



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association  
ISSN: 1309-4769, e-ISSN 2667-8381, 11 (1): 1-12, 2020  
DOI: 10.38137/vetfarmatoksbulleten.704983

## ANTİKOAGÜLAN RODENTİSİTLERE KARŞI DİRENÇ BELİRLEME YÖNTEMLERİ

Zeyno NUHOĞLU<sup>1\*</sup>, Abdurrahman AKSOY<sup>2</sup>

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Samsun  
ORCID<sup>1</sup>: 0000-0002-1080-2926 ORCID<sup>2</sup>: 0000-0001-9486-312X

\*Sorumlu Yazar: Zeyno NUHOĞLU  
E-Posta: nuhogluzeyno@gmail.com

Geliş Tarihi: 17.03.2020  
Kabul Tarihi: 22.04.2020

### ÖZET

Antikoagülan rodentisitlerin yoğun kullanımı sonucu kemirgen popülasyonlarında 5-10 yıl içinde antikoagülanlara karşı direnç gelişebilmektedir. Antikoagülanlara karşı direnç ilk defa 1958 yılında İngiltere’de tespit edilmiştir. Kemirgen popülasyonlarında direncin belirlenmesi, entegre risk yönetiminin önemli bir unsurudur. Kemirgen mücadelesinde, uygulama doğru bir şekilde yapıldığı halde sonuç alınmaması, rodentisit direncinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Antikoagülan rodentisitlere karşı; farmakokinetik, beslenme ve farmakodinamik tabanlı üç tip direnç tanımlanmıştır. Antikoagülan rodentisit direncini belirleme yöntemleri bilimsel metotların gelişmesiyle beraber sürekli yenilenmektedir. Bu yöntemler; beslenme, kan pıhtılaşma testi (Blood Clotting Response Testing, BCRT), vitamin K epoksite redüktaz gen mutasyonunun (Hepatic Vitamin K Epoxide Reductase, VKOR) belirlenmesi ve direnç belirteci genotiplerinin ortaya konulmasıdır. Popülasyonda antikoagülan rodentisitlere karşı direnç tespit edildiğinde, dirençli bireylerin belirlenmesi ve direncin yayılmasını engellemek için doğru bir strateji izlenerek mücadele edilmesi şarttır. Bu derlemede, başarılı bir kemirgen mücadelesi için antikoagülan rodentisitlere karşı gelişen direnç belirleme yöntemleri incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Antikoagülan, Direnç, Direnç belirleme yöntemleri, Rodentisit.

### METHODS OF TESTINGS FOR RESISTANCE TO ANTICOAGULANT RODENTICIDES

#### ABSTRACT

Resistance to anticoagulants may develop in rodent populations for 5-10 years as a result of intensive use of anticoagulant rodenticides. Resistance to anticoagulants have been first detected the UK in 1958. Monitoring the resistance status of rodent populations is a pivotal component of integrated risk management. Failure to get results even though the application is done correctly in rodent control is accepted as an indicator of rodenticide resistance. Failure to get results even though the application is done correctly in rodent control is accepted as an indicator of rodenticide resistance. Three types of resistance have been described against anticoagulant rodenticides based on pharmacokinetics, nutrition and pharmacodynamics. The methods of determining anticoagulant rodenticide resistance are constantly being renewed with the development of scientific methods. These methods are feeding testing, blood clotting response testing (BCRT), hepatic vitamin K epoxide reductase (VKOR) assessment, specific genotypes that are markers of resistance. When the resistance to anticoagulant rodenticides is detected in the population, it is essential to identify resistant individuals and to fight with a correct strategy to prevent the spread of resistance. In this review, resistance determination methods for anticoagulant rodenticides were investigated for a successful rodent control.

