiftning og mulige forbedringer. Det finnes få publiserte studier på hund over farmakokinetikk og farmakodynamikk hos ulike SW. Kunnskap om hvordan SW omsettes i kroppen er nødvendig for å forbedre diagnostikken og terapien hos hund. Vi har ikke funnet publikasjoner som diskuterer hvordan hunder får i seg SW, og det trengs derfor en grundigere undersøkelse av mulige kilder for forgiftning hos hund.

## **Definisjoner**

ACT = Activated Coagulation Time (Aktivert koagulasjonstid)

aPTT = aktivert partiell tromboplastintid

BMBT = Buccal Mucosal Bleeding Time (Blødningstid i munnslimhinnen)

Cl<sub>p</sub> = Clearance i plasma (Utskillelse i plasma)

DIC = Disseminated Intravascular Coagulation (Disseminert intravaskulær koagulasjon)

Faktor (x)<sub>a</sub> = Aktivert faktor (x)

FDP = Fibrin Degredation Product (Fibrin nedrbrytningsprodukt)

HMWK = High Molecular Weight Kininogen (Høymolekylvektskininogen)

KI = Konfidensintervall

LD<sub>50</sub> = Dødelig dose for 50 % av en populasjon

NKK = Norsk Kennel klub

NSAID = Non Steroid Antiinflammatory Drug (Ikke steroid antiinflammatorisk legemiddel)

PAI = Plasminogen Activator Inhibitor (Inhiberende plasminogenaktivator)

PIVKA = Proteins Induced in Vitamin K Antagonism (Induserte proteiner i vitamin K antagonisme)

PK = Prekallikrein

PT = protrombintid

RR = Relativ risiko

SW = Superwarfarin (samlenavn for andregenerasjons rottegift)

T<sub>1/2</sub> = Halveringstid

V<sub>d</sub> = Distribusjonsvolum

vWf = von Willebrand faktor



## Innledning

I klinisk praksis i Norge og i utlandet ser man fra tid til annen hunder med ikke-traumatisk blødningstendens uten kjent årsak. Dette kan være forårsaket av medfødte- eller ervervede blødningsforstyrrelser. Ved obduksjon av slike hunder, er det enkelte ganger funnet superwarfariner (SW) i lever eller i annet vev. SW er en type rottegift. De mest kjente rottegiftene er de med antikoagulerende egenskaper. Den første antikoagulerende rottegiften som kom på markedet i 1940, ble kalt warfarin.

Warfarin er fremstilt av substansen coumarin som har vært et kjent naturprodukt siden 1820. Coumarin har en søtaktig lukt og har blitt brukt som parfyme. I store mengder smaker det bittert. Dette bruker vekstene som forsvar for å ikke bli spist. I 1920 ble det oppdaget høy mortalitet hos storfe i Wisconsin, USA. Bønder i USA hadde begynt å plante legesteinurt (*Lithospermum officinale*) som var importert fra Europa. Planten inneholdt mye næring og ble brukt som fôr, men førte også til sykdom og økt mortalitet hos storfe. Veterinærpatologen Schofield fra Alberta i USA rapporterte i 1921 at den høye mortaliteten med spontane blødninger hos storfe var forårsaket av muggen legesteinurt. Coumarin forekommer naturlig i legesteinurt, og coumarin i seg selv er ikke toksisk. I 1940 oppdaget Karl Paul Link og medarbeidere at når legesteinurt blir muggent, oksideres coumarin til 4-hydroxycoumarin. 4-hydroxycoumarin sammen med formaldehyd danner dikoumarin som har antikoagulerende egenskaper.(1)

Da dette ble oppdaget begynte man å syntetisere flere stoffer med slike egenskaper. Warfarin var en av dem, og det ble snart brukt både som et oralt antikoagulerende legemiddel og som rottegift. Etter kort tid oppstod det resistens hos mus og rotte mot warfarin, og nye andregenerasjons antikoagulerende warfarinmidler ble utviklet, også kalt SW. SW har i motsetning til warfarin en lang halveringstid ( $T_{1/2}$ ) og er mye mer potente. Hos rotter er  $T_{1/2}$  i

lever estimert til >100 dager. (2) I et forsøk med beaglehunder kunne SW flokumafen påvises i lever 43 uker etter eksponering. (3) I andre studier har man sett at halveringstiden hos hunder er på 120 dager. (4)

I perioden 2009-2011 ble det samlet inn selvdøde rovfugl i Norge for å måle nivåer av SW i lever. I 70 % av leverprøvene fra døde kongeørner og 50 % av hubroer, ble det påvist SW konsentrasjoner mellom 11 og 255 ng/ G lever. Hos 30 % av fuglene, ble det påvist nivåer som ble regnet som potensielt dødelige (>100 ng/ G lever). (5)

Dersom en hund med mistenkt rottegiftsforgiftning kommer inn på klinikk, vil diagnostikk og behandling i stor grad basere seg på anamnese og måling av koagulasjonsfaktorene ved å se på protrombintid (PT) og aktivert partiell tromboplastintid (aPTT). Dersom det foreligger en blødningsanemi eller en blødningstilstand hvor det påvises forlenget blødningstid (PT og aPPT) vil man behandle empirisk med vitamin K hvis ikke andre årsaker finnes. Vi mangler imidlertid en presis diagnostikk i form av måling av SW i blod eller andre kroppsprøver, og vi må anta at hunder med en økt blødningstid uten kjent årsak står i fare for å motta suboptimal behandling. Tidligere kunne man sende inn leverbiopsier av døde hunder til Veterinærinstituttet for påvisning av warfariner eller SW. Da analysemetoden ble ansett å være foreldet og unøyaktig, ble tilbudet tatt bort. (6)

Det er et behov for klinikerer å kunne verifisere diagnosen før obduksjon fordi behandlingen med vitamin K må fortsette i mange uker ved et forgiftningstilfelle. Dersom SW i leveren hos hund er like utbredt som hos rovfugl i Norge, representerer det en alvorlig feilkilde for diagnostikken av SW forgiftning. Formålet med denne studien var å kartlegge

bakgrunnsnivået av SW hos norske hunder. Dette ble gjort ved å analysere lever fra døde hunder ved NMBU-Veterinærhøgskolen.

## **Bakgrunn**

### *Generelt om hemostase*

Hemostase er en livsviktig funksjon som forhindrer blodtap. Forstyrrelser i hemostasen kan føre til hyperkoagulasjon eller økt blødningstid. Dette er vanligvis forårsaket av trombocytopeni, nedsatt koagulasjonsfaktoraktivitet eller platedysfunksjon. Noen ganger ser man også hyperfibrinolyse, som gjerne oppstår i forbindelse med DIC. Hemostaseforstyrrelser er av og til arvelig, men er oftere ervervet. De vanligste arvelige hemostaseforstyrrelsene hos hund er von Willebrands sykdom og hemofili A. (7) Ervervede hemostaseforstyrrelser kan komme som følge av blant annet rottegiftsforgiftning, leversykdom, DIC og immunmediert trombocytopeni. En hemostaseforstyrrelse kan mistenkes når blodet ikke koagulerer etter punktering av en vene, når det er blødninger på ulike steder samtidig, eller når blødningen ikke står i sammenheng med traumet. Hos hunder med arvelige blødningssykdommer, ser man gjerne økt blødningstendens ved tannfelling. (8)

Hemostasen er en kompleks mekanisme, som kan beskrives på ulikt vis. En godt kjent modell er koagulasjonskaskaden. De senere årene har man i større grad brukt den cellebaserte koagulasjonsmodellen. Videre følger en oversikt over disse to modellene.

### **Den klassiske koagulasjonskaskaden**

I koagulasjonskaskaden inngår flere ulike koagulasjonsfaktorer. De benevnes noen ganger med navn, og andre ganger med faktortall. Det er i alt 13 ulike faktorer. Se Vedlegg 1.

Hemostase er et tett samarbeid mellom karveggen, trombocytter og koagulasjonssystemet.

Når blod kommer i kontakt med subendoteliale strukturer som kollagenfibre eller basalmembran, eller annet nærliggende vev, igangsettes hemostasemekanismer raskt. (9,11)

Vevsfaktor finnes i ytre del av blodkarveggen, i epitelceller i hud, i slimhinner og i bindevev, men ikke i intakt endotel. Endotelceller og monocytter står for vevsfaktorsyntesen.

Vevsfaktorsyntese kan forsterkes av interleukin 1, tumor nekrose faktor, mitogener, insulin, interferon, endotoksiner, virus, trombin, immunkomplekser og molekyler fra adhererende celler. (12) Glatt muskulatur i arterier og arterioler vil samtidig kontrahere i afferent retning, i løpet av noen sekunder. Dette minsker blodstrøm og blodtap. Samtidig vil de første trombocytene adherere på de eksponerte kollagenfibrene. (9) Denne adhesjonen er et resultat av vWf. Hovedsaklig produseres vWf av endotelceller, og lagres i vesikler kalt Weibel-Palade legemer. Endotelceller kan skille ut vWf i blodbanen, eller til subendotelial matriks hvor vWf bindes til kollagen. Tilstedeværelse av trombin, histamin eller fibrin kan aktivere vWf. (13) Trombocyttaggregatet resulterer i en initial, labil lukning av lesjonen, og stopper blødningen. Et fibrinnettverk, som er sluttproduktet i koagulasjonen, stabiliserer trombocyttaggregatet. Koagelet vil etter hvert minske i størrelse som følge av fibrinretraksjon og nedbrytning, og vil til slutt være erstattet av arrvev. Fibrin dannes ved hjelp av trombin, som er koagulasjonssystemets viktigste protease. Trombin splitter fibrinopeptid A og B fra fibrinogenmolekyler, og danner fibrinmonomerer som polymeriseres spontant til fibrintråder og deretter fibrinnettverk. Transglutaminase faktor XIII vil deretter føre til at fibrinnettverket er bundet sammen ved hjelp av kovalente kryssbindinger mellom lysin og glutaminsyre. Dannelsen av trombin fra protrombin skjer via aktivert faktor X i samarbeid med faktor V som fungerer som kofaktor og fosfolipid. Reaksjonene som fører til aktivering av faktor X, og dermed også dannelsen av trombin, deles vanligvis inn i to reaksjonsveier; intrinsic og extrinsic. Se Figur 1, Vedlegg 2. Denne absolutte inndelingen eksisterer ikke in vivo, men følges likevel av pedagogiske hensyn. Extrinsic reaksjonsvei inkluderer dannelsen av fibrin, og regnes som initiatoren ved blodkoagulasjon. Denne reaksjonsveien aktiveres når vevsfaktor kommer i kontakt med sirkulerende faktor VII. Kompleksdannelse mellom

vevsfaktor og faktor VII forøkes ved tilstedeværelse av kalsium og fosfolipider. (14-16) Faktor Xa (aktivert faktor X) og IXa eller faktor XIIa aktiverer faktor VII. Faktor VIIa-vevsfaktorkompleks vil så aktivere faktor X, som deretter aktiverer faktor IX. (14,17,18)

Intrinsic reaksjonsvei er sekundær til extrinsic reaksjonsvei, og består av forsterkende komponenter. Aktivering av faktor X igangsettes av faktor IXa. Dette skjer når faktor IXa kommer i kontakt med en negativt ladet overflate, eller med et endotoksin. Faktor XII danner kompleks med faktor XI og HMWK (et sirkulerende plasmaprotein), og aktiveres dermed til XIIa. Faktor XIIa aktiverer deretter faktor XI og prekallikrein. Kallikrein (aktiv form av prekallikrein) akselererer prosessen gjennom økning av faktor XII-aktivering, noe som gir en positiv feedback. Kallikrein katalyserer i tillegg autolytisk spalting, produserer  $\beta$ -kallikrein med redusert koagulasjonsaktivitet, og HMWK spalting. HMWK binder til prekallikrein og faktor XI som kofaktor for celle-til-celle reaksjonene. Faktor IX aktiveres av faktor XIa. Faktor IXa aktiverer deretter faktor X. Denne aktiveringen hjelpes også fram av faktor IXa-VIII-komplekset ved tilstedeværelse av kalsium og fosfolipider. Endotelet skiller ut et spesifikt 140-kDa granulamembranprotein (membranglykoprotein) til faktor IXa. Dette proteinet forbedrer samarbeidet til faktor IXa-VIIIa-X-komplekset på endoteloverflaten, der koagulasjonsprosessen fortsetter. (14) Resultatet av reaksjonsveiene er omdannelsen av faktor X til Xa. Faktor Xa vil binde til faktor Va, kalsium og fosfolipider, slik at det dannes et protrombinasekompleks som raskt vil aktivere protrombin til trombin. Trombin kløyver fibrinogen. Frigjorte fibrinopeptider aktiverer fibrinogen. Polymerisering av aktiverte fibrinogenmolekyler starter. Det siste steget består i dannelsen av kovalente kryssbindinger mellom fibrin, der faktor XIIIa er involvert. Plasmaproteiner som albumin er med på å modulere nettverksformasjonen. (19)

## Cellebasert koagulasjonsmodell

I den cellebaserte koagulasjonsmodellen forklares koagulasjonsprosessen som tre overlappende faser. De tre fasene består av igangsetting, forsterking og oppforming.

Igangsettingsfasen handler om dannelsen av trombin ved at vevsfaktor eksponeres for faktor VII i blodbanen. Vevsfaktor finnes generelt sett på utsiden av blodkarene, noe som hindrer blodkoagulasjon ved normale omstendigheter med et intakt endotel. Ved skade på blodkaret, vil blodet i løpet av kort tid komme i kontakt med en vevsfaktorbærende celle. Faktor VIIa, som er den eneste faktoren i blodbanen som konstant er i aktiv form, vil da binde seg til vevsfaktor. Faktor VIIa-vevsfaktorkompleks vil deretter aktivere ytterligere faktor VII og VIIa, slik at det dannes flere komplekser. Videre aktiveres faktor IX og X i små mengder. Faktor V kan aktiveres direkte av faktor Xa, og faktor Va og Xa kan deretter danne protrombinasekomplekset, som kløyver protrombin til trombin. Forsterkingsfasen omhandler at trombin fra igangsettingsfasen aktiverer trombocytter og en rekke koagulasjonsfaktorer. Dette skjer på trombocyttenes membranoverflate. Ved binding til trombocyttenes overflate, vil cellen endre form og skille ut granula. Trombocytgranula inneholder store mengder proteiner og andre substanser som fungerer som materiale for trombedannelse og for aktivering av flere trombocytter. Kalsium kan føre til at det dannes en klynge av fosfatidylserin (protein på cellemembranen som virker prokoagulerende), som vil øke binding av koagulasjonsproteiner til cellemembranen. I tillegg til aktivering av trombocytter, vil trombin som ble dannet under initieringen kløyve faktor XI til XIa, og aktivere faktor V til Va på trombocyttoverflaten. Trombin kløyver i tillegg vWf bort fra faktor VIII, noe som gjør at den kan mediere plateaggregering og adhesjon. Trombin vil deretter aktivere faktor VIII til VIIIa. Oppformeringsfasen er dannelsen av store mengder trombin, samt en masserekrutering av trombocytter. Disse reaksjonene foregår også på trombocyttenes membranoverflate. Ligander på overflaten danner celle-til-cellekontakt, og danner trombocyttaggregater. Faktor

IXa som ble dannet av faktor VIIa-vevsfaktorkomplekset under initiering, kan binde til faktor VIIIa som ble dannet under forsterkingsfasen, på trombocyttenes overflate. Ytterligere faktor IXa genereres som følge av kløyvning av faktor IX av IXa som ble dannet under forsterkingsfasen på platenes overflate. Det dannes et faktor IXa-VIIIa-kompleks på platenes overflate, som raskt produserer faktor Xa. Denne faktoren ble også produsert under igangsettingsfasen. Faktor Xa produsert på platenes overflate binder til faktor Va, og kløyver protrombin til trombin. Denne protrombinaseeffekten resulterer i en serie av trombindannelse som videre fører til kløyvning av fibrinopeptid A fra fibrinogen. Når det genereres nok trombin raskt, vil det dannes tilstrekkelig fibrin til å danne en uløselig fibrinmatriks. (20)

### ***Vitamin K i hemostase***

Antikoagulerende rottegift fungerer indirekte på koagulasjonssystemet ved å kompetitivt hemme vitamin K<sub>1</sub> epoksid reduktase, som fører til akkumulering av den inaktive formen for vitamin K (vitamin K-epoksid) i blodet, og forhindrer karboksylering av vitamin K-avhengige koagulasjonsforløperproteiner. (21)

Vitamin K spiller en viktig rolle i hemostasen, først og fremst ved å bidra til siste ledd i leversyntesen av koagulasjonsfaktorer i hemostasen, via karboksylering. Disse vitamin K-avhengige prokoagulerende faktorene inkluderer faktor II, VII, IX og X.

