

Проучвания върху клиничните признаци и някои хематологични показатели при експериментална субхронична интоксикация с антикоагулантния родентицид бромадиолон при кучета

Иван Вълчев, Цанко Христов, Нели Грозева, Лазарин Лазаров, Румен Бинев, Йордан Николов

Summary: Experiments to investigate the toxic effects of the anticoagulant rodenticide bromadiolone in dogs, orally treated at 0.65 mg/kg (1/20 of canine LD₅₀) via dry food granules for 30 days were carried out. Prior to treatment (days -3 and 0) and at post treatment days 5, 10, 15, 20, 25 and 30, the changes in the clinical status (rectal body temperature, heart and respiratory rates) and some haematological parameters (haemoglobin, erythrocyte counts, thrombocyte counts, ESR, prothrombin and activated partial thromboplastin time) were followed. It was established that the intoxication was accompanied by hypothermia, tachycardia, polypnoe, peritoneal and pleural effusions, erythropenia, oligochromaemia, reduced haematocrit values, shorter ESR and prolonged coagulation times.

Key words: anticoagulants, rodenticides, bromadiolone, brodifacoum, floucumafen, dogs, cats

УВОД

Антикоагулантните родентициди са 4-хидроксикумаринови деривати които се използват за контролиране популацията на гризачите [21]. Открити са през 40-те години на миналия век и от тогава започва проучване на токсичното им действие [15]. Понастоящем те са най-масово използваните родентициди в света [14, 19]. Домашните и дивите животни се отравят след приемане на примамки (първична възможност) или при изядането на отровени гризачи (вторична възможност) [8, 19]. Липсата на неприятна миризма и вкус са условие за приемане с апетит на подходящо приготвени примамки [1, 2, 4]. Според химическата си структура те се подразделят на две групи – първа генерация (warfarin, pindom, coumatetralil и др.) и втора генерация (difenacoum, bromadiolone, brodifacoum, floucumafen и др) [8]. Установено е, че антикоагулантните родентициди от втора генерация са по-силно токсични в сравнение с тези от първа генерация [16]. Хидроксикумариновите родентициди инхибират витамин К епоксид редуктазата в черния дроб и по този начин прекъсват цикъла на витамин К. В резултат на това запасите от витамин К в черния дроб се изчерпват, синтезирането на коагулационните фактори II, VII, IX, и X. спира и като следствие от това настъпват масови кръвоизливи [14, 17, 22]. Антикоагулантните родентициди са токсични за всички гръбначни животни. Отравяния при неприщелни животински видове (птици, кучета, котки, зайци, катерици, прасета и др.), са описани от много автори [9, 18].

От направената литературна справка се установява, че описаните спонтанни случаи на отравяния с антикоагулантни родентициди при домашни и диви животни са предимно с бродифакум. Липсата на пълни клинични, параклинични и ехографски проучвания, относно токсичните ефекти на бромадиолон при кучета ни даде основание да извършим настоящите експериментални изследвания с оглед улесняване диагностиката, терапията и профилактиката на отравянето.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Планираните експериментални изследвания бяха проведени с 6 броя кучета от двата пола (мелези), с живо тегло 17 – 22 kg, на възраст 5 – 7 години. Един месец преди започване на опита животните бяха настанени в помещение с размери 5/4.5/5 м. След копроовоскопски изследвания беше проведено двукратно обезпаразитяване с Cestal plus срещу ендопаразити през 14 дни. Срещу ектопаразити използвахме пудра Tarilan. Животните приемаха антикоагулантния родентицид (бромадиолон) перорално посредством изхранваните гранули ("Cotagro"), при свободен достъп до вода за пиене За всяко куче гранулитите бяха третираны отделно според живото тегло