**Keywords:** Anticoagulant, Resistance, Resistance testing, Rodenticide.

## GİRİŞ

Antikoagülan rodentisit kullanımı, son yıllarda kemirgen popülasyonlarıyla mücadelede en etkili yöntemlerin başında gelmektedir. Bu maddeler, dünyanın bazı bölgelerinde etkin kemirgen mücadelesi için önerilen tek yöntemdir. Kumarin türevlerinin 1940'ların sonlarından itibaren rodentisitler olarak geliştirilmesi ve piyasaya sunulması, kemirgen kontrolü ve mücadelesinde önemli değişikliklere neden olmuştur. Antikoagülan rodentisitler (AR), kısa sürede akut etkili zehirlerin yerini almıştır. Bunun sebebi; kemirgenlerin bu maddelere yüksek duyarlılığı ve antikoagülanların, K vitamininin tam bir antidotu olarak etkinlik göstermesidir. Antikoagülan rodentisitlerin bu derece etkin ve yaygın kullanımı beraberinde direnç sorununu da getirmektedir. Direnç ilk olarak İngiltere'de uzun süreli varfarin kullanımının ardından tanımlanmış olup, daha sonra dünya genelinde birinci ve ikinci nesil antikoagülanlara karşı da tespit edilmiştir (Bailey ve Eason, 2000). AR kemirgenlerde özellikle; Norveç sıçanı (*Rattus norvegicus*), Çatı sıçanı (*Rattus rattus*) ve fare (*Mus musculus*) türlerinde direnç gelişimine neden olmaktadır. Direnç oluşumu; K vitamininden zengin içerikli yemlerle beslenme, antikoagülan rodentisitlerin sürekli ve etkili dozlarından düşük uygulamalarından kaynaklanmaktadır. Ancak, direnç gelişim nedenleri her zaman kesin olarak ortaya konulamaz. AR direnç belirleme yöntemleri geliştikçe; hedeflenen kemirgen türlerinde direncin hemen hemen her yönü laboratuvarında ve saha çalışmalarında incelenmekte ve bağımsız araştırmacılar tarafından elde edilen sonuçlar yayımlanmaktadır. Kemirgenlerde antikoagülan direnci, kalıtsal veya sonradan kazanılan direnç şeklinde kemirgenlerde gelişebilmekte ve bundan dolayı antikoagülan maddelere karşı önemli bir

etkinlik kaybı oluşturmaktadır (Buckle ve Prescott, 2012; Pelz ve ark., 2005; Pelz ve Prescott, 2015).

Bu derlemenin amacı, antikoagülan rodentisitlerin kullanımına bağlı olarak gelişen direnç mekanizmaları ve bu direncin belirlenmesinde kullanılan güncel yöntemleri ilgili literatürlerle ortaya koymaktır. Ayrıca, bu derleme ile direncin önlenmesinde kullanılan önemli kılavuzlara dikkat çekilmektedir. Bu kılavuzlar, ülkeler bazında antikoagülan rodentisitlere karşı oluşan direncin boyutunun gösterilmesi ve bu rodentisitlere karşı direncin önlenmesinde rehber niteliğindedirler.

## ANTİKOAGÜLAN RODENTİSİT DİRENCİ

İlk kez 1948 yılında O' Connor dikotrol'u (sığırlarda "tatlı yonca hastalığı" ndan sorumlu doğal olarak oluşan bir madde) izole ederek, rodentisit olarak kullanılmasını önermiştir. AR (varfarin ve daha sonra indandion türevleri), 1950'li yılların başlarında diğer akut zehirlerin yerini almıştır (Berny ve ark., 2018). Greaves (1994), antikoagülan rodentisit direncini şu şekilde tanımlamıştır: "Antikoagülan rodentisit direnci, antikoagülanların doğru şekilde uygulandığı koşullarda meydana gelen önemli bir etkinlik kaybıdır. Bu etkinlik kaybı, antikoagülana karşı kalıtsal veya orantılı olarak azalmış bir hassasiyete sahip kemirgen süşunun varlığı nedeniyle şekillenir" (Graves, 1994).