### ***Påvirkning av hemostase ved rottegiftsforgiftning***

Uttømming av trombin er sannsynligvis hovedårsaken til dannelse av blødninger ved rottegiftsforgiftning. (22) De vanligste kliniske tegnene er forårsaket av forstyrrelser i dannelsen av fibrinkoagel, og forårsaker blødninger fra naturlige kroppsåpninger og i indre organer. Alvorlige blodtap kan føre til anemi, hypovolemisk sjokk, koma og død. (23) Man



ser arts- og individforskjeller i forhold til mottakelighet for forgiftning. Predisponerende faktorer for utvikling av koagulasjonsforstyrrelser involverer en fettrik diett, samtidig medisiner og underliggende sykdom. Fettrik diett vil øke opptak av antikoagulerende rottegifter i gastrointestinalsysteget, samt øke den tilgjengelige plasmakonsentrasjonen av rottegiften ved å senke nivået av proteinbundne warfariner i et lipemisk plasma. Høye nivåer av vitamin E er trodd å interferere med vitamin K-avhengig koagulasjon. (24) Vitamin E quinone (vitamin E-metabolitt) er en potent inhibitor av vitamin K-avhengig karboksylase som kontrollerer koagulasjonen. (25) Medikamenter kan spesifikt eller ikke-spesifikt påvirke effekten av rottegift. Preparater som oxyphenbutazon (NSAID) har større affinitet til albumin enn warfarin. Ved samtidig bruk tar oxyphenbutazon plassen til albuminbundet warfarin, og øker dermed frie rottegiftsnivåer i blodet. Høye plasmakonsentrasjoner av frie rottegifter øker alvorlighetsgraden av koagulasjonsforstyrrelsen, men vil også øke utskillelse av toksinet. (26) Bredspektret antibiotika vil indirekte påvirke effekten av rottegiften, ved å senke produksjonen av vitamin K i tarmfloraen. Bakterier som normalt finnes i tarmene produserer vitamin K<sub>2</sub>. (27) Aspirin, sulfonamider og glukokortikoider inhiberer koagulasjon gjennom andre mekanismer, og vil gjennom administrasjon øke alvorlighetsgraden av den ervervede koagulasjonsforstyrrelsen. (28,29) Enkelte sykdommer vil også forverre koagulasjonsforstyrrelsen. Viremi eller en levende virusvaksine kan forårsake trombocytopeni, og kan dermed forverre koagulasjonsforstyrrelsen. (30) Leversykdom, eksokrin pankreasinsuffisiens, intestinal malabsorpsjon og DIC kan også forverre situasjonen ved en ervervet koagulasjonsforstyrrelse; ved at det dannes færre koagulasjonsfaktorer, nedsatt utskillelse eller metabolisme av preparatet, nedsatt absorpsjon av vitamin K, eller ved endringer i plateantall og -funksjon. (30,31)

## ***Antikoagulerende rottegifter***

Det finnes ulike typer rottegift. De mest kjente rottegiftene er de med antikoagulerende egenskaper. Warfarin var den første antikoagulerende rottegiften som kom på markedet og ble derfor kalt førstegenerasjons antikoagulerende rottegift. Det forekommer ulik informasjon om hva som er LD<sub>50</sub> hos ulike arter. Hos mus har warfarin blitt rapportert å ha en moderat toksisitet og en LD<sub>50</sub> på 374 mg/kg kroppsvekt. Med dette preparatet trenger dyret flere eksponeringer for at effekten skal bli dødelig. (32) Etter noen år ble det oppdaget resistens for preparatet. (33) Når resistensproblematikken oppstod, ble det syntetisert nye preparater med andre kjemiske strukturer. De nye preparatene var mer toksiske enn warfarinene, med akutt LD<sub>50</sub> på 0,4-1,75 mg/kg kroppsvekt hos mus. (32) Disse ble kalt andregenerasjons antikoagulerende rottegifter eller SW. Grunnen til at SW har en større potens og varighet enn førstegenerasjons antikoagulerende rottegifter, er at de har større affinitet til vitamin K<sub>1</sub> 2,3-epoksid reduktase, forstyrrer vitamin K<sub>1</sub> epoksid syklusen på mer enn ett sted, samt akkumulerer i leveren og har lang biologisk halveringstid på grunn av høy fettløselighet og enterohepatisk sirkulasjon. (34,23) Antikoagulerende rottegifter kan benevnes etter kjemisk struktur og deles opp i to hovedgrupper:

1. Hydrocoumarinene: Denne gruppen har en 4-hydroxycoumarinring med ulike sidekjedesubstitutter på 3-posisjonen. Vanlig brukte antikoagulanter i denne gruppen er bromadiolon, brodifakum, flokumafen, difetialon, coumafuryl, coumatetralyl, og warfarin. De tre førstnevnte har en halogenert gruppe på den siste ringstrukturen i sidekjeden. Se Figur 1, Vedlegg 4.
2. Indanedionene: Denne gruppen har en 1,3 indanedionestruktur med ulike sidekjedesubstitutter på 2-posisjonen. De vanligste antikoagulantene i denne gruppen er klorofacinon og difacinon. (33)

### ***Virkningsmekanismer til antikoagulerende rottegifter***

Virkningsmekanismen til de antikoagulerende rottegiftene er i hovedtrekk de samme. De inhiberer vitamin K<sub>1</sub> epoksid reduktase. (33,35) I koagulasjonskaskaden trenger koagulasjonsfaktor II, VII, IX og X å binde til kalsiumioner for å kunne aktiveres. Alle disse koagulasjonsfaktorene får sin evne til å binde kalsiumioner gjennom at glutamylgrupper på koagulasjonsfaktorene karboksyleres til en  $\gamma$ -karboksyl-glutamylgruppe. Vitamin K<sub>1</sub> hydroquinon brukes som en kofaktor i denne karboksyleringsprosessen. Vitamin K<sub>1</sub> hydroquinon konverteres til sin epoksidform, vitamin K<sub>1</sub> 2,3-epoksid. I den normale syklusen reduseres deretter vitamin K<sub>1</sub> 2,3-epoksid til sin originale form som vitamin K<sub>1</sub> (phylloquinon) gjennom enzymet vitamin K<sub>1</sub> epoksid reduktase og blir derfor resirkulert. Se Figur 2, Vedlegg 2. (33)

## **Toksikokinetikk**

Farmakokinetikken til de ulike antikoagulerende rottegiftene varierer mellom arter og stoffets kjemiske struktur. Rottegiftene som tilhører gruppen 4-hydroxykumariner har en felles coumarinring. Hos warfarin er det beskrevet at det er denne coumarinringen som binder til enzymet vitamin K<sub>1</sub> epoksid reduktase og at sidekjedene bestemmer stoffets utbredelse og metabolisme. (36) Det er ikke funnet noen sikker informasjon om hvordan SW binder til enzymet. Man tenker at coumarinringen står for denne bindingen, men det har også blitt anslått at SW sidekjerder fester til en lipofil del ved siden av warfarinreseptoren. Denne påstanden har ikke blitt vitenskaplig bekreftet. (35)

## **Biotilgjengelighet**

Warfarinabsorpsjon har blitt studert hos menneske og absorberes fullstendig fra tarm etter oral administrasjon. (37,38,33) Hos sau har biotilgjengeligheten hos warfarin, klorofacinon og bromadiolon blitt studert. Den ble estimert til henholdsvis 79 %, 92 % og 88 %. (39)

Biotilgjengeligheten hos hund er ikke studert, men kan antas være høy på grunn av det som blitt rapportert hos andre arter.

## **Distribusjon**

Etter absorpsjon havner warfarinet i plasma. Så mye som 99 % av warfarinet binder seg til plasmaproteinet albumin, som er det viktigste proteinet involvert i legemiddelbindinger. (40,41). Det som ikke er bundet til albumin utgjør en fri fraksjon. Denne fraksjonen er den biologisk aktive formen. Warfarin binder også til levermikrosomer og vitamin K<sub>1</sub> epoksid reduktase i lever. Stoffet har også vist aktivitet i pankreas, nyre og spyttkjertler. (42,43) Lever antas å være hovedakkumuleringsorganet for både warfariner og SW. Konsentrasjonen i lever

opptrer raskt og overstiger konsentrasjonen i serum med 20 ganger hos rotter. (34) SW kan finnes andre steder enn i plasma og lever. Det har blitt sett at difacinon har størst konsentrasjon i lever og mindre konsentrasjon i hjerne, muskel, blod og fett. (44)

## Eliminasjon

Eliminasjon av antikoagulerende rottegifter er vanskelig å anslå. Det finnes flere forskjellige studier som rapporterer forskjellige halveringstider hos ulike arter. Mange av studiene har ikke pågått i lang nok tid til at man sikkert kan kunne si noe om halveringstid eller hvor lenge stoffet blir igjen i kroppen.

Det er forskjell på førstegenerasjons rottegiftenes og SWs eliminasjon. Warfarin finnes som to isomere former, i en S- og en R-form. Disse metaboliseres gjennom både oksidasjon, reduksjon og glukuronidering av cytokrom p-450 i leveren. (36) Det finnes flere ulike CYP-enzymmer som er involvert i hydroksyleringen av isomerene til warfarin. Genetiske forskjeller i disse enzymene kan bidra til individuelle variasjoner i eliminasjon. Dette har blitt studert hos menneske. (38) SW skilles ut i uendret form og i hovedsak via fæces. Hos rev har man funnet bromadiolon i fæces 15 timer etter eksponering og i 26 dager etter at eksperimentet ble stoppet. (45) En sammenligning av farmakokinetikken av warfarin hos hund, rotte, rhesusape og menneske viste at warfarinkonsentrasjonen i plasma avtok eksponentielt med tiden.

Halveringstiden for warfarin økte i størrelsesorden rotte < ape < hund < menneske.

Halveringstiden for hund var 22-23 timer og halveringstiden for mennesker varierte mellom 29-37 timer. (46) SW har både lengre halveringstid og er mer potent enn warfarin og andre førstegenerasjons antikoagulerende rottegifter. (35) På grunn av SWenes sidekjede er de mer fettløselige, har høyere affinitet for hepatisk vev og binder sterkere til enzymet vitamin K<sub>1</sub> epoksid reductase som i hovedsak finnes i lever, men også i nyre og pankreas. (47)

Førstegenerasjons antikoagulerende rottegifter skilles ut med et tilsynelatende

monoeksponentielt mønster, mens SW skiller ut med et biekspontielt mønster. Dette tyder på at SW distribueres på en annen måte. Halveringstider er avhengig av  $Cl_p$  og kroppens  $V_d$ . I studier gjort på kanin har man sett at difenakum og brodifakum har lengre halveringstid enn warfarin, men av ulike grunner. Difenakum har en større  $V_d$ , men omtrent samme  $Cl_p$  som warfarin. Brodifakum har omtrent samme  $V_d$  som warfarin men mer langsom  $Cl_p$ . (35)

Halveringstidene varierer mellom ulike studier avhengig av hvilket stoff, hvilket organsystem og hvilken art man har studert og hvor lenge studien har pågått. Farmakokinetikk og farmakodynamikk i lever, plasma og serum er mest studert. Man vet at SW akkumuleres i lever, derfor er det naturlig å finne høye konsentrasjoner her. Hvilke nivåer man finner i plasma og serum er avhengig av analysemetode og inntatt mengde rottegift. Rottegiftene bindes til albumin og dette er viktig for kinetikken.

### **Eliminasjon i plasma**

Hos hund er det påvist en halveringstid for brodifakum og difetialon i plasma.

Robben et al. fant en gjennomsnittlig halveringstid i plasma på 0,9-4,7 dager med en median på 2,4 dager hos hund. Halveringstiden for difetialon i plasma var 2,2 og 3,2 dager hos to individer. (48) Da flere andre studier viser til at SW skiller ut med et biekspontielt mønster og at halveringstiden er lang, mener vi at halveringstiden som presenteres her er alt for kort og må derfor trolig representere  $\alpha$ - elimineringsfasen. Hos kanin er det blant annet beskrevet at  $T_{1/2}$  for difenakum og brodifakum er henholdsvis  $83,1 \pm 10,3$  timer og  $60,8 \pm 1,9$  timer. (35)

### **Eliminasjon i serum**

Hos hund har man påvist brodifakum i serum 24 timer etter eksponering. Serumnivået av brodifakum viste seg å være høyest 4-6 dager etter eksponering med en konsentrasjon på

1065-1215 ng/mL og var fortsatt detekterbart 24 dager etter eksponering. Serumnivåene varierte mellom 37,5-83 ng/mL på dag 10 hvor man satte inn vitamin K<sub>1</sub>-behandling. Behandling ble stoppet på dag 14, da var konsentrasjonen 8,5-21 ng/mL. På dag 24 var nivåene mellom 3-7,5 ng/mL og dag 30 var de ikke lenger påvisbare (<2ng/mL som var deteksjonsgrensen). Forskerne kom frem til en gjennomsnittlig halveringstid på  $6 \pm 4$  dager og at dette mest sannsynlig var doseavhengig. (22) Hos et voksent menneske ble en halveringstid for brodifakum i serum på 56 dager funnet og stoffet var påvisbart i 7 måneder. (49)

### **Eliminasjon i lever**

I et eksperiment fra 1991, fikk fire beaglehunder 0,5mg/kg flokumafen. Av den initiale dosen fantes 8 % igjen i leveren 43 uker (301 dager) etter eksponering. (3) En annen studie viste at bromadiolon ikke er like persistent i lever hos gnagere og hund som det brodifakum er, noe som indikerer at bromadiolon elimineres raskere enn brodifakum. (32)

For en oppsummering av kjente parametre ved rottegiftsforgiftning hos hund, se Tabell 1, Vedlegg 2.

## **Kliniske tegn hos hunder med rottegiftsforgiftning**

De antikoagulerende rottegiftene interfererer med enzymet vitamin K<sub>1</sub> epoksid reduktase.

Dette resulterer i et lavere nivå av vitamin K<sub>1</sub>. Dermed forstyrres syntesen av koagulasjonsfaktorene II, VII, IX og X. Disse koagulasjonsfaktorene har en halveringstid på 41, 6,2, 13,9 og 16,5 timer respektivt. Derfor er det ikke vanlig å se de første symptomene med en gang, men 3-5 dager etter eksponering. Dette er imidlertid individuelt og enkelte individer kan få symptomer allerede dagen etter at giften er inntatt. (33)

Mange hunder får i seg rottegift uten at eiere observerer dette og det er dermed ikke helt uvanlig at det går noe tid før symptomer oppdages. Hunden kan være helt normal frem til et tidspunkt der den plutselig begynner å blø. Blødninger kan opptre i indre organer og fra naturlige kroppsåpninger. Man kan se blødninger i form av petekkier og ekkymoser i hud og på slimhinner. Hunden trenger ikke å ha eksterne blødninger, men kan vise generelle symptomer som depresjon, slapphet, nedsatt matlyst og anemi. (22,50,51) Den vanligste presentasjonen er akutte pustevansker som forårsakes av blødning inn til brysthulen. (50) Hunder kan også vise halthet hvis blødningen har oppstått inn til ledd. Dersom blødningen oppstår inn til ryggmarg eller hjerne kan man få nevrologiske symptomer. (52) Mindre vanlige tilfeller er plutselig dødsfall uten forutgående kliniske tegn. (51)



## **Diagnostiske hjelpemidler**

Koagulasjonstester er svært viktige diagnostiske verktøy i de tilfeller der man mistenker rottegiftsforgiftning. Blødningstiden (BMBT), protrombin tid (PT), aktivert partiell tromboplastintid (aPTT), og aktivert koagulasjons tid (ACT) kan være forlenget ved forgiftning med antikouagulanter som SW.

Å måle blødningstiden (BMBT) er metode der man lager et lite snitt i munnslimhinnen. Deretter måles tiden det tar før blødningen opphører. BMBT vil være unormal hos hunder med trombocytopeni eller platedysfunksjon. Hos friske og normale hunder vil blødningstiden være 1,0-2,5 minutter. Vanligvis benyttes denne testen preoperativt for å utelukke defekter i primær hemostase. (53)

PT vil hovedsakelig måle faktorene i extrinsic reaksjonsvei (vevsfaktor og faktor VII). Måling av PT vil være den beste indikatoren ettersom den måler faktoren med kortest halveringstid (faktor VII). (54) Dette er den testen som er mest brukt til å detektere vitamin K antagonist. (22) PT bør følges opp og måles hver 6-8 time over en periode på 24-48 timer etter at vitamin K<sub>1</sub>- behandling er satt i gang. Man bør forvente en gradvis normalisering av PT og målingene bør utføres 2-3 dager etter at man opphører tilførselen av vitamin K<sub>1</sub>. Dersom PT begynner å øke etter dette kan det være tegn på at antikoagulantene er langtidsvirkende og fortsatt har effekt i kroppen, noe som er typisk for SW. (50) Referanseverdiene på PT hos hund er 5,1-7,9 sekunder. (55)

ACT og aPTT måler faktorene i intrinsic reaksjonsvei (PK, HMWK og faktor XII, XI, IX og VIII). (54) ACT er en test som er enkel å utføre i klinikken for de fleste tilstander med mistanke om koagulasjonsdefekter. Denne testen blir også forlenget ved primærhemostaseforstyrrelser som for eksempel trombocytopeni og platedysfunksjon, mens

aPTT påvirkes ikke av blodplateantallet. (56) ACT er forholdsvis lite sensitiv og fanger kun opp alvorlige defekter. Konsentrasjonen av en spesifikk koagulasjonsfaktor må være så lav som under 5 % for at ACT skal slå ut. Referanseverdiene på ACT hos hund er ca. 60-110 sekunder. (53) Referanseverdiene for aPTT er 8,6-12,9 sekunder. (55) aPTT er en mer sensitiv test enn ACT og måler nedsatt aktivitet til en eller flere av koagulasjonsfaktorene i intrinsic og common reaksjonsvei. aPTT måler tiden det tar å danne fibrinkoagel etter tilsetning av en kontaktoverflate-aktivator tilhørende intrinsic reaksjonsvei og kalsium. Koagulasjonsfaktorkonsentrasjonen må være under 30 % før aPTT blir forlenget. (53) Fordi endeproduktet til både extrinsic og intrinsic reaksjonsvei er fibrin, vil både PT, aPTT og ACT kunne si noe om common reaksjonsvei (faktor X, V, II, I og XIII). (54) Se Figur 3, Vedlegg 2.