с 1/20 от LD₅₀ на бромадиолона за този животински вид (0.65 mg/kg м.), съгласно методиката описана от Сенгелевич и кол., 1994 г. [3] за приготвяне на примамки срещу гризачи. Всяко куче получаваще по 330 г гранули на ден. На -3 и 0-ия ден преди началото на опита и след това на 5-ия, 10-ия, 15-ия, 20-ия, 25-ия и 30-ия, ден беше регистриран клиничния статус по отношение на вътрешна телесна температура (°C), честота на пулс на пулс и дишане (min⁻¹), цвят на видимите лигавици, апетит, сетивност, уриниране, дефекиране и др. по рутинните методи на клиничната диагностика. След пункция на v. jugularis или v. cephalica antebrachii беше получавана кръв за изследване на следните хематологични показатели: количеството на хемоглобина (HGB g/l), броя на еритроцитите (RBC T/L), броя на тромбоцитите (PLT G/L), стойностите на хематокрита (HCT %), с автоматичен хемоанализатор (BC, 2800, VET, China); СУЕ (mm/h) с автоматичен анализатор – Humased 40, (Germany). Активираното парциално тромбопластиново време (APTT s), и протромбиновото време (PT s) определихме чрез диагностични тестове (Hemostat TT, Human, Germany) с коагулометър (Amelung-Coagulometer KC 1A). Ехографските изследвания извършихме с ултрасонографски апарат “Chison 600 VET” (China) с конвексен трансдюсер от 5 MHz.

Всички резултати бяха обработени вариационно статистически, чрез компютърна програма “Statistica”. За определяне степента на значимост на получените разлики, спрямо контролните стойности бе използван Anova-test. Статистическата достоверност бе дефинирана като P<0.05.

РЕЗУЛТАТИ ОБСЪЖДАНЕ

1. Клинични изследвания (табл.1). От извършените проучвания върху промените в стойностите на вътрешната телесна температура (В.Т.Т.) бе установено, че при двете последователни изследвания преди началото на опита, тя е във физиологични граници (38.5±0.2°C). След захранване на кучетата с гранули третиран с бромадиолон този показател се понижи на 20-ия ден - 37.6±0.3°C (p<0.01), като най-ниски стойности бяха отчетени на 30-ия ден – 36.3±0.3°C (p<0.01). Хипотермията установена и от други автори [1, 2] се дължи на понижаване на основната обмяна в резултат на анемията [6, 10, 13, 17]. При изследване промените в честотата на пулса се установи, че този клиничен показател преди започване на експеримента е във границите на физиологичната норма (74.9±4.7 min⁻¹). Под влияние на изхранваната с гранулите токсична субстанция пулса се учести на 15-ия ден – 99±7.8 min⁻¹ (p<0.01), достигайки своя максимум на 30-ия ден – 135±9.4 min⁻¹ (p<0.01). Аналогични бяха и промените в честотата на дихателните движения. Достоверна разлика спрямо средната стойност от двете последователни изследвания преди третирането (23.5±2.6 min⁻¹) се получи на 15-ия ден – 37±4.7 min⁻¹ (p<0.01). Максимална стойност бе отчетена на 30-ия ден – 61.5±5.2 min⁻¹ (p<0.01). Освен учесто дишането бе и затруднено (dyspnoe). Установени тахикардия и полипно с диспно са компенсаторни механизми на олигохромемията и еритроцитопенията [1, 6, 11, 20], както и следствие от морфологичните промени в белодробния паренхим (оток и кръвоизливи) [7, 14].

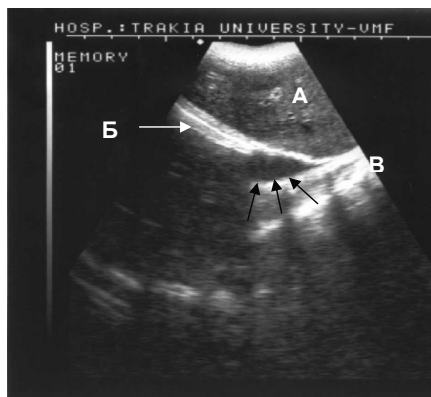
Таблица 1.

Промени в показателите от клиничния статус (вътрешна телесна температура, честота на пулс и дихателните движения) при кучета хранени с гранули, третиран с бромадиолон в доза 1/20 от LD₅₀ (0.65 mg/kg м.); ^bp<0.01.