Direncin oluşmasında kemirgenlerin doğal davranış modelleri de önemli bir rol oynamaktadır. Norveç sıçanı (*Rattus norvegicus*) ve Çatı sıçanlarının (*Rattus rattus*) çevrelerindeki yeni ve bilinmeyen maddelere (neofobi) çok şüpheli oldukları iyi bilinmektedir. Sıçanların aksine, ev fareleri neofobi sergilemez. Neofobi, sıçanlarda buldukları ortamdaki yem, yem kutusu ve tuzaklara duyulan korkuyu tanımlar. Sonuç olarak,

sıçanlar yeni bir yemden az miktarda ve ölümcül olmayan bir doz yiyebilirler. Canlı kalan hayvanlar yemden kaçınmayı öğrenirler. Bu durum, aynı zamanda gıdadan kaçınma olarak da bilinmektedir (Berny ve ark., 2018; Bonnefoy ve ark., 2008; Pelz ve ark., 2015; Lund, 1972).

### ANTİKOAGULAN RODENTİSİTLERE KARŞI DİRENÇ MEKANİZMASI

Antikoagülanlar, vitamin K epoksiti indirgeyici (VKOR) ile K vitamin epoksidinin K vitaminine indirgenmesini önleyerek, karaciğer mikrozomlarındaki K vitamini döngüsünü kesintiye uğratırlar. K vitamini, kan pıhtılaşmasında önemli bir rol oynayan çeşitli K vitaminine bağlı koagülasyon faktörlerinin aktivasyonunda önemli bir yardımcı faktördür. Antikoagülanlar VKOR ile birleştiğinde, K vitamini ve koagülasyon faktörlerinin eksikliğine bağlı olarak pıhtılaşma bozukluklarına yol açar. İlerleyen aşamalarda pıhtılaşma bozukluğuna bağlı olarak, kemirgenlerde kanama ve ölüm şekillenir (MacNicol, 1986; Oldenburg ve ark., 2008; Thijssen, 1995).

Birinci nesil antikoagülanların kümülatif etkili olduğu, ölüme neden olmak için tekrar tekrar alınmaları gerektiği bildirilmiştir. 1960'lı yılların başında, birinci nesil antikoagülanların kitlesel kullanımı, birçok bölgedeki sıçan popülasyonunu azaltmakta ve hatta yok etme konusunda büyük bir fırsat olarak değerlendirilmiştir. Birinci nesil antikoagülanlar arasında; varfarin, difasinon, kaumatetralil, kaumafuril, koumaklor, pindon ve klorofasinon bulunur (Bentley, 1972). İskoçya'da dirençli bir suşun ilk tespiti 1958'de yayınlanmış olup, bunu Avrupa, Galler, Danimarka, Hollanda ve Almanya'daki diğer benzer dirençli suşların tespiti izlemiştir (Lund, 1972). Brooks ve Bowerman 1973'te, ABD'de de çeşitli Norveç sıçanlarını test

etmişlerdir. Varfarin ile mücadele edilen sıçan popülasyonları arasında varfarin direncinin yaygın olduğunu göstermişlerdir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) antikoagülan direncinin, kemirgenlerde hızlı tespiti için beslenme testlerine dayanan kılavuzlar yayınlanmıştır (Drummond ve Rennison, 1973). Birinci nesil antikoagülanlar rodentisitlere karşı gelişen direncin üstesinden gelmek için ikinci nesil antikoagülan rodensitler geliştirilmiştir. Bu bileşikler, tek seferde tüketilen miktarla kemirgenlerde öldürücü etki yaratmaktadır ve bu şekilde neofobik kemirgenlerle mücadelede etkili olmaktadır. Ayrıca, ikinci nesil antikoagülanlar birinci nesil antioagulanlarla kıyaslandığında kemirgenlerde daha toksik etkilidir. İkinci nesil antikoagülanlar: bromadiolon, difenakom, brodifakom, flokoumafen ve difetialon'u içerir (Redfern ve Gill, 1980). İkinci nesil antikoagülanların keşfi (Hadler ve Shadbolt, 1975), direnç oluşumunu birkaç yıl boyunca azaltmıştır. Ancak, birinci nesil antikoagülanlara karşı direnç, ikinci nesil bileşiklere çapraz direnci de meydana getirmiş olup, kısa süre içinde bu güçlü bileşiklere karşı, daha az duyarlılığa sahip popülasyonlar ortaya çıkmıştır (Greaves ve ark., 1982). Dünya çapında birçok ülkede, Norveç ve çatı sıçanı, ev fareleri gibi antikoagülana dirençli kemirgenler ortaya çıkmıştır. Varfarin direncinin tespitiyle birlikte kaumatetralil, difenakom ve bromadilon'a karşı da direnç belirlenmiş olup; en yaygın antikoagülan direnci brodifakom'a karşı tespit edilmiştir. Difenakom veya bradifakom gibi yeni nesil antikoagülanlara karşı direnç, birinci nesil bileşiklerdeki kadar yaygın değildir (Berny ve ark., 2018; Buckle ve Eason, 2015).