En annen måte å måle koagulasjonstiden på er trombotest eller PIVKA-test. (51) Denne testen identifiserer koagulasjonsproteiner i plasma hos individer med sirkulerende vitamin K antagonist eller som mangler vitamin K. Inaktive koagulasjonsproteiner syntetiseres og lagres i lever der de venter på karboksylering mediert av vitamin K. Når vitamin K hemmes, slik man ser ved SW forgiftning, vil koagulasjonsproteiner som venter på karboksylering hope seg opp og gå over i den systemiske sirkulasjonen. Når de finnes i sirkulasjonen betegnes de som PIVKA. Disse kan ikke karboksyleres så lenge de befinner seg i sirkulasjonen og vil forbli ufunksjonelle. Det er kun proteiner som ligger lagret i lever som kan karboksyleres til funksjonelle koagulasjonsproteiner ved administrasjon av vitamin K. (50) Flere studier viser at PIVKA-testen har høy sensitivitet ovenfor rottegiftsforgiftninger. (57,58)

Vi kan også måle degraderingsprodukter fra fibrinolysen, FDP. Måling av FDP konsentrasjonen kan utføres via kommersielt tilgjengelige tester som for eksempel Thrombo

Wellcotest (Thermo Fisher Scientific, Lenexa, Kansas). Dette er en latex agglutinasjonstest som kan påvise sirkulerende FDP som dannes under kløyving av fibrinogen og fibrin (for eksempel under fibrinolyse). Hunder med DIC har ofte påvisbare FDP konsentrasjoner som slår ut positivt på en slik test. Hunder med rottegiftsforgiftning kan også slå ut positivt på denne testen. Bakgrunnen for hvorfor hunder med rottegiftsforgiftning gjør dette er ikke helt klarlagt, men en tenkt hypotese er at vitamin K antagonister aktiverer fibrinolyse gjennom å hemme dannelse av PAI-1. Dette er en av tre plasminogenaktivatorer (PAI 1, 2 og 3) som forhindrer fibrinolyse og fører til trombedannelse. (54) For en oppsummering av tolkning av parametre ved rottegiftsforgiftning, se Tabell 2, Vedlegg 2.

## **Behandling**

Det anbefales å gi hunden brekkmiddel og aktivt kull dersom det er mindre enn 4 timer siden inntak. Tømming av magesekk er kun indisert hos asymptotiske dyr. Dersom symptomer på rottegiftsforgiftning er tilstede bør man straks gå i gang og gi motgift i form av vitamin K<sub>1</sub>. For hund anbefales en initiell dosering på 5 mg/kg. Dette kan administreres per oralt eller eventuelt som en injeksjon subkutan som burde fordeles over flere steder. (59) I følge studier som blitt gjort på mennesker anbefales ikke intravenøs administrasjon hvis pasienten har kraftige blødninger som et resultat av koagulasjonsforstyrrelser. Dette kan gi anafylaktisk sjokk. (60) Dersom blødningen er omfattende bør man vurdere å stabilisere pasienten med blodtransfusjon og/eller blodplasma.

Effekten av vitamin K<sub>1</sub> behandling inntreer raskt og man kan gjenta behandlingen etter 6-12 timer med oral dosering på 2,5 mg/kg fordelt 2-3 ganger daglig i 14 dager. Dersom hunden er svært medtatt kan denne doseringen med fordel utføres subkutan over en periode på 24-48 timer. Koagulasjonsstatus bør monitoreres som tidligere beskrevet under diagnostikk. (50) En annen studie anbefaler initiell antidotbehandling på 5mg/kg subkutan og deretter ny

behandling etter 12 timer. Vedlikeholdsdosering på 2,5-5 mg/kg gis peroralt en gang i døgnet i 3-6 uker. Dersom PT fortsatt er forlenget etter denne behandlingen bør man fortsette i ytterligere 2 uker. (61) Vitamin K<sub>1</sub> behandlingen bør uansett trappes gradvis ned så fremt PT er normal. (48)

### ***Diagnostisk praksis i Norge***

I Norge kan man gå til innkjøp av mindre analysemaskiner (Coag Dx™ Analyzer, Idexx Laboratories og QuickVet® Portable Analyser) til å ha på klinikken for å teste koagulasjonsfaktorer. Disse maskinene måler både aPTT og PT. Disse er beregnet på veterinærmedisinsk bruk og har referanseverdier for hund, katt og hest. En annen maskin, scilicet i-STAT 1 Analyser, måler blant annet ACT, men ikke aPTT og PT. Tradisjonelt sett går diagnostikken her til lands ut på å hovedsakelig teste aPTT og PT i de tilfeller der man mistenker rottegiftforgiftninger i tillegg til BMBT.

Veterinærinstituttet hadde tidligere en tjeneste som gikk ut på å analysere lever for rottegift. Det var en kvalitativ metode som ga svaret ”tilstede/ ikke tilstede”. Tilbudet ble lagt ned da metoden ble ansett for å være gammel og unøyaktig. De ønsker å forbedre denne metoden og håper snart å kunne tilby tjenesten på nytt.

Flere publiserte artikler i både human- og veterinærmedisinen har omtalt metoder for analysering av SW i både lever, fullblod, serum og plasma. Disse analysene er ikke vanlig å utføre hos hund i Norge på grunn av et begrenset tilbud og høye kostnader. (48,62,67)

## **Lovverk og rottegiftsprodukter i Norge**

Bruk og markedsføring av antikoagulerende rottegifter reguleres av Forskrift om biocider (Biocidforskriften). EUs biocidforordning (EU 528/2012) er innført i Biocidforskriften.

Denne forskriften innfører gradvis en godkjenningsordning for en rekke produkter. Produkter som ikke oppfyller de nasjonale kravene, vil over tid forsvinne fra butikkhyllene og bli erstattet med produkter som er vurdert og godkjent av myndighetene. Det stilles spesielle nasjonale krav til muse- og rottegifter som inneholder antikoagulanter. Produkter til bekjempelse av rotter er forbeholdt profesjonelle skadedyrbekjempere, mens produkter til bekjempelse av mus er godkjent til privat bruk. Privatpersoner kan kun benytte produktene innendørs, og det er påkrevd å benytte åtestasjoner. Korn- og pelletsprodukter er ikke tillatt for privat bruk. (68)

Det er deklareringsplikt på alle biocidprodukter. Disse skal deklarerer uavhengig av mengde og fareklassifisering. Deklareringen må skje senest når produksjon, omsetning eller yrkesmessig bruk begynner i Norge. (69)

Deklarerte antikoagulerende rottegifter sommeren 2014 var warfarin, coumatetralyl, brodifakum, bromadiolon, difenakum, difetialon og flokumafen. De fleste av disse produktene er ikke klassifisert med hensyn til helse-, miljø-, brann- og/ eller eksplosjonsfare. Det betyr at man har mulighet, men ikke er pliktig til å registrere mengden av deklarererte produkter. På grunn av dette vil en mengdeoversikt av antikoagulerende rottegifter deklarerert i Norge være ufullstendig. (70)

Profesjonelle aktører har benyttet seg av de mindre potente antikoagulerende rottegiftene som blant annet warfarin, coumatetralyl, bromadiolon og difenakum. Privatpersoner har i større

grad benyttet seg av de mer potente antikoagulerende stoffene som brodifakum og flokumafen. Dette har vært en direkte følge av hvilke preparater som har blitt solgt og markedsført for privat bruk. I motsetning til de mindre potente antikoagulerende rottegiftene, er brodifakum og flokumafen patentbeskyttet. Dette betyr at den økonomiske gevinsten er størst ved salg av disse typene. Med innføring av EUs biocidforordning må alle antikoagulerende rottegifter som skal benyttes i Norge være godkjente for bruk og produktgodkjennes. Det lønner seg ikke for distributører å gå igjennom en produktgodkjenningssprosess for de eldre og mindre potente typene. Det er fordi den økonomiske gevinsten ved salg av disse preparatene ikke er like stor som ved salg av de patentbeskyttede, mer potente typene. (71)

## **Materiale og Metoder**

### ***Bakgrunnsinformasjon/litteraturodel***

Bakgrunnsinformasjon om emnet ble hentet fra fagartikler ved hjelp av søkemotorer, i hovedsak ”PubMed” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) og fagbøker som omhandler temaet i oppgaven.

Studie 2. Litteraturodel med gjennomgang av vitenskapelige artikler som er relevante for temaene i denne oppgaven.

### ***Analytisk del***

Leveruttak ble gjort i samarbeid mellom studentene, patologer og preparanter ved avdeling for patologi (BasAm) ved Veterinærhøgskolen.

Opparbeiding og analysering av leverprøvene ble utført i samarbeid med Veterinærinstituttet, avdeling for kjemi og toksikologi.

Innhenting av pasientinformasjon har blitt utført ved hjelp av ProfVet. En egen database ble opprettet for anonymisering av denne informasjonen. Databasen med figurer ble lagd i Windows Excel. Det ble beregnet prosentuelle fordelinger mellom kategorivariablene ved hjelp av Fisher eksakt test. Testen ble beregnet med 95 % konfidensintervall (KI) på nettsiden ”Social Science Statistics” (<http://www.socscistatistics.com/>).

### ***Studiedesign***

Undersøkelsen ble lagt opp som en tverrsnittsobservasjonsstudie. I utgangspunktet skulle alle hunder som døde i perioden fra april til september 2014 inkluderes dersom eieren godkjente obduksjon og/eller prøveuttak, og dersom leverprøvene kunne tas ut umiddelbart og i løpet av en ½ time, eller i løpet av ett døgn hvis hundene hadde vært oppbevart i kjølerom etter døden.

Hver hund i studien fikk et eget tall som ble koblet til hundens journalnummer i en egen database. Alle individer hadde en journal med diagnose enten fra hospitalet eller fra patologen ved NMBU-Veterinærhøgskolen (ProfVet system). Journalutskrift og prøvesvar med sykehistorier, behandlinger osv. ble samlet etter at undersøkelsen ble avsluttet, men før resultatene forelå. Journalutskrifter ble kjørt ut i en excelfil. Leverprøvene fra hundene ble skåret ut ved en full eller ved en partiell obduksjon og lagt i et plastglass og frosset umiddelbart i -20 grader C inntil analyse. Størrelsen på leverprøven varierte fra omtrent 10 G til 30 G.

Av praktiske grunner ble ikke alle hunder som døde i perioden og hvor eierne ikke reservert seg, inkludert i studien. Årsakene til manglende uttak av leverprøver, kunne være at hunden ble liggende død for lenge, stor arbeidsbelastning og manglende bemanning, forglemmelser, o.l. Det er ikke grunn til å tro at dette representerte systematiske feilkilder slik som at visse diagnoser ble prioriterte. I utgangspunkt hadde alle døde dyr i perioden samme muligheter til å bli inkludert. Anslagsvis knapt halvparten av de mulige hundene ble inkludert.

Den viktigste effekt- eller responsparameteren var kvalitativ påvisning av SW i leveren ved HPLC. Effektparameteren ble klassifisert som påvist eller ikke. Deteksjonsnivået er omtalt senere.

Den viktigste sekundærresponsvariablen var hvilken type SW som dominerte i prøvene. SW vi testet for var; brodifakum, bromadiolon, difenakum, difetialon og flokumafen.

De viktigste forklaringsvariabler var kjønn, rase, alder ved obduksjon, geografisk distribusjon, diagnoser og sykdommer.



## ***Statistisk analyse***

Forekomsten av SW i leverprøver hos hund ble beregnet som en prevalens for tidsperioden med 95 % KI. Dessuten ble relativ risk ratio beregnet og Fisher eksakt test ble estimert for de ulike forklaringsvariablene. Statistisk signifikansnivå ble valgt til  $p < 0,05$ .

Resultater for SW i leverprøver er presentert som antall hunder med påvist SW i leveren og fremstilt i figurer og tabeller. Databasen ble laget i Windows Excel, og figurer og tabeller ble laget ved hjelp av Windows Excel, samt "Social Science Statistics" for beregning av statistikk. StatCalc i EpiInfo ble også benyttet for å beregne Fisher eksakt test.

Mobilapplikasjonen EpiTools ble benyttet for å beregne utvalgsstørrelsen før studien ble gjennomført. Se Tabell 1, Vedlegg 5. Vi estimerte en populasjonsprevalens på 10 %, 20 % og 30 % på bakgrunn av en lignende studie utført på rovfugler i Norge. Signifikansnivået ble satt til  $p < 5$  %. Vi anslo at en populasjonsprevalens i denne studien (20 % med et konfidensintervall på 95 % og et standardavvik på 0,10) burde kunne påvises med 5 % forkastningsnivå. Analysen viste at vi trengte minst 61 leverprøver.

## ***Kjemikalier***

Analytiske standarder av bromadiolon, coumatetralyl, warfarin, brodifakum, flokumafen, difenakum og difetialon ble innkjøpt fra Sigma-Aldrich (Seelze, Germany). Metanol (HPLC grad) kom fra ROMIL (Cambridge, Great Britain). Andre kjemikalier som ble brukt, var av analytisk kvalitet (VWR international, Oslo, Norway).

Stamløsninger av de analytiske standardene ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ble tillaget i HPLC grad metanol og fortynnet videre til  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  og benyttet til tillaging av standardløsninger.

Biologisk prøvemateriale: Lever fra obduserte hunder.

## ***Prøveopparbeiding***

Hver prøve er merket enten med patologens journalnummer eller med både patolog- og klinikkjournalnummer. I vår registreringsprotokoll har vi valgt å identifisere prøvene med klinikkens journalnummer.

Prøvene har ligget nedfrosset ved -20 grader i individuelle beholdere fra uttak til analysetidspunkt, og har blitt analysert ved Veterinærinstituttets laboratorier.

Ekstraksjon av rottegift fra lever ble utført etter metoden til Langford et al. (2013) med noen modifikasjoner. Homogenisert lever (0,5g) ble tilsatt 750 µL acetonitril og 200 µL sinkklorid i et 2 mL polypropylen centrifugerør. Etter resting på vortexmikser, ble prøven sentrifugert i 4 min ved 8000 rpm. Supernatanten ble overført til et nytt centrifugerør. Acetonitril (750 µL) ble så tilsatt det gjenværende bunnfallet, resuspendert og sentrifugert på samme måte som første gang. Supernatantene ble kombinert og deretter sentrifugert ved 12000 rpm i for å bunnfelle resterende partikler i løsningen. 200 µL av supernatanten ble så overført til HPLC glass og analysert på LC-MS/MS.

## ***Kromatografi og massespektrometri***

LC-MS/MS analyser ble utført ved bruk av et Surveyor Plus LC system og et TSQ Quantum trippel kvadropol massespektrometer utstyrt med en elektropray ionekilde (ESI) operert i negativ mode, alt fra Thermo Finnigan (San Jose, USA). Analyseresultatene ble behandlet i databehandlingsprogrammet XCALIBUR (versjon 2.0).

Rottegiftforbindelsene ble separert kromatografisk på en Xbridge (C18 3,5 µm, 2,1 x 100mm) kollonne fra Waters (Milford, USA). Mobilfase A (0,1 mM maursyre) og mobilfase B (metanol) ble pumpet gjennom systemet (0,4 mLmin<sup>-1</sup>). Forbindelsene ble eluert i en lineær

gradient fra 40 til 100 % B over 10 minutter, 100 % B i 5 minutter og deretter en reekvilibrering i 3 min ved 40 % B før neste prøve ble injisert.

Optimalisering av parametrene i massespektrometrianalysen ble gjort for hver enkelt forbindelse. Følgende parametre ble brukt; spray voltage, 4,5 kV; sheet gas flow-rate, 40 (arbitrary units); auxiliary gas flow-rate, 2 (arbitrary units); ion sweep gas pressure, 0 (arbitrary units); capillary temperature, 260°C. Ioneavhengige parametre ble automatisk innstilt og lagret i systemet for alle precursor ion – product ion overganger, se Tabell 1, Vedlegg 3.

Identifiseringskriterier for påvisning av de forskjellige rottegiftene var at forbindelsene hadde en topphøyde i kromatogrammet som var 10x grunnlinjestøyen og at fragment ion ratioene avvek mindre enn 20 % sammenlignet med fragment ion ratioene i standardene, se Figur 1 i Vedlegg 3.

## Resultater

Det ble totalt samlet inn 63 leverprøver fra døde hunder som kom inn til patologen ved NMBU-Veterinærhøgskolen i perioden april – september 2014. Prevalensen av SW eksponerte hunder i studiepopulasjonen viste seg å være 0,21 (13 hunder). Se Figur 1 i Vedlegg 6. Ved beregning av prevalens med et 95 % KI, kan vi være 95 % sikre på at den sanne prevalensen ligger mellom 0,306 og 0,106. SW bromadiolon, difenakum, difetialon og flokumafen ble påvist. I noen av prøvene ble kun ett av stoffene påvist, mens det i andre prøver var kombinasjoner av flere stoffer samtidig. Se Figur 2 i Vedlegg 6. Bromadiolon ble hyppigst påvist (38,5 %), og i tillegg fant vi følgende fordeling av de ulike SW som vi påviste; flokumafen (7,7 %), difenakum + flokumafen (7,7 %), bromadiolon + difenakum (23,1 %), bromadiolon + difenakum + flokumafen (15,4 %) og bromadiolon + difetialon (7,7 %). I forhold til hele studiepopulasjonen ble fordelingen slik; bromadiolon (7,9 %), flokumafen (1,6 %), difenakum + flokumafen (1,6 %), bromadiolon + difenakum (4,8 %), bromadiolon + difenakum + flokumafen (3,2 %), bromadiolon + difetialon (1,6 %) og hos 79,4 % av hundene ble SW ”ikke påvist”.