Показатели	Дни							
	-3	0	5	10	15	20	25	30
В.Т.Т°C	38.7± 0.2	38.4± 0.2	38.2± 0.1	38.5± 0.2	38.2± 0.2	37.6± 0.3 ^b	36.9± 0.1 ^b	36.3± 0.3 ^b
Пулс min ⁻¹	73± 5	76.8± 4.5	72.1± 5.1	78± 6	99.5± 7.8 ^b	113.8± 8.7 ^b	123± 9 ^b	135± 9.4 ^b

Дих.движ. min ⁻¹	25± 2	22± 3.2	24,1± 4.3	23± 2	37± 4.7 ^b	44.5± 5.6 ^b	52.5± 6 ^b	61.5± 5.2 ^b
--------------------------------	----------	------------	--------------	----------	-------------------------	---------------------------	-------------------------	---------------------------

При ехографските изследвания на гръдната и коремна кухини на всички кучета бяха установени аехогенни зони, които са указание за плеврални и перитонеални изливи на кръв (Фиг. 1 и 2).



Фиг. 1. Ехографско изображение (30 - ден) на плеврален излив на кръв при куче хранено с гранули, третирани с бромадиолон в доза 1/20 от LD₅₀ (0.65 mg/kg м.). Трансдюсерът е разположен надлъжно върху вентралната коремна стене и е насочен косо латерелно. Визуализират се черен дроб (А), диафрагма (Б), плеврален излив (стрелки) и гръбначен стълб (В). В зоната на излива, липсва феномена на огледалния образ.



Фиг.2. Ехографско изображение (30 - ден) на перитонеален излив на кръв при куче хранено с гранули, третирани с бромадиолон в доза 1/20 от LD₅₀ (0.65 mg/kg м.). Визуализират се чревни гънки (черни стрелки) и между тях аехогенни зони (бели стрелки), изобразяващи перитонеалния излив.

В развоя на интоксикацията бяха наблюдавани и други клинични признаци като бледи конюктиви при едни от животните, а при други с кръвоизливи по тях и в предната очна камера (хурхета), хемоптизис (изкащяне на кръв), липса на апетит,

сънливост, продължително кръвотечение след пункция на вените с образуване на хематоми. Наблюдаваните от нас и други автори [14, 17] клинични признаци, плеврални и перитонеални изливи на кръв са функционален отговор от нарушения механизъм на кръвосъсирването [5, 22]. При приемането на хидроксикумаринови родентициди клиничните признаци се проявяват след няколко дена, понеже е необходимо време за изчерпване на циркулиращите в кръвта кръвосъсирващи фактори.

2. Хематологични изследвания (табл.2). Количеството на хемоглобина преди опитния период бе средно 172 ± 5.05 g/l. След захранване на животните с гранули обработени с изпитвания антикоагулантен родентицид бе наблюдавано понижаване стойностите му на 15-ия ден – 149.8 ± 5.9 g/l ($p < 0.01$). Максималната стойност на олигохромемията беше на 30-ия ден – 77.1 ± 3.6 G/l ($p < 0.01$). Установено бе намаляване броя на еритроцитите, най-добре изразено на 30-ия ден – 1.65 ± 0.21 G/l ($p < 0.01$). Преди третирането средната стойност на хематокрита беше – $50 \pm 3.9\%$. Под влияние на съдържащия се в гранулите препарат стойностите му намаляват на 15-ия ден – $36.9 \pm 3.2\%$ ($p < 0.01$), достигайки най-ниско ниво на 30-ия ден – $17.5 \pm 2\%$ ($p < 0.01$). Нормохромната анемия (олигохромемията кореспондира с еритропенията) и намаления хематокрит са резултат от многобройните кръвоизливи в различни части на тялото [5, 7, 17]. Промени бяха регистрирани и в броя на тромбоцитите, като най-ниски стойности бяха отчетени на 30-ия ден – 74.2 ± 8 G/L ($p < 0.01$). Описаната и от други автори [7, 10, 17]. тромбоцитопения при кучета отровени с антикоагулантни родентициди е следствие от хеморагичната диатеза и нарушения процес на кръвосъсирване. При измерване скоростта на утаяване на еритроцитите бе установено ускоряване на този показател с максимални стойности на 30-ия ден, съответно за 1^{-ия} h – 26.16 ± 2.31 mm ($p < 0.01$) и 45 ± 3.30 mm ($p < 0.01$) за 2^{-ия} h. Прогресивно задълбочаващата се в хода на интоксикацията еритропения, влияе обратнопропорционално на СУЕ [1]. Средната стойност от двете предшестващи опита измервания на активираното парциално тромбoplastиново време беше – 16.72 ± 0.86 s. Под влияние на съдържащия се в гранулите антикоагулантен родентицид бе регистрирано удължаване на 5-ия ден – 66.9 ± 5.64 s ($p < 0.01$), а на 25-ия и 30-ия ден не се установи съсирване. Подобна закономерност бе наблюдавана и в стойностите на протромбиновото време. Достоверна разлика спрямо изходната стойност (6.82 ± 0.29 s) се получи на 5-ия ден от изхранването на обработените с бромадиолон гранули – 45.76 ± 4.12 s ($p < 0.01$). На 25 – ия и 30-ия ден не бе регистрирано съсирване. Удължаването на коагулационните времена (АРТТ и РТ) [6, 12, 17, 22] се дължи на възпрепятстване на синтезирането на коагулационните фактори (II, VII, IX, и X). в чернодробните клетки [7, 17].