## K VİTAMİNİ DÖNGÜSÜ

K vitamini ihtiyacı, kemirgenlerde günlük diyet ile karşılanmaktadır. K vitamini, indirgenmiş formunda (K vitamini hidrokinon), glutamat kalıntılarının kalsiyum bağlayıcı g-karboksilglutarat kalıntılarına (Gla) karboksilasyonu için temel bir kofaktördür. Bu adım, aktif kan pıhtılaşma faktörleri II, VII, IX ve X'un üretiminde rol oynayan aktif proteinlerin aktivasyonu için gereklidir. Benzer K vitaminine bağımlı Gla-proteinlerinin kemik metabolizması ile ilgili olanlarda dahil olmak üzere bir dizi başka proteinin düzenlenmesinde de önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Karboksilasyon reaksiyonu sırasında, K vitamini hidrokinonu, VKOR enzimi tarafından hidrokinona indirgenen K 2,3-epoksitine oksitlenir. Bu sisteme K vitamini döngüsü denir. Bu döngü her bir K vitamini molekülünün 10.000 kata kadar geri dönüştürülmesine izin verir. Eksik K karboksilasyonu sonucunda, kan pıhtılaşma mekanizmasında bozukluk ve kanamalar meydana gelmektedir (Buckle ve Smith, 2015).

## BİYOKİMYASAL DİRENÇ

Araştırmalar, antikoagülanların esas hedefi olarak VKOR'u (Vitamin K Epoksit Redüktaz) göstermektedir. Antikoagülanlar VKOR enzimini inhibe eder ve bu şekilde K vitaminine bağlı pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonunu engeller. Antikoagülan direncinin biyokimyasal mekanizması, Norveç sıçanının çeşitli bölgelerdeki soyları/VKORC1 varyantlarında incelenmiştir. Antikoagülanların VKOR'daki amino asit süstitüsyonlarının yapı ve fonksiyonunu değiştirdiği bilinmektedir (Li ve ark., 2010). Embriyonik böbrek hücre hattı HEK293 hücrelerinde yapılan çalışmada, VKORC1 yapılarının rekombinant ekspresyonu, Tyr139'daki mutasyonların varfarine karşı duyarlılığı azalttığı ve

diğer pozisyonlardaki mutasyonların VKOR aktivitesini önemli şekilde azalttığını göstermiştir (Pelz ve ark., 2005; Rost ve ark., 2009). Varfarin ve bromadiolona karşı dirençli ev farelerinin, VKOR'a duyarlılık açısından sıçanların Welsh tipi direncine benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Misenheimer ve ark., 1994).

## DİRENÇ BELİRLEME TESTLERİ

Antikoagülan rodentisitlere karşı oluşan dirençle mücadelenin ön şartı etkili bir direnç belirleme yönteminin seçilmesi ve uygulanmasıdır. Antikoagülan rodentisit direncinin belirlenmesinde, direnç testleri önemli bir rol oynamaktadır. Dirençli kemirgenleri belirlemek için standartlaştırılmış testleri açıklayan ve bu testlerin doğru ve etkili uygulanmasını sağlayan önemli kılavuz ve yayınlar bulunmaktadır. Uygun olmayan belirleme yöntemleri; rodentisit direncinin kontrolünü ve dirence karşı önlemlerin alınmasını zorlaştırmakla birlikte zaman ve para kaybına yol açmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda, ortaya koyulan direnç belirleme yöntemleri: *in vivo* (besleme testi, kan pıhtılaşma tepkisi testi) ve *in vitro* analizleri (VKOR aktivitesi, CYP450 metabolizması ve VKORC1 testi) kapsamaktadır. *İn vivo* analizler, pratikte direnç nedeni ile direncin fenotipi hakkında bilgi verir. *İn vitro* deneyler şimdiki kadar tanımlanmış ve metabolik direnç için rutin olarak kullanılan VKORC1 mutasyonlarını belirlemek amacıyla geliştirilmiştir (Prescott ve ark., 2007; Grandemange ve ark., 2010; Pelz ve ark., 2005).