### ***Kjønnsfordeling***

Av de 63 individene som har vært en del av denne studien, var det 28 hannhunder (44,4 %) og 35 tisper (55,6 %). Det viste seg at 14,3 % av det totale antall hanner, og 25,7 % av det totale antall tisper fikk påvist rottegift i leverprøven. Se Figur 3 i Vedlegg 6 og Tabell 1 i Vedlegg 7.

### ***Aldersfordeling***

Forekomst innen de ulike aldersintervallene var < 1 år (4,8 %), 1 år (1,6 %), 2 år (1,6 %), 3 år (6,3 %), 4 år (7,9 %), 5 år (4,8 %), 6 år (1,6 %), 7 år (6,3 %), 8 år (15,9 %), 9 år (12,7 %), 10 år (12,7 %), 11 år (11,1 %), 12 år (3,2 %), 13 år (4,8 %), 14 år (3,2 %), 15 år (0 %) og 16 år (1,6 %). Når det gjelder aldersfordeling og påvisning av rottegift, fant vi forekomst hos 1 av 5

i kategori ”4 år”, 1 av 1 i kategori ”6 år”, 1 av 4 i kategori ”7 år”, 1 av 10 i kategori ”8 år”, 2 av 8 i kategori ”9 år”, 1 av 8 i kategori ”10 år”, 3 av 7 i kategori ”11 år”, 2 av 2 i kategori ”14 år” og 1 av 1 i kategori ”16 år”. Det ble ikke påvist rottegift i kategoriene <1 år, 1 år, 2 år, 3 år, 5 år, 12 år og 13 år. Se Figur 4 i Vedlegg 6 og Tabell 3 i Vedlegg 7.

### ***Kommunefordeling***

Hundene ble også fordelt i forhold til hvor de kom fra; Oslo (44,4 %), Asker (6,3 %), Bærum (11,1 %), Ullensaker (1,6 %), Tønsberg (3,2 %), Røyken (3,2 %), Hurum (4,8 %), Drammen (1,6 %), Ski (3,2 %), Trøgstad (3,2 %), Lardal (1,6 %), Vestby (1,6 %), Nøtterøy (1,6 %), Lunner (1,6 %), Nedre Eiker (1,6 %), Lørenskog (1,6 %), Bamble (1,6 %), Nes (1,6 %), Kongsberg (1,6 %), Halden (1,6 %) og Gausdal (1,6 %). Se Figur 5 i Vedlegg 6.

Det ble påvist rottegifter i leverprøver fra individer som var fra Oslo, Asker, Bærum, Ullensaker, Tønsberg og Nedre Eiker. Av prøvene fra Oslo var 25 % positive, det samme gjaldt for prøvene fra Asker. Av prøvene fra Bærum var 28,5 % positive. For øvrig var det én positiv prøve fra Ullensaker, én fra Tønsberg og én fra Nedre Eiker, mens prøvene fra de andre kommunene var negative. Se Tabell 4 i Vedlegg 7.

### ***Rasefordeling***

Videre plasserte vi individene inn etter rasetypene i følge Norsk kennel klub (NKK) sin standard. Studiepopulasjonen bestod av bruks-, hyrde- og gjeterhunder (11,1 %), pincher-, schnauzer-, molosser- og sennenhunder (19 %), terriere (9,5 %), dachs (3,2 %), spisshunder (6,3 %), drivende-, og sporhunder (1,6 %), stående fuglehunder (14,3 %), appporterende hunder (7,9 %), selskaphunder (15,9 %), blandingshunder (9,5 %) og ukjente raser (1,6 %). I rasegruppene vi påviste rottegift, var andelen positive følgene; 14,3 % (1 av 7) av bruks-, hyrde- og gjeterhunder, 25 % (3 av 12) av pincher-, schnauzer-, molosser-, og sennenhunder,

16,6 % (1 av 6) av terriere, 100 % (2 av 2) av dachs, 50 % (2 av 4) av spissbunder, 33,3 % (3 av 9) av stående fuglehunder, 10 % (1 av 10) av selskapsbunder og 16,6 % (1 av 6) av blandingsbunder. Se Figur 6 i Vedlegg 6 og Tabell 5 i Vedlegg 7.

### ***Fordeling basert på sykdomsdiagnoser***

Hundene som hadde påvisbare konsentrasjoner av SW i leveren hadde en lang rekke kliniske diagnoser ved avlivingstidspunktet eller hadde hatt det rett før avliving. Fordelingen av de SW positive hundene er vist i Figur 7 i Vedlegg 6. Fordeling av alle hundene uavhengig av SW status i leveren etter sykdomsdiagnoser var slik; hos 8 hunder (28,6 %) forelå det neoplasi 5 hunder (7,9 %) hadde sykdommer i fordøyelsessystemet, 6 hunder (9,5 %) hadde sykdommer i nervesystemet, 5 hunder (7,9 %) hadde sykdommer i kjønnsorganer, 1 hund (1,6 %) hadde sykdommer i respirasjonssystemet, 4 hunder (6,3 %) hadde sykdommer i bevegelsessystemet, 4 hunder (6,3 %) hadde sykdommer i urinveier, 1 hund (1,6 %) hadde endokrine sykdommer, 1 hund (1,6 %) hadde immunmedierte sykdommer, 2 hunder (3,2 %) hadde blødning, 1 hund (1,6 %) hadde anemi, 1 hund (1,6 %) hadde uønsket adferd, 1 hund (1,6 %) hadde traume, 5 hunder (7,9 %) hadde ukjent diagnose, 1 hund (1,6 %) hadde annen sykdom, 1 hund (1,6 %) hadde sykdommer i nervesystemet + blødning, 1 hund (1,6 %) hadde sykdommer i fordøyelsessystemet + blødning, 2 hunder (3,2 %) hadde sykdommer i fordøyelsessystemet + sykdommer i urinveier, 1 hund (1,6 %) hadde neoplasi + blødning, 1 hund (1,6 %) hadde neoplasi + sykdommer i urinveiene + sykdommer i fordøyelsessystemet og 1 hund (1,6 %) hadde neoplasi + sykdommer i fordøyelsessystemet. Fordelingen mellom diagnosegruppene hos de SW positive hundene var slik; 3 hunder (23 %) hadde neoplasi, 3 hunder (23 %) hadde sykdommer i nervesystemet, 1 hund (7,7 %) hadde sykdommer i kjønnsorganer, 1 hund (7,7 %) hadde sykdommer i urinveiene, 1 hund (7,7 %) hadde blødning, 1 hund (7,7 %) hadde sykdommer i fordøyelsessystemet + blødning, 1 hund (7,7 %)

hadde neoplasi + blødning og 2 hunder (15,4 %) hadde ukjent diagnose. Se Tabell 6 i Vedlegg 7.

## **Diskusjon**

Etter å ha undersøkt lever fra 63 hunder fant vi at 13 var positive for SW. Dette gir en prevalens på 20,6 %. Se Figur 1 i Vedlegg 6. Forekomsten er overraskende høy. Dersom vi antar at vår studiepopulasjon er representativ for norske hunder så har altså hver femte voksne, middelaldrende hund SW i leveren. Det representerer både en diagnostisk utfordring og en miljøbelastning. Betydningen av en subklinisk SW eksponering er ikke undersøkt i den litteraturen som vi kjenner. Dersom vi påviser SW fra leveren hos et blødningskasus er det slett ikke sikkert at SW forgiftning er årsaken til blødningen.

SW hos døde rovfugl i Norge var også overraskende høye. (5) Forekomsten av SW i lever hos rovfugl var høyere enn hos hund. Dette kan kanskje forklares med artsforskjeller når det gjelder blant annet levesett, næringskilder, farmakodynamikk og farmakokinetikk. Vi tenker oss at hunder ville ha lavere forekomst enn fugler da de lever under kontrollerte forhold når de gjelder tilgang på mat. De føres enten med ferdigfôr eller spiser husholdningsmat, og de ferdes i det humane miljøet i stor grad. Prevalensen vi har funnet står da ikke i sammenheng med dette. Vi tenker oss at det burde vært enda lavere forekomst hos hund. Kan det bety at SW finnes lettere tilgjengelig i hunders naturlige miljø enn i fuglers naturlige miljø?

Vi fant SW bromadiolon, difenakum, difetialon og flokumafen. Hos noen hunder forekom det en kombinasjon av disse stoffene, se Figur 2 i Vedlegg 6. Noen av de positive prøvene inneholdt en kombinasjon av flere virkestoffer. Omtrent 8 % inneholdt kombinasjonen difenakum og flokumafen, 23 % inneholdt kombinasjonen bromadiolon og difenakum, 15,5 % inneholdt kombinasjonen bromadiolon, difenakum og flokumafen og 8 % inneholdt kombinasjonen bromadiolon og difetialon. Dette er interessant ettersom vi ikke er kjent med at det selges preparater som inneholder flere enn ett virkestoff. Disse hundene har da vært



eksponert for flere ulike preparater og mest sannsynlig fått det i seg fra forskjellige kilder.

Disse kildene kan være primære eller sekundære. En sekundær kilde kan være en rotte eller mus som har forsynt seg fra ulike åtestasjoner. Videre i studien har vi sett på om ulike assosiasjonsvariabler har noe å si for eksponerte hunder.

Tidligere har det vært enkelt for privatpersoner å kjøpe rottegift i butikk. Der kan tenkes at rottegiften har blitt brukt ukyndig. De fleste har ingen formening om hva stoffet egentlig er og hvor store skader stoffene kan føre til dersom de brukes ukyndig. Det forekommer at enkelte setter ut rottegift på et fat som blir stående ubeskyttet utendørs, hvor andre dyr også kunne gå og forsyne seg, for eksempel hund, rovfugl, rev etc. I april 2014 ble en ny forskrift, Biocidforskriften, gjeldende i Norge. Med den nye forskriften blir det kun profesjonelle aktører med et godkjent skadedyrsertifikat som har lov til å plassere ut og etterfylle rottegift. Privatpersoner kan fortsatt kjøpe musegift, men får bare lov å bruke det innendørs. De har ikke muligheten til å etterfylle dersom virkestoffet er et SW. Det kommer likevel til å være en overgangsperiode hvor privatpersoner kan få kjøpt rottegift, samt at de kan ha et lager av det hjemme som de fremdeles kan benytte seg av. Da ukyndig bruk av rottegift trolig har blitt praktisert, tror vi at det er stor risiko for at også hunder kan være utsatt for forgiftninger. Siden vi ikke kjenner kildene til hvordan hund har fått i seg SW, er det vanskelig å konkludere.

### ***Kjønnsfordeling***

Det var flere tisper enn hannhunder i studiepopulasjonen, og andelen tisper med forekomst av SW var i tall høyere enn for hannhunder. Hvis forskjellen er reell, skulle den tilsi en RR på 1.80 for tisper. Se Tabell 1 i Vedlegg 7. Det vil si at det skulle være 1.80 ganger større risiko for å være eksponert for rottegift dersom hunden er en tisper. Forskjellen mellom kjønnene var

imidlertid ikke signifikant. Se Tabell 2 i Vedlegg 7. Vi synes likevel tallene er interessante, da tidligere studier har vist en forskjell i samme retning. (72) Det kan være vanskelig å tolke assosiasjoner knyttet til kjønn, da kjønnsfordelingen kan være skjevfordelt i bakgrunnspopulasjonen. Det kan tenkes at en større andel av hannhundene blir avlivet på et tidligere tidspunkt enn tispene på grunn av for eksempel uønsket adferd. Dette fører til at tisper vil være i overvekt i bakgrunnspopulasjonen. Hvis det er en reell forskjell mellom kjønnene når det gjelder eksponering for SW, kan det tenkes å være knyttet til fysiologiske forskjeller. Vi vet at SW er fettløselige og at de trolig vil akkumuleres i fettvev. Dersom tisper har en større andel kroppsfett, kan det kanskje føre til at SW påvises oftere hos dette kjønnnet. På den annen side, er lever det organet hvor SW akkumuleres i størst grad. Dessuten kan en påstand om at tisper har en større fettprosent enn hannhunder være feil i dag, hvor en stor del av hundepopulasjonen er overvektig. For å finne ut av dette, trengs det videre undersøkelser.

### ***Aldersfordeling***

Hunder fra aldersgruppen < 1 år – 16 år var representert i utvalget. Ingen hunder < 4 år hadde forekomst av SW, og bare en under 6 år. Dette kan være tilfeldig, men hvis det er uttrykk for en reell underrepresentasjon hos unge hunder, er dette interessant. Teoretisk kunne det tenkes at de yngre hundene skulle vært mer utsatt, da de ofte er mer opptatte av å utforske og å spise ting ute. Dette synes ikke å understøttes av våre funn. Kanskje er eksponeringen for SW knyttet til andre forhold enn utforskningstrang? En forklaring til at vi ser såpass mange positive prøver hos de eldre hundene kan tenkes å være at de har rukket å bli eksponert for rottegift over lengre tid og at SW akkumulerer i kroppen. Det er imidlertid ikke noen klar og direkte sammenheng mellom alder og eksponering for rottegift. Det samme har blitt observert i tidligere studier hvor forekomsten av rottegift hos hunder med kjente koagulasjonsforstyrrelser i USA er kartlagt. (72)

### ***Kommunefordeling***

De fleste av hundene i studiepopulasjonen kom fra Oslo og omegn, og de resterende kom fra andre deler av Østlandet. Det er derfor ikke mulig å si hvor representativ studien er for hele landet. Når det gjelder andelen av positive prøver fra de enkelte kommunene, er det bare fra Oslo, Bærum og til nød Asker det er tilstrekkelig mange prøver til at det har mening å sammenligne. Fordelingen i disse kommunene skilte seg ikke vesentlig fra den samlede fordelingen i materialet. Når det gjelder mulig geografiske forskjeller har vi flere spørsmål enn svar: Hvordan er fordelingen av muse- og rottepopulasjoner i kommunene? Varierer bruken av rottegift mellom by og land? Er holdningene til bruk av rottegift forskjellige? Beveger hunder seg mer fritt i enkelte områder? For å kunne si noe om disse spørsmålene må et større utvalg undersøkes.

### ***Rasefordeling***

Generelt er de fleste rasegrupper eksponert. I tall varierer andelen hunder med forekomst av SW fra rase til rase, men variasjonen virker nokså tilfeldig, uten noe klart mønster, se Figur 6 i Vedlegg 6. Fire av de 13 positive prøvene var fra dachs- og spisshunder, som begge er relativt små hunder. Hvis dette ikke er tilfeldig, kunne en mulig forklaring være at små hunder er mer utsatt for eksponering enn store hunder da de lettere kan komme til på steder der rottegift er lagt ut. Dette har blitt vist i en tidligere studie. (72) Hos dachs- og spisshund ser vi en høy RR, mens hos apporterende hunder er RR null. Se Tabell 5 i Vedlegg 7. Vi synes det er rart at ingen av de apporterende hundene var positive da både Labrador Retriever og Flatcoated Retriever inngår i denne gruppen. Disse rasene er generelt matglade og nysgjerrige hunder og kunne derfor tenkes å være mer utsatt for rottegift ved å spise ting ute. Vi har imidlertid delt inn hundene etter rasegrupper i forhold til NKK sitt register. I noen av disse

rasegruppene forekommer både små og store hunder, derfor er det vanskelig å vurdere en eventuell sammenheng med størrelse på hundene i hele materialet.

### ***Fordeling basert på sykdomsdiagnoser***

Hundene i studiepopulasjonen ble delt inn i sykdomsgrupper basert på diagnoser. Det ble gjort for å se etter sammenheng mellom eventuelt positive prøver og diagnose. Vi ser at 3 av de 13 hundene der SW ble påvist hadde diagnoser der blødning er involvert, (Sykdomsgruppe 10, 17 og 19 i Tabell 6 i Vedlegg 7), mens det totale antall hunder med slike diagnoser, (Sykdomsgruppe 10, 16, 17 og 19) ikke var mer enn 5 av 63. Dette kan tyde på en overpresentasjon av slike diagnoser blant de SW-positive hundene. Det er i tilfelle et forventet, men også interessant funn, ettersom det ikke har vært mistanker om rottegiftsforgiftning hos disse. En mulighet er at hunder som har en sykdom som gir økt blødningstendens av annen årsak enn vitamin K-antagonisme, kan få en forverret situasjon dersom subkliniske nivåer av SW foreligger. Det trengs videre studier med et større utvalg for å kunne konkludere om disse eller andre sykdomsgrupper faktisk er assosiert med eksponering for SW.