Таблица 2.

Промени в стойностите на някои хематологични показатели (Hb, Eг, Hct, СУЕ, Plt, АРТТ и РТ) при кучета хранени с гранули, третирани с бромадиолон в доза 1/20 от LD₅₀ (0.65 mg/kg м.); ^b $p < 0.01$.

Показатели	Дни							
	-3	0	5	10	15	20	25	30
Hb g/l	169± 5.1	175± 5	178± 5.8	174± 6.2	149.8± 5.9 ^b	129.5± 4.3 ^b	104.5± 3.8 ^b	77.1± 3.6 ^b
Eг T/l	7.44± 0.41	7.65± 0.30	7.35± 0.37	7.59± 0.34	5.11± 0.32 ^b	3.86± 0.30 ^b	2.61± 0.28 ^b	1.65± 0.21 ^b
Hct %	50.6± 4.3	49.4± 3.5	47.9± 4	45.7± 3	36.9± 3.2 ^b	28.7± 2.4 ^b	21.8± 2.2 ^b	17.5± 2 ^b
СУЕ mm/h								
1h	4.5± 0.76	4.4± 0.50	4.8± 0.87	4.6± 0.54	7.5± 0.84 ^b	11± 0.51 ^b	17.5± 1.17 ^b	26.16± 2.31 ^b

2h	7.2± 0.96	7.5± 0.78	8± 0.81	7.6± 0.63	14± 0.96 ^b	22± 2 ^b	32.5± 2.9 ^b	45± 3.30 ^b
Plt G/l	302.2± 12.1	313.2± 11.4	317.4± 10.6	307.6± 9.7	246.4± 8.1 ^b	190± 7.4 ^b	100.4± 9.5 ^b	74.2± 8 ^b
APTT s	16.85± 0.92	16.6± 0.81	66.9± 5.64 ^b	110.8± 6.7 ^b	220.9± 13.12 ^b	482.51± 16 ^b	не се съсирва	не се съсирва
PT s	6.77± 0.27	6.87± 0.31	45.76± 4.12 ^{cb}	116.2± 6.17 ^b	244.5± 11.47 ^b	553.78± 23.19 ^b	не се съсирва	не се съсирва

ИЗВОДИ

1. Бромациолона в доза от 0.65 mg/kg м., (1/20 от оралната LD₅₀ за кучета) приеман вътрешно от кучета, чрез гранулитите в продължение на 30 дни, предизвиква промени в клиничния статус (хипотермия, тахикардия и полипное с диспное). Клиничната картина се допълва от сънливост, бледи конюнктиви или с кръвоизливи по тях и в предната очна камера, хемоптизис, плеврални и перитонеални изливи на кръв, продължително кръвотечение след пункция на вените с образуване на хематоми

2. Наблюдаваните хематологични промени се изразяват в олигохромемия, еритропения, понижен хематокрит, ускорено СУЕ, удължаване на активираното парциално тромбoplastиново и протромбиново време.

3. Удължаването на коагулационните времена (APTT и PT) е от съществено значение за диагностиката на тази интоксикация.

4. Изпитаната доза от препарата предизвиква хеморагична диатеза, резултат от нарушаване механизма на кръвосъсирването.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Лазаров, Л., А. Русенов, Й. Николов. Клинико-експериментални проучвания върху остро отравяне с кумариновия ратицид "Сторм" (Флокумафен) при зайци. *Сборник от Научна конференция "Стара Загора 2000"*, т. 3, 75-78, 2002.

[2] Тодоров, Т. Отравяния с антикоагулантни родентициди при кучета – клинични предизвикателства. *Ветеринарна сбирка*, 9-10, 13-16, 2006.