## 1. ÖLÜMCÜL BESLENME PERİYOT TESTİ

Bu test, WHO (World Health Organization, Dünya Sağlık Örgütü) tarafından geliştirilen ilk antikoagülan rodentisit direnç belirleme testidir (Drummond ve Rennison, 1973). DSÖ tarafından

testte birkaç değişiklik yapıldıktan sonra çeşitli antikoagölan dozları denenerek test 1982'de son halini almıştır. Kemirgenler laboratuvar ortamında % 0.0005 zehirli madde içeren gıdalarla 5 gün (+14 gün gözlem süresi) veya daha uzun süreli beslenme rejimine tabii tutulur. Bu süre sonunda hayatta kalan hayvanlar test edilen antikoagölanlara karşı dirençli kabul edilir. Bu testin doğru uygulanması için yeterli sayıdaki hayvan üzerinde denenmesi gerekir. Testin uygulanabilmesi için hayvanlar kafeslere alınır. Bu durum doğada yaşayan kemirgenlere kıyasla birçok farklılığa neden olmaktadır. Standartlaştırılmış OECD (Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü) protokolleri, bazı tartışmalara neden olan birçok özelliğe sahiptir. Kafese alınan hayvanlar, daha çok yem tüketir ve bu nedenle doğada yaşayan kemirgenlerden çok daha yüksek dozlara maruz kalırlar. Ayrıca, kafese alınan hayvanların hareket yetenekleri sınırlı ve ölümcül kanama olasılığı doğadaki kemirgenlere kıyasla daha yüksektir (Bailey ve Eason, 2000). Direnç durumunun doğru değerlendirilmesi için çok sayıda hayvana gerek duyması ve bu durumun etik açıdan uygun olmaması testin dezavantajlarıdır (Gill ve MacNicol, 1991).

## 2. KAN PIHTILAŞMA TEPKİSİ TESTİ

Kan Pıhtılaşma Tepkisi Testi, Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü (EPPO) tarafından geliştirilmiştir (Martin ve ark., 1979). Bugüne kadar geliştirilen BCR testleri, belirli bir antikoagölan dozunun uygulanmasından 24 veya 96 saat sonra kanın pıhtılaşma aktivitesinin ölçülmesine dayanır. Kan pıhtılaşma aktivitesi, insan varfarin tedavisi için

geliştirilen ve K vitaminine bağlı dört kan pıhtılaşma faktörünün (Faktör II, VII, IX ve X) konsantrasyonlarını tespit eden tromboplastin reaktifleri kullanılarak ölçülür (Pelz ve Prescott, 2015; Berny ve ark.,2018). Mevcut haliyle, BCR iki şekilde yapılabilir. Bunlardan ilki; varfarin (5 mg/kg) gibi bir antioagölan varlığında K vitamini epoksit substratını (1 mg/kg) bir K vitamini kaynağı olarak kullanıp, sıçan kapasitesini belirlemektir. Pıhtılaşma tepkisinin 24 saat sonra belirlenmesi (protrombin zamanı) direnç durumunun iyi bir göstergesidir. Bu testin gözden geçirilmiş bir şekli, yalnızca K vitamini içermeyen düşük dozlu (1 mg/kg) varfarin uygulaması ve 24 saat sonra pıhtılaşma kapasitesinin araştırılmasına dayanır. Bu yaklaşımın son gelişmeleri, çeşitli antikoagölanlar ile birkaç protokolü test eden Gill, McNicol ve Prescott, Buckle'nin çalışmalarına dayanmaktadır (Prescott ve Buckle, 2000).