### ***Hvordan får hundene i seg rottegift?***

Med så mye som 20,6 % positive prøver og ingen direkte klar sammenheng med hvordan de har blitt eksponert, stiller vi spørsmålet; hvordan får hundene i seg rottegift? Et annet sentralt spørsmål er: Hvor omfattende er utleggelse av SW i Norge? Vi tror at det brukes store mengder SW som rottegift i Norge. Vi vil anta at de aller fleste gårdsbruk med korn- og dyreproduksjon har utlagt åte. Vi tror også at det er helt vanlig at SW er utlagt i bygårder i Oslo og i andre større byer.

SW har generelt mye lengre halveringstid enn førstegenerasjons antikoagulerende rottegifter og kan persistere over tid både hos dyr og i miljøet. (73,74) Som tidligere nevnt har det fram til nå vært veldig enkelt å få tak i rottegift for en privatperson. Rottegiften kan siden brukes hvordan og hvor som helst. Det kan ha blitt lagt ut i bygårder, i parker eller på hytta. Hunden kan bli eksponert primært eller sekundært for rottegiften. Primær eksponering er når de spiser åte og sekundær eksponering er når de spiser forgiftede målarter som rotte og mus.

Sekundærforgiftninger har blitt antatt som en vanlig årsak til forgiftning hos ville rovdyr. (75) Dersom preparatene blir utplassert uten åtestasjon (noe som har vært ulovlig i mange år) er risikoen betydelig større for at andre dyr enn rotter og mus får i seg stoffet. SW kan tenkes bli igjen i jorden etter at gnageren er nedbrutt. Det kan tenkes at det i sin tur kan forurense planter, bekker, sjøer og vanndammer. Hvis stoffet når vannet, kan også vannlevende dyr påvirkes. Hunder kan forgiftes ved å drikke fra slike vannkilder. Åtestasjoner som blir feilaktig montert kan bidra til et forurenset nærmiljø. Hvis regnvann kommer i kontakt med åtet, kan det bli spredt. En annen kilde for kontaminering av nærmiljøet er faeces fra forgiftede dyr. SW skilles ut i uforandret form med faeces. Hunder som spiser avføring kan være direkte utsatt. Andre mulige kilder som kan tenkes å forårsake forgiftning er hundefôr. Noen fôrer hundene sine med slakteavfall. Hvis dette kommer fra gris eller frittgående høns, kan det være en mulighet for at det inneholder spor av rottegifter. Gris er omnivor og kan være utsatt for både primær- og sekundærforgiftning. Dersom dette er tilfelle hadde det vært naturlig å også finne bakgrunnsnivåer av rottegift hos mennesker som spiser innmat. Denne informasjon mangler. Til sist kan det tenkes at eksponering for rottegift varierer med hensyn på årstider. Vår studie dekket kun sommerhalvåret, noe som er for kort tid til at vi kan konkludere. I en studie som ble gjort på rev ble det observert høyest forekomst av forgiftning høst, vinter og vår. (75)

Med denne studien har vi estimert at 20,6 % av Norges hunder kan gå med rester av SW i seg. Hvordan dette påvirker hundens helse er uklart. I en fransk studie fra 2004 ble det sett at mink med rottegiftsforgiftning ble mer utsatte for andre sykdommer. (76) Vi kan ikke med sikkerhet si om de eksponerte hundenes hemostase var påvirket selv om prøvene var positive. Det kan likevel tenkes. Hvis dette er tilfelle kan andre faktorer som påvirker koagulasjonen ha betydning for at hunden lettere utvikler koagulasjonsforstyrrelser ved SW forgiftning. Legemidler kan gi koagulasjonsforstyrrelser, både som ønsket effekt ved forebyggende behandling av tromboser eller som en uønsket bivirkning. Legemidler som antibiotika (som for eksempel sulfonamider og metronidazol), NSAIDs, og glukokortikoider eller ved administrasjon av vitamin E (de som gir hunden sin tran) kan gi dette. Sykdommer som viremi eller levende virusvaksiner, leversykdom, eksokrin pankreasinsuffisiens, intestinal malabsorpsjon og DIC kan også forverre koagulasjonsforstyrrelser. Vi kan ikke utelukke at påkjenninger som dette hos en hund som har blitt eksponert for rottegift kan være utløsende for ”uforklarlig” blødning eller forverring av tilstanden.

Vanligvis snakker vi om SW generelt, men flere ulike kinetikkstudier viser at  $V_d$ ,  $Cl_p$  og halveringstid ikke er de samme for de ulike SW eller for ulike arter. Dette er faktorer som gjør diagnostikken vanskelig. En ytterligere faktor som gjør diagnostikken vanskelig er at vi nå må anta at det forekommer et bakgrunnsnivå av SW hos den norske hundepopulasjonen. Hvordan skal vi tolke en positiv prøve fra en symptomfri hund kontra en hund med blødningssymptomer? Som tidligere nevnt vurderer Veterinærinstituttet å innføre en kvalitativ analysemetode for å påvise SW i lever. Med en kvalitativ metode vil det imidlertid bli vanskelig å tolke betydningen av disse leveranalysene. Metoden burde være kvantitativ slik at vi kan estimere om konsentrasjonen i leveren er toksisk eller ikke. Da det sjelden tas

leverprøver ante mortem, kunne det i stedet vært mer aktuelt å ta en blodprøve for å analysere SW. I en studie hos hund, ble brodifakum påvist i serum 24 timer etter eksponering og de høyeste verdiene fantes etter 3-6 dager. Det gikk ikke lenger å påvise 30 dager etter eksponering. (22) DuVall et al. fant generelt lave nivåer av brodifakum i serum og større mengder i lever. DuVall et al. mente likevel at måling av serumnivåer var nyttig da det kunne brukes som en pekepinn for hvor lenge vitamin K<sub>1</sub> -behandlingen skulle pågå. (77) Robben et al. så at man ikke alltid kunne måle SW i plasma selv om det ble påvist i lever og dermed mente at måling av plasma ikke var pålitelig. (48) At DuVall og Robben et al. kom frem til forskjellige resultater kan bero på at de benyttet ulike metoder. SW kan ha ulik oppholdstid i serum, plasma og lever på grunn av forskjell i affinitet til transportproteiner og annet vev. Halveringstidene som ble oppgitt var mistenkelig korte og er mest sannsynlig fra den første eliminasjonsfasen da stoffene trolig har et bieksponentielt utskillelsesmønster også hos hund. Blodprøveanalysene pågikk over for kort tid til å få med seg hele eliminasjonsfasen. Å analysere serum eller plasma for SW virker uansett som et godt diagnostisk verktøy. Det er viktig å være klar over at hvis blodprøven er negativ, kan hunden likevel være forgiftet. Andre interessante diagnostiske metoder er å undersøke faeces. Dette har blitt gjort eksperimentelt på rev. Der ble det undersøkt for bromadiolon i faeces og i plasma. I faeces ble bromadiolon påvist ved første måling etter eksponering (15 timer) og ble også påvist i faeces frem til 26 dager etter eksponering. Bromadiolon ble funnet i plasma 7-24 dager etter siste eksponering. Hos menneske har det også blitt sett at man kan påvise SW i hår. (78). Dette er interessante studier som viser til at det kan finnes alternative undersøkelsesmetoder for å påvise SW. Det må likevel gjennomføres flere studier som ser på farmakokinetikk og farmakodynamikk hos hund for å få vite mer om hvordan stoffene fordeler seg hos denne arten.

Da vi hadde mange leverprøver som var positive for SW, hadde det vært interessant å gjøre en retrospektiv epidemiologisk studie på disse kasus. Å kartlegge sykdomshistorie, diagnoser, medikamentbruk samt kontakte tidligere eiere for å få informasjon om hundens bruksområde og tidligere oppholdsmiljø. Eventuelle lagrede blodprøver kunne også blitt undersøkt for å sammenligne forekomsten av SW i lever og i serum, plasma og fullblod.

### ***Konklusjon***

Den norske hundepopulasjonen er eksponert for SW. Vi kan derfor ikke verifisere diagnosen ”rottegiftsforgiftning” kun på bakgrunn av positive leverprøver. Derimot vil en negativ leverprøve gjøre en mistanke om slik forgiftning lite sannsynlig. Det finnes få studier gjort på hund i forhold til farmakokinetikk og farmakodynamikk hos de ulike SW. Dette er nødvendig for å forbedre diagnostikken. I tillegg trengs en grundigere undersøkelse av mulige kilder som forårsaker kontaminering og forgiftning av hund.



## **Takk til bidragsyttere**

Vi vil takke Lars Moe for hans store entusiasme og engasjement. Han har øst av sin kunnskap og gjort arbeidet meget interessant. En takk til Andreas Lervik som har trådt til når vi har behovd ekstra hjelp. Lars og Andreas var idéskaperne til prosjektet. De kom med en interessant problemstilling. Veterinærinstituttet positive vilje til å analysere leverprøver på et område som er nedprioritert, var uvurderlig hjelp for gjennomføring av dette prosjektet. Støtten kom helt fra toppen av VI. Det setter vi stor pris på. Toksikologen Morten Sandvik fra VI må vi også takke. Han stod på for å få i gang analysemaskinen som ikke var særlig medgjørlig og brukte tid for å veilede oss i forbindelse med opparbeiding og analysering av leverprøvene på laboratoriet. Denne studien hadde heller ikke blitt noe av dersom det ikke hadde vært for Tore Engen og Veronika Stabell ved patologen på NMBU-Veterinærhøgskolen. Takk også til Gjermund Gunnes som vil være med og fortsette videre undersøkelser og til Astrid Cecilie Joensen, som har hjulpet oss med å hente leverprøver hos patologen.

## **Summary**

*Title:* Prevalence of superwarfarins in dogs – a survey of background levels in liver samples of autopsied dogs.

*Authors:* Sara Olerud, Jeanette Pedersen og Eiril Pettersen

*Supervisors:* Lars Moe, Andreas Lervik, Gjermund Gunnes og Jens Børsum, Department of Companion Animal Clinical Sciences, Department of Basic Sciences and Aquatic Medicine and Norwegian Veterinary Institute.

Anticoagulant rodenticides of the warfarin types are widely used in Norway and the effects and side effects have been poorly regulated. New more potent rodenticides, such as superwarfarins (SW), can persist over time in both animals and environment. In a study from 2009-2011, SW was found in the liver in 70 % of Golden Eagles and 50 % of Eurasian Eagle-Owl in Norway. We decided to perform a survey of the concentration of SW in liver in a group of deceased dogs from the Norwegian dog population.

The included dogs were randomly selected irrespectively of illness or clinical signs and therefore represent a background population. Samples from 63 deceased dogs were collected shortly after euthanasia during a six months period (April-September). A total of 20.6 % (13/63) of these liver samples were positive for SW (bromadiolone, difenacoum, difethialone or flocoumafen). The result showed that Norwegian dogs, in a surprisingly large extent, had been exposed to rodenticides. The report reviews the coagulation system, the mechanism of SW poisoning and discusses the current diagnostic tools of rodenticide poisoning and possible improvements. There are few published studies on dogs regarding pharmacokinetics and pharmacodynamics of SW. Increased knowledge about the turnover of SW in the canine body is needed in order to improve diagnostics and therapy in dogs. We have not found any

publications that discuss the source of SW in dogs, and a more thorough investigation of possible sources of poisoning is therefore needed.

## **Referanser**

- (1) Bhonoah Y. Warfarin, Historical. Available at: <http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/bhonoah/historical.html>. Accessed 11/5, 2014.
- (2) Thijssen HHW. Warfarin-based rodenticides: mode of action and mechanism of resistance. *Pesticide Science* 1995;43(1):73-78.
- (3) Veenstra GE, Huckle KR. Metabolic and Toxicological Studies on the Anticoagulant Rodenticide, Flocoumafen. *Arch Toxicol* ,Suppl 1991;14:160-165.
- (4) Lipton RA, Klass EM. Human Ingestion of a "Superwarfarin" Rodenticide Resulting in a Prolonged Anticoagulant Effect. *J Am Vet Med Assoc* 1984;252(21):3004-3005.
- (5) Langford KH, Reid M, Thomas KV. The occurrence of second generation anticoagulant rodenticides in non-target raptor species in Norway. *Sci Total Environ* 2013 Apr 15;450-451:205-208.
- (6) Sandvik M. Veterinærinstituttet 2014;Tidligere tilbud om analyse for rottegift.
- (7) Barr JW, McMichael M. Inherited disorders of hemostasis in dogs and cats. *Top Companion Anim Med* 2012 May;27(2):53-58.
- (8) Aslanian ME, Sharp CR, Rozanski EA, de Laforcade AM, Rishniw M, Brooks MB. Clinical outcome after diagnosis of hemophilia A in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2014 Sep 15;245(6):677-683.
- (9) White JG. Morphological and functional aspects of cellular hemostatic mechanisms. *Hämostaseologie* 1996;78:108-111.
- (10) Bauer KA. Activation of the factor VII-tissue factor pathway. *Thromb Haemost* 1997 Jul;78(1):108-111.
- (11) Schmaier AH. Contact activation: a revision. *Thromb Haemost* 1997 Jul;78(1):101-107.
- (12) Mantovani A, Sozzani S, Vecchi A, Introna M, Allavena P. Cytokine activation of endothelial cells: new molecules for an old paradigm. *Thromb Haemost* 1997 Jul;78(1):406-414.
- (13) Wagner DD, Bonfanti R. von Willebrand factor and the endothelium. *Mayo Clin Proc* 1991 Jun;66(6):621-627.
- (14) Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 1996 Jan 1;81(1):1-41.
- (15) Sabharwal AK, Birktoft JJ, Gorka J, Wildgoose P, Petersen LC, Bajaj SP. High affinity Ca(2+)-binding site in the serine protease domain of human factor VIIa and its role in tissue

factor binding and development of catalytic activity. *J Biol Chem* 1995 Jun 30;270(26):15523-15530.

(16) Ruf W, Rehemtulla A, Morrissey JH, Edgington TS. Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function. *J Biol Chem* 1991 Aug 25;266(24):16256.

(17) Bauer KA, Kass BL, ten Cate H, Hawiger JJ, Rosenberg RD. Factor IX is activated in vivo by the tissue factor mechanism. *Blood* 1990 Aug 15;76(4):731-736.

(18) Nemerson Y. The tissue factor pathway of blood coagulation. *Semin Hematol* 1992 Jul;29(3):170-176.

(19) Blombäck B. Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thrombosis research* 1996;83(1):1-75.

(20) Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009 Feb;19(1):3-10.

(21) Mount ME, Feldman BF. Mechanism of diphacinone rodenticide toxicosis in the dog and its therapeutic implications. *Am J Vet Res* 1983 Nov;44(11):2009-2017.

(22) Woody BJ, Murphy MJ, Ray AC, Green RA. Coagulopathic effects and therapy of brodifacoum toxicosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1992;6:23-28.

(23) Watt BE, Proudfoot AT, Bradberry SM, Vale JA. Anticoagulant rodenticides. *Toxicol Rev* 2005;24(4):259-269.

(24) Frank J, Weiser H, Biesalski HK. Interaction of vitamins E and K: effect of high dietary vitamin E on phyloquinone activity in chicks. *Int J Vitam Nutr Res* 1997;67(4):242-247.

(25) Dowd P, Zheng ZB. On the mechanism of the anticlotting action of vitamin E quinone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Aug 29;92(18):8171-8175.

(26) Pepper ES, Wosilait WD. Multiple factors affecting excretion of warfarin in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1977 Oct;18(2):275-281.

(27) Conly J, Stein K. Reduction of vitamin K2 concentrations in human liver associated with the use of broad spectrum antimicrobials. *Clin Invest Med* 1994 Dec;17(6):531-539.

(28) Hale SF, Lesar TS. Interaction of vitamin K antagonists and trimethoprim-sulfamethoxazole: ignore at your patient's risk. *Drug Metabol Drug Interact* 2014;29(1):53-60.

(29) Hromadkova L, Vlcek J. Interactions between glucocorticoids and warfarin in chronic inflammatory (autoimmune) diseases. *Vnitr Lek* 2012 May;58(5):354-356.

(30) Wigton DH, Kociba GJ, Hoover EA. Infectious canine hepatitis: animal model for viral-induced disseminated intravascular coagulation. *Blood* 1976 Feb;47(2):287-296.