[3] Сенгалевич, Г., Т. Тонев и А. Николов. Ръководство за приложение на химическите средства в растителната защита. ВСИ, Пловдив, 1994.

[4] Binev, R., P. Petkov, A., Rusenov. Intoxication with anticoagulant rodenticide bromadiolone in a dog – a case report. *Veterinarski Arhiv*, 75, 3, 273-282, 2005.

[5] Blocker, T. L., B. K., Roberts. Acute tracheal obstruction associated with anticoagulant rodenticide intoxication in a dog. *Journal Small Animal Practice*, Dec, 40, 2, 577-80, 1999.

[6] Boatman's, H. J., Johnstone, W D. Black, M. Murphy. Clinical signs, laboratory changes and toxicokinetics of brodifacoum in the horse. *Canadian Journal Veterinary Research*, 55, 1, 21-27, 1991.

[7] DuVall, M., M. Murphy, A. Ray, J. Reagor. Case studies on second-generation anticoagulant rodenticide toxicities in nontarget species. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1, 66-68, 1989.

[8] Eason, C. T., E. C. Murphy, G. R. Wright, E. B. Spurr. Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zealand. *Ecotoxicology*, 11, 1, 35-48, 2002.

[9] Eason, C.T. & E. B. Spurr. Review of the toxicity and impacts of brodifacoum on non-target wildlife in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, 22, 371–379, 1995.

[10] Hansen, N., and C. Beckl. Bilateral hydronephrosis secondary anticoagulant rodenticide intoxication in a dog. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2, 103-107, 2003.

[11] James, S. B., B. L. Raphael, R. A. Cook. Brodifacoum toxicity and treatment in a white-winged wood duck (*Cairina scutulata*). *Journal Zoo Wildlife Medicine*, 29, 3, 324-327, 1998.

[12] Kohn, B., C. Weingart, U. Giger. Haemorrhage in seven cats with suspected anticoagulant rodenticide intoxication. *Journal Feline Medicine Surgery*, 5, 295-304, 2003.

[13] Kruse, J. A., R. W. Carlson. Fatal rodenticide poisoning with brodifacoum. *Annals of Emergency Medicine*, 21, 331-336, 1992..

[14] Mount, M. Diagnosis and therapy of anticoagulant rodenticide intoxicants. *Veterinary Clinics North America Small Animal Practice*, 18, 115-129, 1988.

[15] Osweiler, G. D., T. L. Carson, W. B. Bucc and G. A. Vangelder. Clinical and diagnostic veterinary toxicology, Third edition. Kendall/Hunt, Dubuque, Iowa, 494 pp., 1985.

[16] Parmar, G., H. Bratt, R. Moore & P. L. Batten. Evidence for a common binding site in vivo for the retention of anticoagulants in rat liver. *Human Toxicology*, 6, 431-432, 1987.

[17] Sheafor, S. E., C. G. Couto. Anticoagulant rodenticide toxicity in 21 dogs. *Journal American Animal Hospital Association*, 35, 1, 38-46, 1999..

[18] Shore, R. F., D. S. Jonny, P. Freestone. Exposure of non-target to second generation rodenticides in Britain with particular reference to the polecat *Mustela putorius*. *New Zealand Journal of Ecology*, 23, 2, 1999.

[19] Stone, W. B., J. C. Okoniewski, J. R. Stedelin. Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. *Journal Wildlife Diseases*, 35, 2, 187-193, 1999.

[20] Travis, S. F., M. Warfield, B. H. Greenbaum, M. Molokischer, J. E. Siequal. Spontaneous hemorrhage associated with accidental brodifacoum poisoning in a child. *J. Ped.*, 122, 982-984, 1993.

[21] Watt, B. E., A. T. Proudfoot, S. M. Bradberry, J. A. Vale. Anticoagulant rodenticides *Toxicology Review*, 24, 4, 259-69, 2005.

[22] Woody, B., M. Murphy, A. Ray, R. Green. Coagulopathic effects and therapy of brodifacoum toxicosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 6, 23-28, 1992.

За контакти:

Гл. ас. Иван Вълчев, Катедра "Вътрешни Незаразни Болести",
Ветеринарномедицински факултет, Тракийски Университет, Стара Загора, тел.:042-699530, e-mail:valtchev@abv.bg

Докладът е рецензиран.