Test edilen hayvanlarda, belirgin şekilde azaltılmış pıhtılaşma aktivitesine sahip olanlar duyarlı olarak kabul edilirken, daha kısa pıhtılaşma süresi gösterenler dirençli olarak kabul edilir. Bu test yöntemi, diğer yöntemlere kıyasla çok daha hızlı ve test edilen hayvanların çok az acı çekmesine neden olur; bu nedenle testin hayvan refahı açısından uygunluğu yüksektir (Bailey ve Eason, 2000). Tablo 1'de, Norveç sıçanı ve Ev faresinde direnç araştırması için çeşitli antikoagölanların ED<sub>50</sub>'lerinin bir listesi verilmektedir.

İkincisi ise daha az gelişmiştir ve sıçanlarda K vitamin eksikliğinin araştırılmasına dayanmaktadır (Martin ve ark., 1979; Berny, 2011).

**Tablo 1.** AVK (Anti Vitamin K)'ların *R. norvegicus* ve *M. musculus* türlerindeki ED<sub>50</sub> değerleri (Berny ve ark., 2011; Berny, 2018).

Tür (soy)	AVK	Cinsiyet	ED <sub>50</sub> (mg/kg)
<i>R.norvegicus</i> (CD)	Varfarin	Erkek	1.51
		Dişi	2.13
	Difasinon	Erkek	0.86
		Dişi	1.12
	Klorofasinon	Erkek	0.54
		Dişi	0.67
	Kaumatetralil	Erkek	0.36
		Dişi	0.44
	Bromadilon	Erkek	0.47
		Dişi	0.61
	Difenakom	Erkek	0.65
		Dişi	0.79
	Difetialon	Erkek	0.43
		Dişi	0.49
	Flokaumafen	Erkek	0.29
		Dişi	0.34
	Brodifakom	Erkek	0.22
		Dişi	0.23
<i>M.musculus</i> (CD-1)	Bromadilon	Erkek	1.96
		Dişi	1.68
	Difenakom	Erkek	0.85
		Dişi	0.56
	Difetialon	Erkek	0.83
		Dişi	0.83
	Flokaumafen	Erkek	0.51
		Dişi	0.44
Bradifakom	Erkek	0.39	
	Dişi	0.35	

BCR testinin birçok avantajı bulunmaktadır. Test laboratuvarında yapılır ve kemirgenlerin bireysel direnç durumunun hızlı bir şekilde değerlendirilmesini sağlar. Bu testte kullanılan hayvanların öldürülmesi gerekmez. Pıhtılaşma aktivite yüzdesinin (PCA) değerlendirmesinden sonra test edilen hayvanlara etkili bir antidot uygulanır. Bu şekilde test, hem hayvan refahı hem de direncin belirlenmesi açısından oldukça uygulanabilir. Ayrıca, test bireylerin direnç durumlarının, bir dizi farklı bileşiğe karşı sırayla belirlenmesine izin verir. Gözlemlenen herhangi bir direncin genetik temelini bulması daha sonraki üreme çalışmalarında hayvanların kullanılmasına izin verir. BCR, oldukça hassas ve duyarlı bir testtir. Kemirgenlerin antikoagülanlara duyarlılığındaki küçük bireysel farklılıkları tespit etmek için kullanılmaktadır (Berny, 2011; Buckle ve ark., 1994; MacNicol ve Gill, 1993).

### 3. VKOR AKTİVİTESİ

Çok sayıda çalışma duyarlı ve dirençli sıçanlarda VKOR (Vitamin K epoksit redüktaz) için kinetik sabitlerin ve/veya enzim aktivitesinin belirlendiğini bildirmiştir. Karaciğer mikrozomlarında veya herhangi bir enzim sisteminde (Rost ve ark., 2009) olduğu gibi (rekombinant hücrelerde) çeşitli protokoller kullanılabilir (Lasseur ve ark., 2006; Lasseur ve ark., 2007).