- (31) Perry LA, Williams DA, Pidgeon GL, Boosinger TR. Exocrine pancreas insufficiency with associated coagulopathy in a cat. *Am Anim Hosp Assoc* 1991;27(1):109.
- (32) Vandenbroucke V, Bousquet-Melou A, De Backer P, Croubels S. Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration. *J Vet Pharmacol Ther* 2008 Oct;31(5):437-445.
- (33) Murphy MJ. Anticoagulant rodenticides. In: Gupta RC, editor. *Veterinary Toxicology*. 1st ed. USA: Elsevier; 2007. p. 525-547.
- (34) Bachmann KA, Sullivan TJ. Dispositional and Pharmacodynamic Characteristics of Brodifacoum in Warfarin-Sensitive Rats. *Pharmacology* 1983;27:281-288.
- (35) Breckenridge AM, Cholerton S, Hart JAD, Park BK, Scott AK. A study of the relationship between the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of the 4-hydroxycoumarin anticoagulants warfarin, difenacoum and brodifacoum in the rabbit. *Br J Pharmac* 1985;84:081-091.
- (36) Park BK. Warfarin: Metabolism and mode of action. *Biochemical Pharmacology* 1988;37(1):19-27.
- (37) Dale MM, Rang HP, Ritter JM. Haemostasis and thrombosis. *Pharmacology*. 4th ed.: Churchill Livingstone; 1999. p. 316.
- (38) Harrison TR. Antiplatelet, Anticoagulant and fibrinolytic drugs. In: Longo DL, Kasper DL, Jameson J. Larry., Fauci AS, Hausen Stephen L., Loscalzo J, editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 18th ed.: McGrawHill; 2011. p. 998-999.
- (39) Berny PJ, de Oliveira LA, Videmann B, Rossi S. Assessment of ruminal degradation, oral bioavailability, and toxic effects of anticoagulant rodenticides in sheep. *Am J Vet Res* 2006 Feb;67(2):363-371.
- (40) Dale MM, Rang HP, Ritter JM. Absorption and distribution of drugs. *Pharmacology*. 4th ed.: Churchill Livingstone; 1999. p. 66.
- (41) O'Reilly RA. Warfarin metabolism and drug-drug interactions. *Adv Exp Med Biol* 1987;214:205-212.
- (42) Thijssen HHW, Baars LGM. Hepatic Uptake and Storage of Warfarin. The Relation with the Target Enzyme Vitamin K 2,3-Epoxy Reductase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1987;243(3):1082-1088.
- (43) Thijssen HHW, Baars LGM. Tissue Distribution of Selective Warfarin Binding Sites in the Rat. *Biochemical Pharmacology* 1991;42(11):2181-2186.
- (44) Yu CC, Atallah YH, Whitacre DM. Metabolism and disposition of diphacinone in rats and mice. *Drug Metab Dispos* 1982 Nov-Dec;10(6):645-648.

- (45) Sage M, Fourel I, Coeurdassier M, Barrat J, Berny P, Giraudoux P. Determination of bromadiolone residues in fox faeces by LC/ESI-MS in relationship with toxicological data and clinical signs after repeated exposure. *Environ Res* 2010 Oct;110(7):664-674.
- (46) Renpei N, Levy G. Comparative Pharmacokinetics of Coumarin Anticoagulants V: Kinetics of Warfarin Elimination in the Rat, Dog and Rhesus Monkey Compared to man. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1969;58(7):845-849.
- (47) Eason CT, Murphy EC, Wright GR, Spurr EB. Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zealand. *Ecotoxicology* 2002 Feb;11(1):35-48.
- (48) Robben JH, Kuijpers EA, Mout HC. Plasma superwarfarin levels and vitamin K1 treatment in dogs with anticoagulant rodenticide poisoning. *Vet Q* 1998 Jan;20(1):24-27.
- (49) Valentina O, López CM. Brodifacoum poisoning with toxicokinetic data. *Clinical Toxicology* 2007;45:487-489.
- (50) Mount ME. Diagnosis and therapy of anticoagulant rodenticide intoxications. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1988 Jan;18(1):115-130.
- (51) Seljetun K, Sjøli N. Forgiftninger med superwarfariner hos hund og katt. *NVT* 2006;118:301-305.
- (52) Plumlee K. *Clinical veterinary toxicology*: Mosby; 2004. p. 444-446.
- (53) Willard M, Tvedten H. Hemostatic abnormalities. In: Tvedten H, editor. *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. 5th ed.: Elsevier; 2012. p. 100-101.
- (54) Nelson R, Couto C. Disorders of hemostasis ch.87. In: Couto C, editor. *Small animal internal medicine*. 4th ed.: Mosby Elsevier; 2004. p. 1242-1259.
- (55) Willard M, Tvedten H. Appendix II: Listing of selected reference values. In: Tvedten H, editor. *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. 5th ed.: Elsevier; 2012. p. 400.
- (56) Cowell RL, Frye M. Understanding your coagulation testing options aPTT/PT vs. ACT. *Idexx Laboratories inc* 2007.
- (57) Mount ME, Kim BU, Kass PH. Use of a test for proteins induced by vitamin K absence or antagonism in diagnosis of anticoagulant poisoning in dogs: 325 cases (1987-1997). *J Am Vet Med Assoc* 2003 Jan 15;222(2):194-198.
- (58) Rozanski EA, Drobatz KJ, Hugher D, Scotty M, Grieger U. Thrombotest (PIVKA) Test result in 25 dogs with acquired and hereditary coagulopathies. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 1999;9(2):73-78.
- (59) Sjøli N, Seljetun K. Forgiftninger. Available at: <http://felleskatalogen.no/medisin-vet/forgiftninger/generell/rottegift>. Accessed 11/12, 2014.
- (60) Fiore LD, Scola MA, Cantillon CE, Brophy MT. Anaphylactoid reactions to vitamin K. *J Thromb Thrombolysis* 2001 Apr;11(2):175-183.

- (61) Valchev I, Binev R, Yordanova V, Nikolov Y. Anticoagulant rodenticides in toxication in animals - A review. *Turk J Vet Anim Sci* 2008;32(4):237-243.
- (62) Yan H, Xiang P, Zhu L, Shen M. Determination of bromadiolone and brodifacoum in human blood using LC-ESI/MS/MS and its application in four superwarfarin poisoning cases. *Forensic Sci Int* 2012 Oct 10;222(1-3):313-317.
- (63) Vindenes V, Karinen R, Hasvold I, Bernard JP, Morland JG, Christophersen AS. Bromadiolone poisoning: LC-MS method and pharmacokinetic data. *J Forensic Sci* 2008 Jul;53(4):993-996.
- (64) Boettcher S, Wacker A, Moerike K, Kopp HG, Jaschonek K, Grobosch T, et al. Acquired coagulopathy caused by intoxication with the superwarfarin-type anticoagulant rodenticide flocoumafen. *Eur J Haematol* 2011 Feb;86(2):173-175.
- (65) Vandenbroucke V, Desmet N, De Backer P, Croubels S. Multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatography combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008 Jun 15;869(1-2):101-110.
- (66) Vudathala D, Cummings M, Murphy L. Analysis of multiple anticoagulant rodenticides in animal blood and liver tissue using principles of QuEChERS method. *J Anal Toxicol* 2010 Jun;34(5):273-279.
- (67) Fauconnet V, Pouliquen H, Pinault L. Reversed-phase HPLC determination of eight anticoagulant rodenticides in animal liver. *J Anal Toxicol* 1997 Nov-Dec;21(7):548-553.
- (68) Lovdata. Forskrift om biocider. Lovdata 2014.
- (69) Miljødirektoratet. Deklareringsplikt. 2014; Available at: <http://www.miljodirektoratet.no/no/Tema/Kjemikalier/Produktregisteret/Deklareringsplikt/>. Accessed 11/11, 2014.
- (70) Gausdal A. Om biocider i Norge. Miljødirektoratet 2014.
- (71) Norstein S. Om bruk av rottegifter i Norge. Anticimex 2014.
- (72) Waddell LS, Poppenga RH, Drobatz KJ. Anticoagulant rodenticide screening in dogs: 123 cases (1996-2003). *J Am Vet Med Assoc* 2013 Feb 15;242(4):516-521.
- (73) Giraudoux P, Tremollières C, Barbier B, Defaut R, Rieffel D, Bernard N, et al. Persistence of bromadiolone anticoagulant rodenticide in *Arvicola terrestris* populations after field control. *Environ Res* 2006 Nov;102(3):291-298.
- (74) Sage M, Coeurdassier M, Defaut R, Lucot E, Barbier B, Rieffel D, et al. How environment and vole behaviour may impact rodenticide bromadiolone persistence in wheat baits after field controls of *Arvicola terrestris*? *Environ Pollut* 2007 Jul;148(1):372-379.



(75) Berny PJ, Buronfosse T, Buronfosse F, Lamarque F, Lorgue G. Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere* 1997 Oct;35(8):1817-1829.

(76) Fournier-Chambrillon C, Berny PJ, Coiffier O, Barbedienne P, Dasse B, Delas G, et al. Evidence of secondary poisoning of free-ranging riparian mustelids by anticoagulant rodenticides in France: implications for conservation of European mink (*Mustela lutreola*). *J Wildl Dis* 2004 Oct;40(4):688-695.

(77) DuVall MD, Murphy MJ, Ray AC, Reagor JC. Case studies on second-generation anticoagulant rodenticide toxicities in nontarget species. *J Vet Diagn Invest* 1989 Jan;1(1):66-68.

(78) Zhu L, Yan H, Shen B, Shi Y, Shen M, Xiang P. Determination of bromadiolone and brodifacoum in human hair by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its application to poisoning cases. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2013 Feb 28;27(4):513-520.

(79) Sjaastad ØV, Sand O, Hove K. Blood and its function. *Physiology of domestic animals*; 2010.

(80) Farm Chemicals international. Flocoumafen. 2014; Available at: <http://www.farmchemicalsinternational.com/crop-protection-database/#!/product/detail/186440/>. Accessed 11/19, 2014.

## **Vedlegg 1**

### ***Liste over koagulasjonsfaktorene***

Faktor I (fibrinogen)

Faktor II (protrombin)

Faktor III (vevsfaktor)

Faktor IV (kalsium)

Faktor V (proaccelerin)

Faktor VI

Faktor VII (proconvertin)

Faktor VIII (antihemofil faktor A)

Faktor IX (Christmas faktor, plasma tromboplastin komponent)

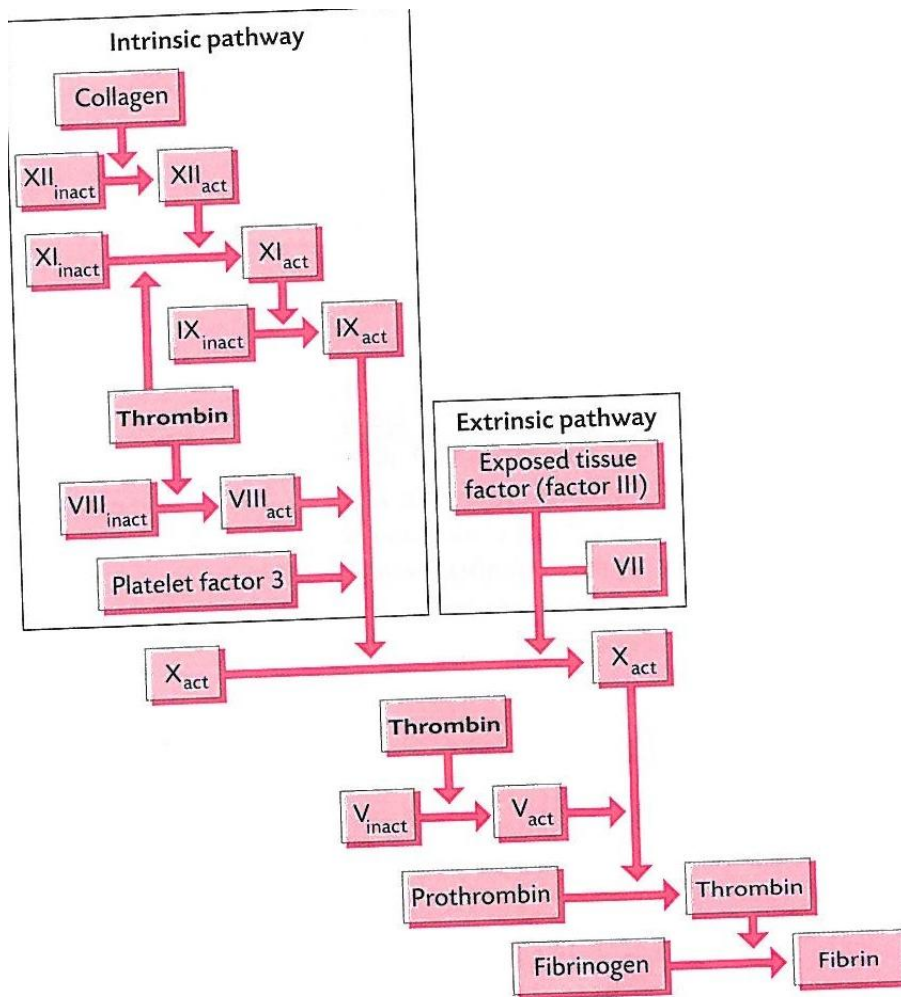
Faktor X (Stuart-Prower faktor)

Faktor XI (Rosenthal faktor, plasma tromboplastin forløper)

Faktor XII (Hageman faktor)

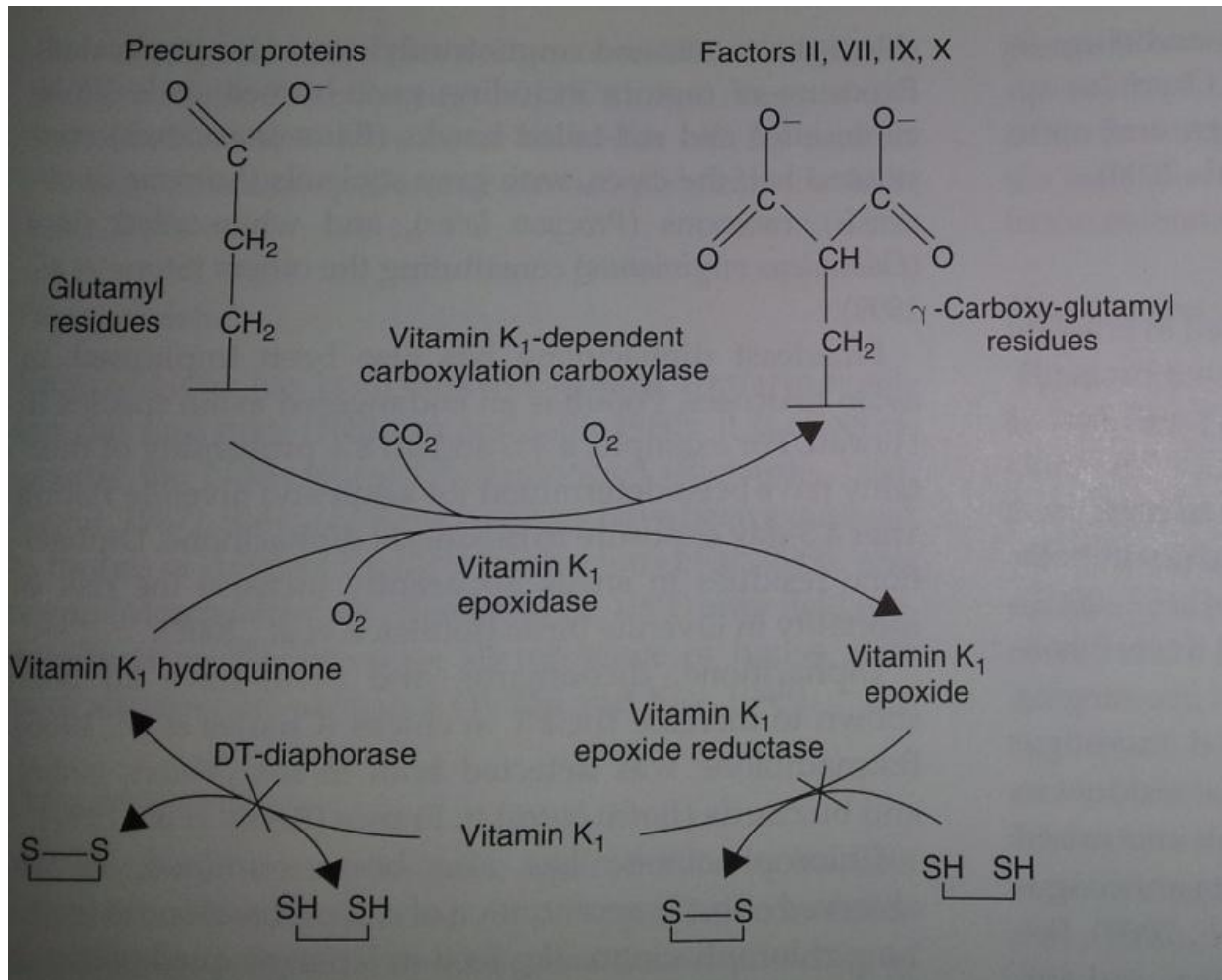
Faktor XIII (fibrinstabiliserende faktor)

## Vedlegg 2



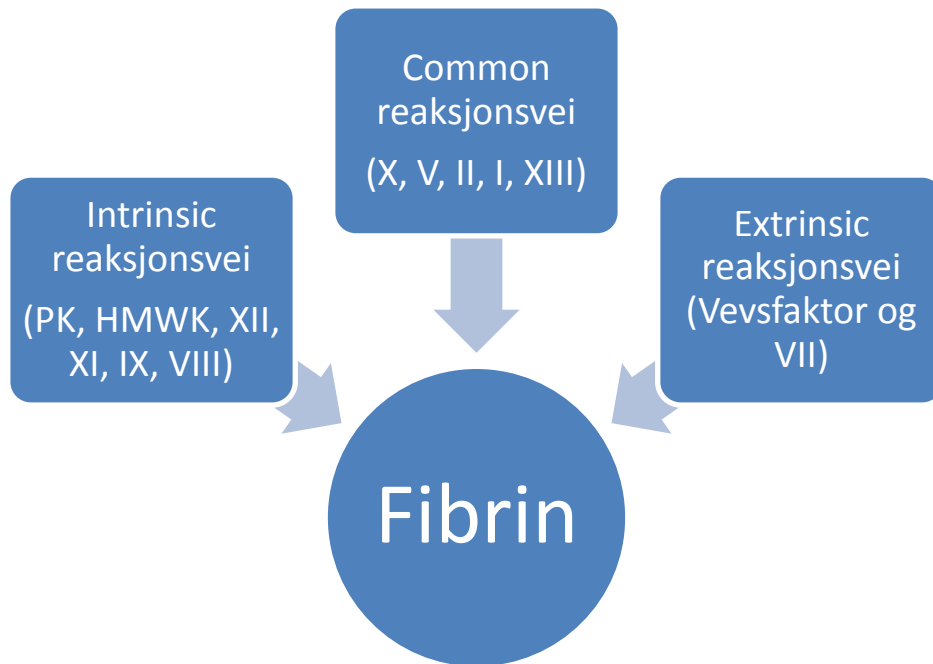
*Figur 1, Intrinsic og extrinsic reaksjonsvei*

(79)



**Figur 2, Levermetabolisme av vitamin K**

(33)



*Figur 3, Forholdet mellom extrinsic, intrinsic og common reaksjonsvei.*

**Tabell 1, Kjente parametre ved rottegiftsforgiftning hos hund**

Hund	Plasma T <sub>1/2</sub> (dager)	Serum T <sub>1/2</sub> (dager)	Påvist i lever antall dager etter eksponering	Detekterbart i plasma timer etter eksponering	Ikke lenger detekterbart (dager etter eksponering)	Høyeste nivå (dager etter eksponering)
Brdoifakum	0.9-4.7 (mean 2.4)	6 ± 4 dager		24	30	3-6
Difetialon	2.2 og 3.2					
Flokumafen			301			
Warfarin	22-23					

**Tabell 2, Tolkning av parametre ved rottegiftsforgiftning**

Blødningstid (BT), aktivert koagulasjonstid (ACT), protrombin tid (PT), aktivert partiell tromboplastintid (aPTT), fibrin degraderingsprodukter (FDPs) ↑ høy eller forlenget, ↓ = nedsatt eller forkortet, ? = usikkert, N= normal

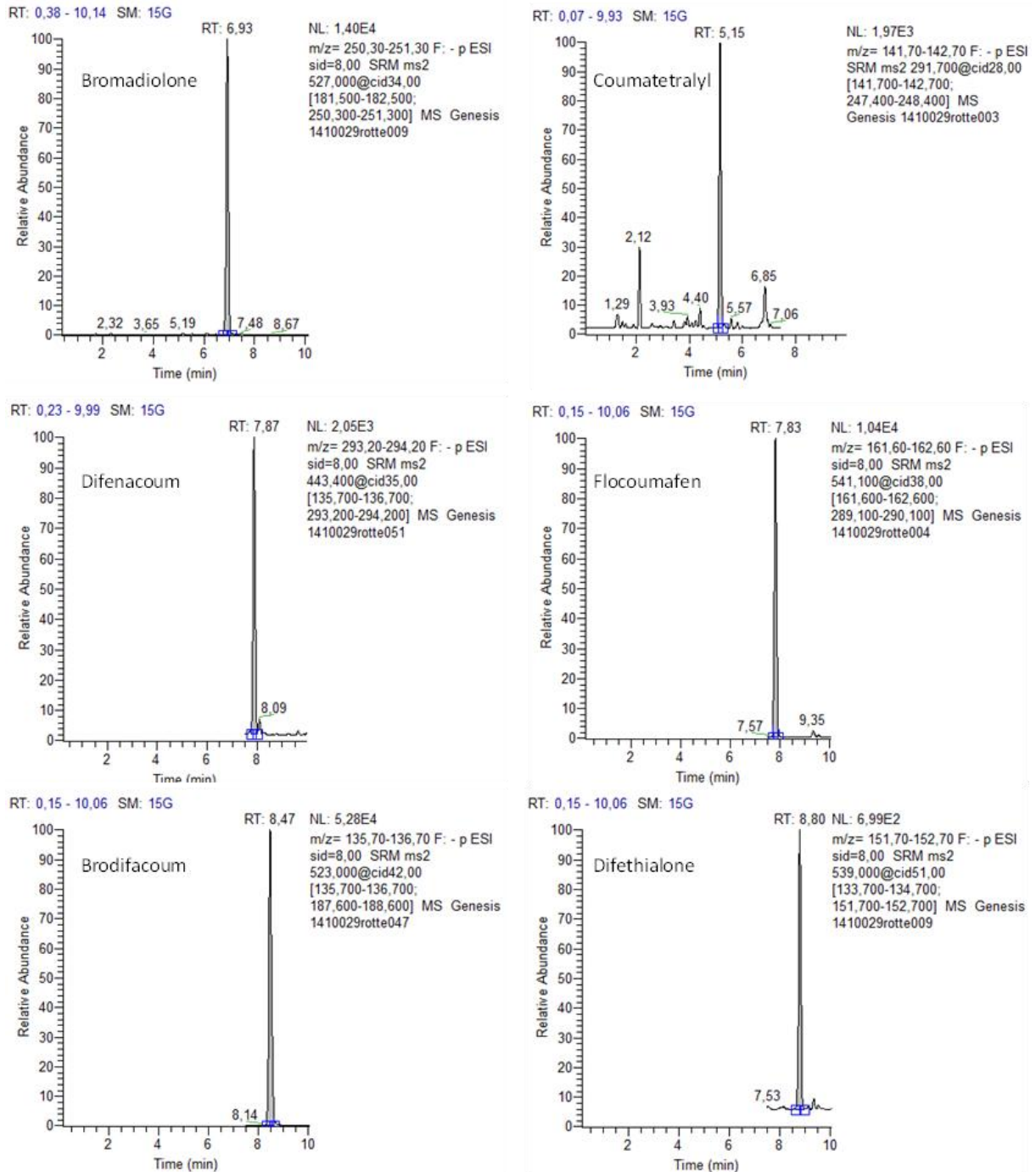
Årsak	BT	ACT	PT	aPTT	Plater	Fibrinogen	FDPs
Rottegiftsforgiftning	N/↑?	↑	↑	↑	N/↓	N/↓	N/↑

## Vedlegg 3

*Tabell 1, LC-MS/MS parametre*

<b>Compound</b>	<b>Mw</b>	<b>Mass Transition (<i>m/z</i>)</b>	<b>Collision Energy (V)</b>
Flocoumafen	542,54	542,2>161,1	43
		542,2>383,1	43
Difethialone	539,48	539,1>151,1	37
		539,1>203,1	37
Difenacoum	444,52	443,2>293,1,1	35
		443,2>135,1	34
Bromadiolone	527,41	527,1>181,1	37
		527,1>250,1	37
Brodifacoum	523,42	521,1>135,1	40
		521,1>187,1	40
Coumatetralyl	292,33	291,1>141,1	23
		291,1>247,1	23
Warfarin	308,33	307,1>161,1	22
		307,1>250,1	22

Figur 1, MS/MS kromatogrammer av lever fra hunder positive for rottegift

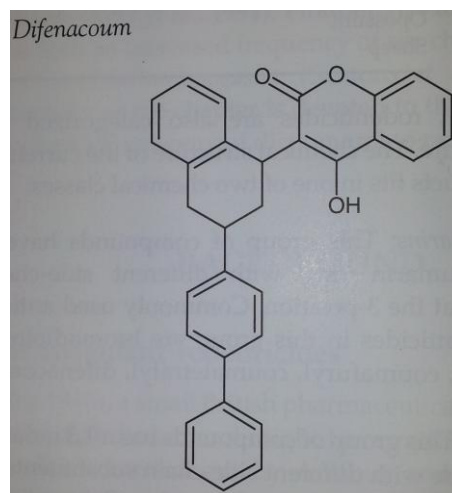
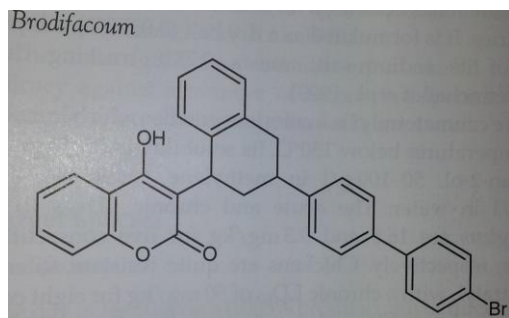
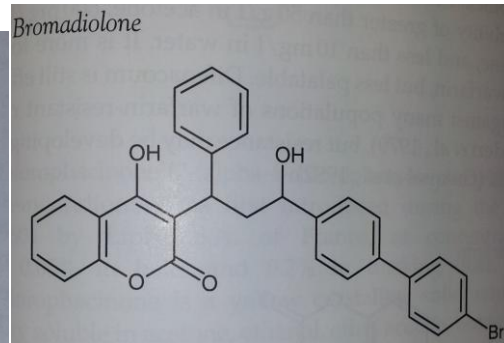
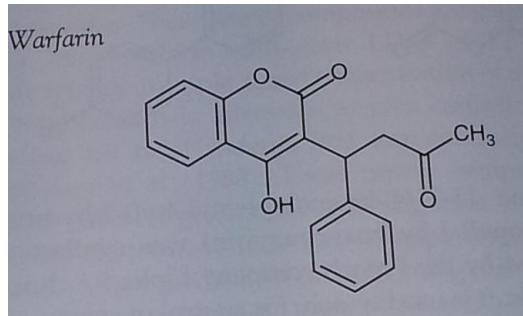




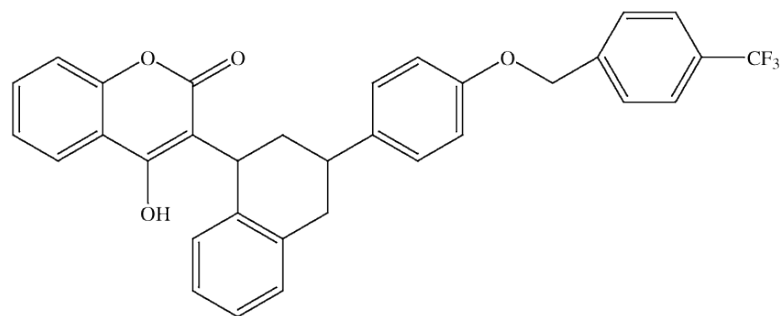
## Vedlegg 4

### Molekylstrukturer

(33)



Flokumafen. (80)



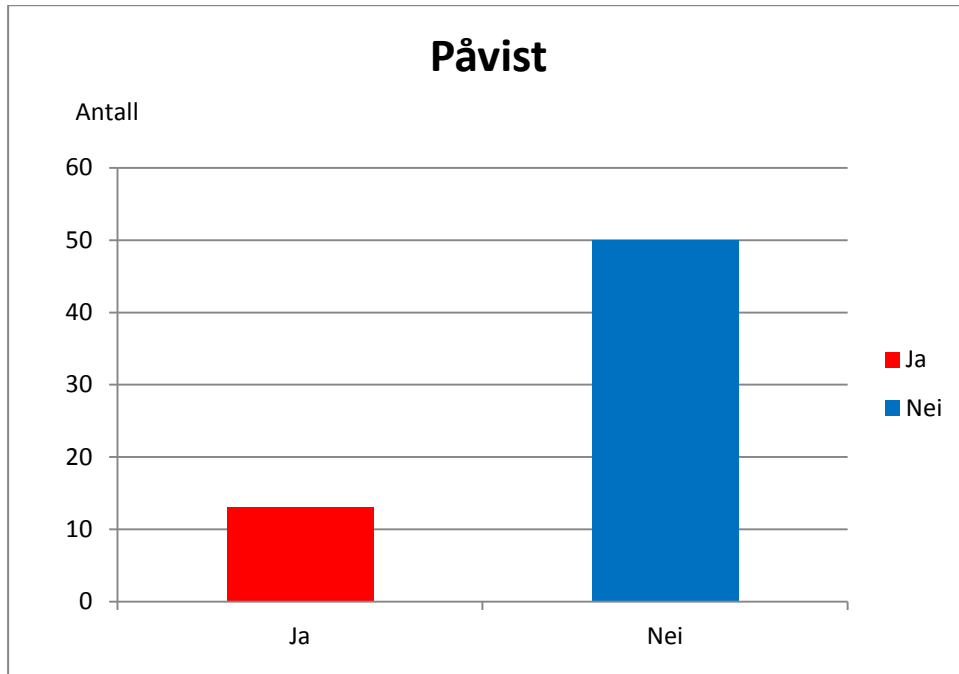
## Vedlegg 5

*Tabell 1, Beregning av utvalgsstørrelse*

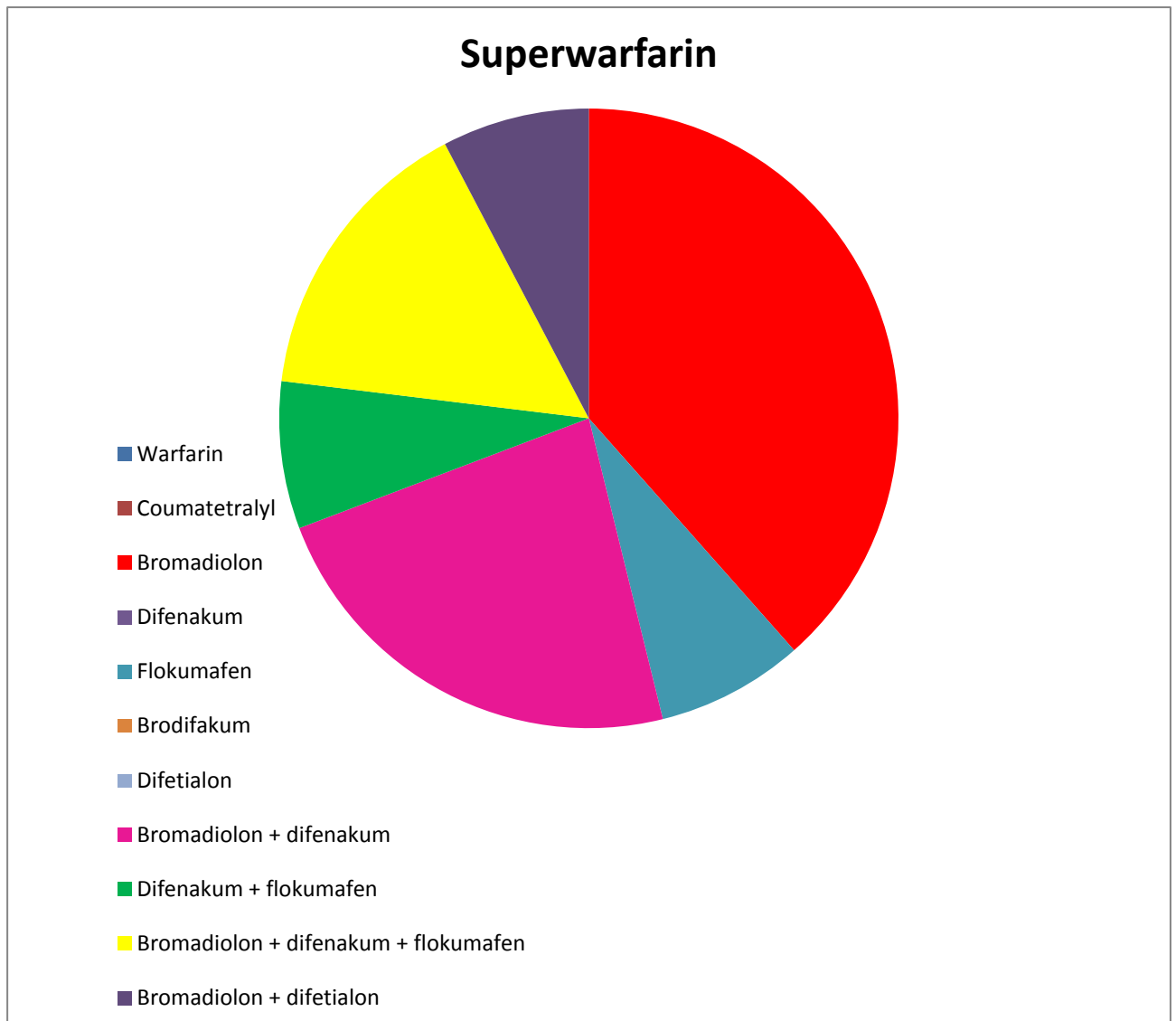
Estimert pop. prevalens	0,10 (10 %)			<b>0,20 (20 %)</b>			0,30 (30 %)		
Standardavvik	0,05	0,1	0,2	0,05	<b>0,1</b>	0,2	0,05	0,1	0,2
KI	0,95	0,95	0,95	0,95	<b>0,95</b>	0,95	0,95	0,95	0,95
Resultat (n)	138	35	9	246	<b>61</b>	15	323	81	20

## Vedlegg 6, Figurer

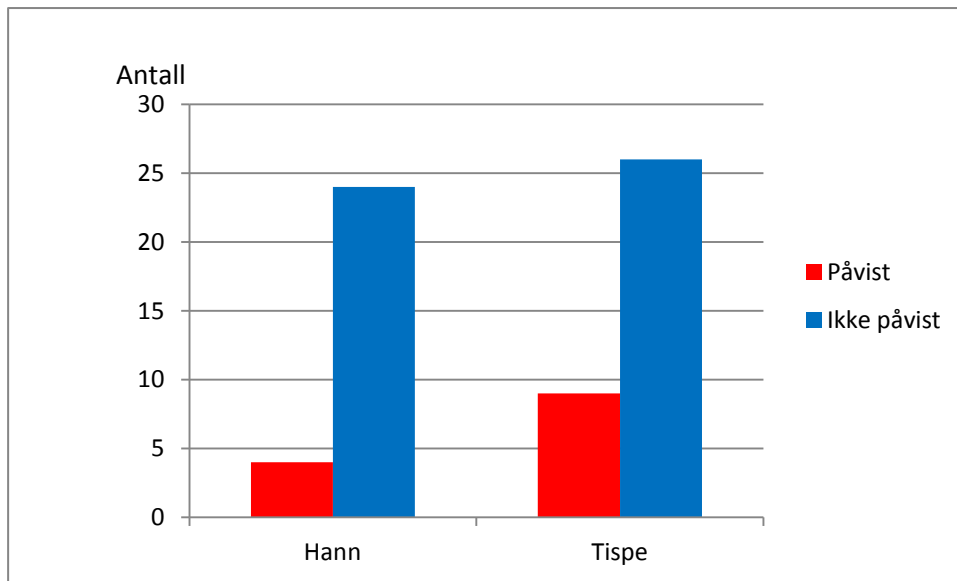
*Figur 1, Forekomst av superwarfariner*



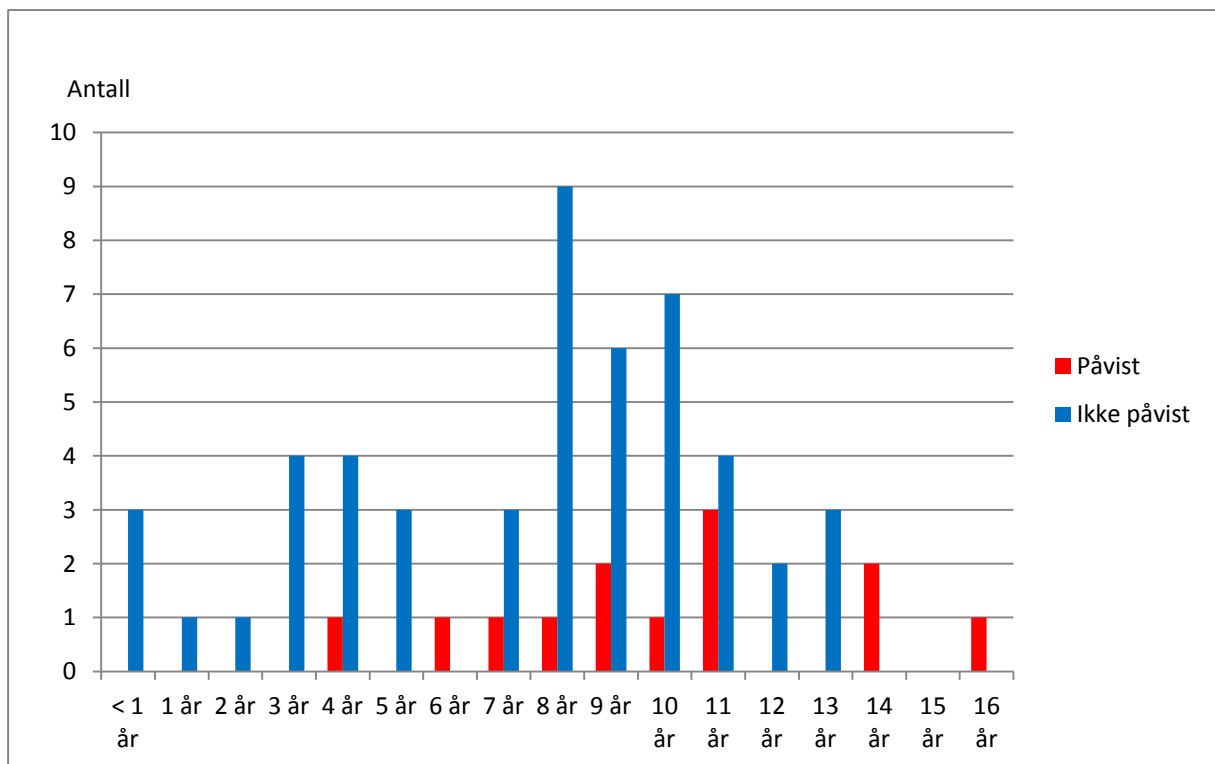
Figur 2, Fordeling av superwarfariner i positive leverprøver



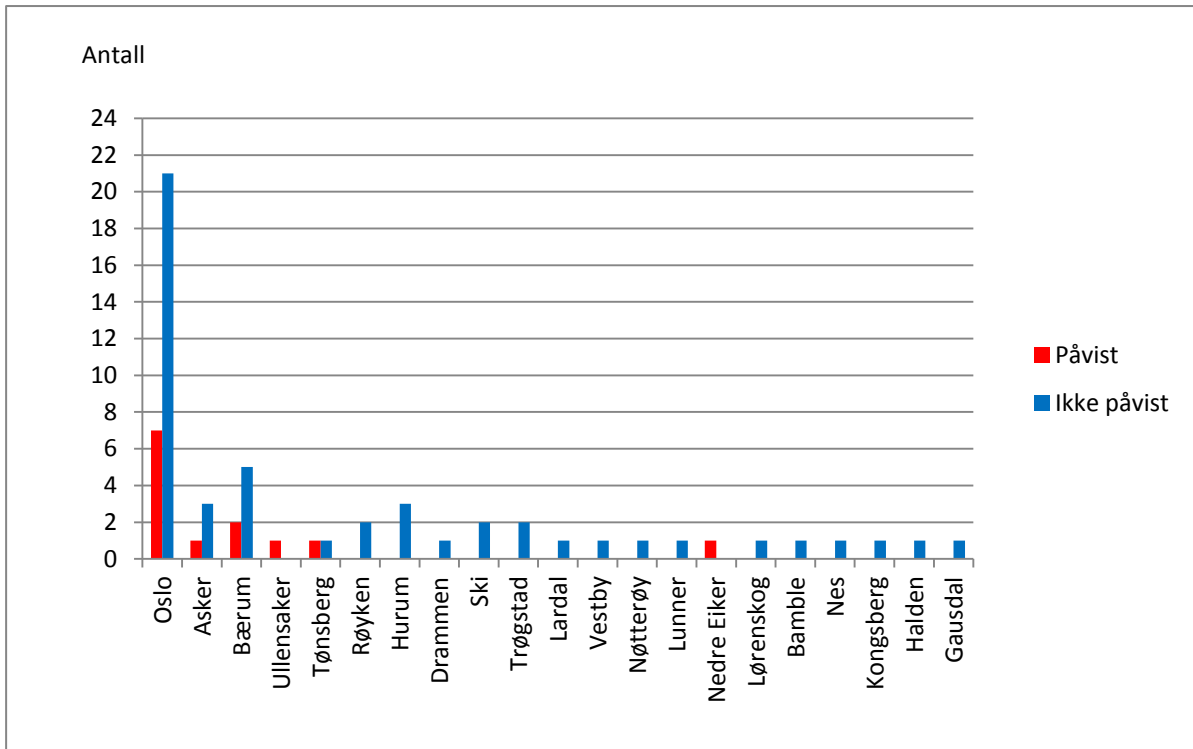
**Figur 3, Fordeling mellom kjønn**



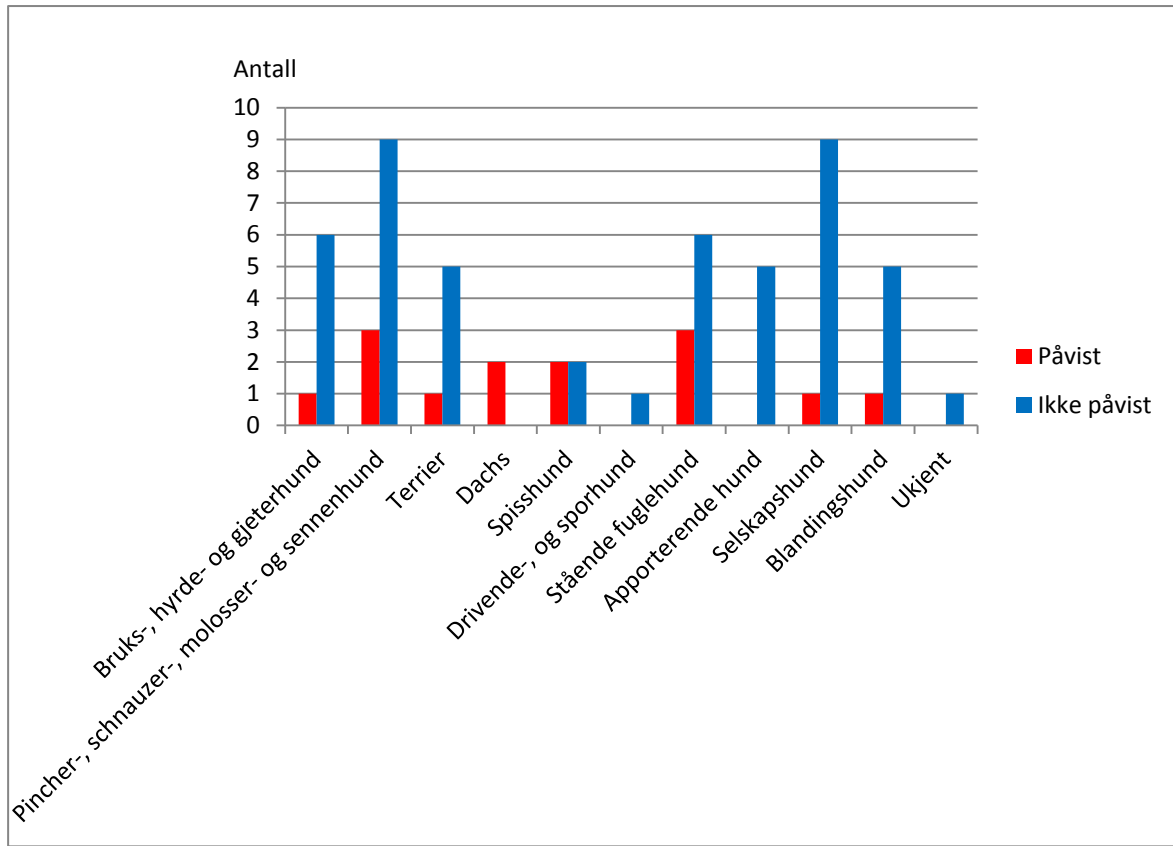
**Figur 4, Fordeling av aldersgrupper**



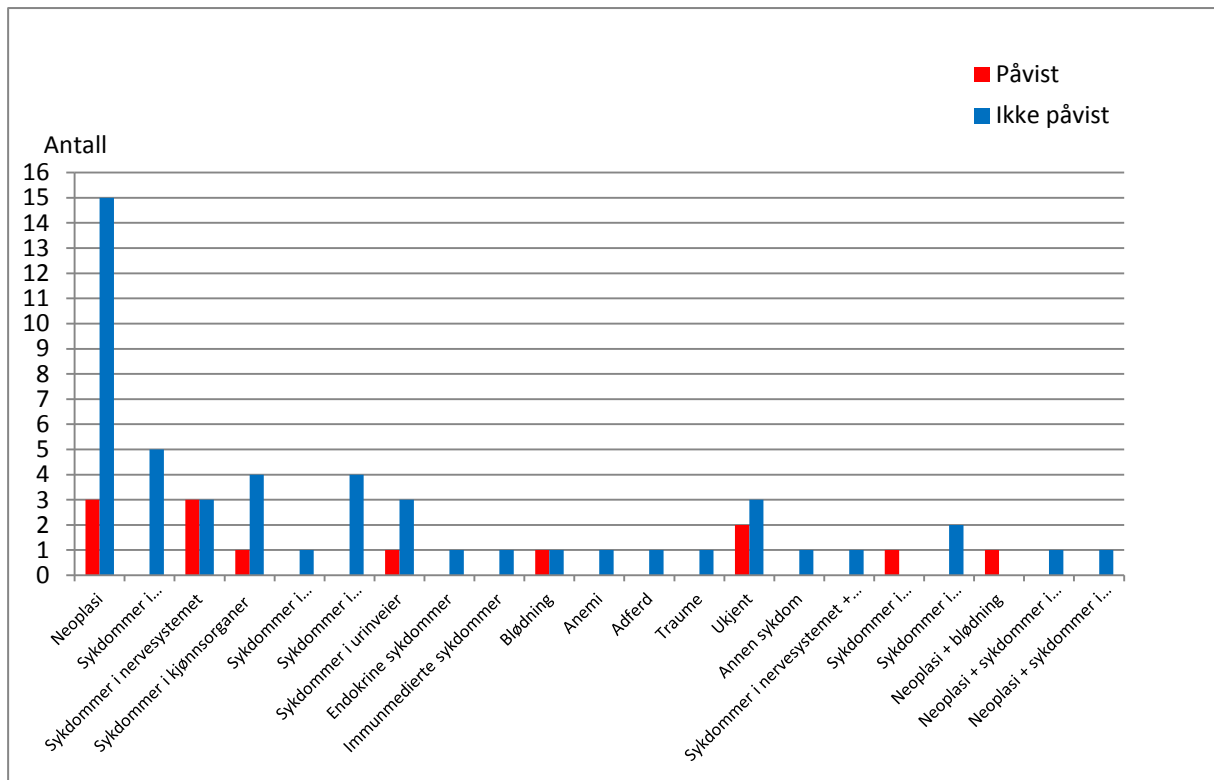
Figur 5, Fordeling mellom kommuner



**Figur 6, Fordeling mellom rasegrupper**



Figur 7, Fordeling mellom sykdomsgrupper





## Vedlegg 7, Tabeller

*Tabell 1, Prevalens og RR for kjønnsfordeling*

Kjønn	Antall	Prevalens	RR
Hann	28	0,14	0,56
Tispe	35	0,26	1.80

*Tabell 2, Data plottet inn for Fisher eksakt test.*

Kjønn	Påvist	Ikke påvist	Total
Hann	4	24	28
Tispe	9	26	35
Total	13	50	63

Fisher eksakt test p verdi to sidet test = 0,353 og er altså ikke signifikant ved  $p < 0,05$ .

**Tabell 3, Prevalens og RR for aldersgrupper.**

Alder i år	Antall	Prevalens	RR
<1	3	0	0
1	1	0	0
2	1	0	0
3	4	0	0
4	5	0,2	0,95
5	3	0	0
6	1	1	5,26
7	4	0,25	1,25
8	10	0,1	0,43
9	8	0,25	1,25
10	8	0,125	0,57
11	7	0,43	2,39
12	2	0	0
13	3	0	0
14	2	1	5,6
15	-	-	-
16	1	1	5,26

**Tabell 4, Prevalens og RR for kommunefordeling.**

Kommunefordeling	Antall	Prevalens	RR
Oslo	28	0,25	1,47
Asker	4	0,25	1,25
Bærum	7	0,28	1,4
Ullensaker	1	1	5,26
Tønsberg	2	0,5	2,5
Røyken	2	0	0
Hurum	3	0	0
Drammen	1	0	0
Ski	2	0	0
Trøgstad	2	0	0
Lardal	1	0	0
Vestby	1	0	0
Nøtterøy	1	0	0
Lunner	1	0	0
Nedre Eiker	1	1	5,26
Lørenskog	1	0	0
Bamble	1	0	0
Nes	1	0	0
Kongsberg	1	0	0
Halden	1	0	0
Gausdal	1	0	0

**Tabell 5, prevalens og RR for rasegrupper.**

Rasegruppe; 1: Bruks-, hyrde og gjeterhunder, 2: Pincher-, schnautzer-, molosser- og sennenhunder, 3: Terrier, 4: Dachs, 5: Spisshunder, 6: Drivende- og sporhunder, 7: Stående fuglehunder, 8: Appporterende hunder, 9: Selskapshunder, 10: Blandningshunder, 11: Ukjent

Rasegruppe	Antall	Prevalens	RR
1	7	0,14	0,67
2	12	0,25	1,25
3	6	0,17	0,81
4	2	1	5,6
5	4	0,5	2,63
6	1	0	0
7	9	0,33	1,83
8	5	0	0
9	10	0,1	0,43
10	6	0,17	0,81
11	1	0	0

**Tabell 6, Prevalens og RR for sykdomsgrupper.**

Sykdomsgruppe; 1: neoplasi, 2: sykdommer i fordøyelsessystemet, 3: sykdommer i nervesystemet, 4: sykdommer i kjønnsorganer, 5: sykdommer i respirasjonssystemet, 6: sykdommer i bevegelsessystemet, 7: sykdommer i urinveier, 8: endokrine sykdommer, 9: immunmedierte sykdommer, 10: blødning, 11: anemi, 12: adferd, 13: traume, 14: ukjent, 15: annen, 16: sykdommer i nervesystemet + blødning, 17: sykdommer i fordøyelsessystemet + blødning, 18: sykdommer i fordøyelsessystemet + sykdommer i urinveier, 19: neoplasi + blødning, 20: neoplasi + sykdommer i urinveiene + sykdommer i fordøyelsessystemet. 21: neoplasi + sykdommer i fordøyelsessystemet.

Sykdomsgrupper	Antall	Prevalens	RR
1	18	0,17	0,77
2	5	0	0
3	6	0,5	2,8
4	5	0,2	0,95
5	1	0	0
6	4	0	0
7	4	0,25	1,25
8	1	0	0
9	1	0	0
10	2	0,33	1,65
11	1	0	0
12	1	0	0
13	1	0	0
14	5	0,4	2,11
15	1	0	0
16	1	0	0
17	1	1	5,26
18	2	0	0
19	1	1	5,26
20	1	0	0
21	1	0	0



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)