Bu test, sınırlı sayıda hayvan üzerinde gerçekleştirilir ve fazla sayıda kemirgenin kafeste tutulmasını gerektirmez. Ayrıca, hayvanların laboratuvar tesislerinde tutulmasına da gerek yoktur. Bu test, enzim aktivitesi ve popülasyonun direnç durumu hakkında çok iyi bir tespit sağlar. Test; hızlı, ucuz ve tüm antikoagülanlar çok kısa bir sürede test edilebilir. VKOR aktivitesinin belirlenmesinde, rutin uygulamalarda Yüksek Performanslı Likit

Kromatografi (HPLC) veya Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) gibi analitik yöntemlere başvurulur. Bu test, sadece birkaç suş dışında (ör: metabolik direnç) başarılı bir direnç belirleme yöntemidir (Lasseur ve ark., 2006). Baert ve ark. (2012) Belçika'nın kuzeyindeki Flanders'te antikoagülan rodentisit direnç dağılımını araştırmıştır. Bölgelerdeki 691 sıçanı 2003'ten 2005'e kadar farklı, pıhtılaşma karşıtı bileşikler olan; varfarin, bromadilon ve difenakom'a karşı kan pıhtılaşma tepkisi testiyle analiz etmişlerdir. Bunlardan 119'unda, antikoagülan direncinden sorumlu olduğundan şüphelenilen VKORC1 genindeki bir mutasyon için de ayrı taranmıştır. Varfarin'e karşı dirençli sıçanlar, Flanders'ın batı ve doğu kısımlarında tespit edilmiştir (Baert ve ark., 2012).

Norveç sıçanlarındaki (*Rattus norvegicus*) VKOR'un en önemli polimorfizmlerinden üçü ile BCR verilerine dayanarak erkek ve dişi sıçanlarda direnç faktörlerini indüklediği kanıtlanmıştır. Ayrıca, duyarlı bazal suşun vücut ağırlığındaki (mg/kg) erkek ve dişiler için ED<sub>50</sub> değerleri de RRAC tarafından finanse edilen ve Dr C Prescott ve Bay D Rymer (İngiltere) ve Dr. A Esther (Julius Kuehn Enstitüsü, Almanya) tarafından yürütülen çalışmaların sonucu verilmiştir (Buckle ve Berny, 2015).

### 4. CYP450 METABOLİZMASI

Norveç sıçanında varfarin CYP metabolizması çalışmaları bildirilmesine rağmen çatı sıçanı ve ev faresinde direncin izlenmesinde kullanılan standart bir yöntem değildir. Bu yöntem, kemirgen türlerinde metabolik direnç için rutin bir izleme aracı olarak ilgili antikoagülanların yanı sıra ilgili CYP450 izoformlarını belirlemek için de daha fazla çalışma yapılması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca,



CYP450 direnç nedeninin daha derinlemesine araştırılması gerekmektedir. VKOR aktivitesinin belirlenmesi gibi *in vitro* bir yaklaşımdır ve üretilen varfarin metabolitlerine bakmak için mikrozom ve analitik cihazlar gerektirir (Ishizuka ve ark., 2007; Sutcliffe ve ark., 1990; Sugano ve ark., 2001).

### 5. VKORC1 GENİ

VKORC1 genine olan *in vitro* yaklaşım Grandemange ve ark. (2010) tarafından önerilmiştir. VKORC1 geninin sekanslanması için bir parça kuyruk, kulak ve kıl kullanılır. Bu yöntem, kemirgenlerin canlı olarak yakalanmasını gerektirmez. Norveç sıçanında, şu ana kadar yapılan çalışmalarda tanımlanmış olan tek nükleotid polimorfizmi (SNP) incelenerek, VKORC1 genine dayalı testlerin güvenilir ve uygun maliyetli araçlardan biri olduğu bildirilmiştir. VKORC1 geni tarafından kodlanan protein, yaygın kullanılan antikoagülanlardan biri olan varfarinin birincil hedefidir; bu nedenle varfarin direncinin belirlenmesinde bu test önemli bir rol oynamaktadır (Rostve ark., 2004). Diğer direnç tespit analizleriyle karşılaştırıldığında, büyük ölçekli örnekler bile hızlı bir şekilde uygulanabilir (Grandemange ve ark., 2010). Rekombinant hücrelerde VKOR aktivite ölçümü ile birleştiğinde, belirli bir mutasyon

tarafından taşınan direnç seviyesinin iyi bir göstergesi olabilir. Çok özel durumlarda, özellikle sadece bir mutasyonun beklendiği veya meydana geldiği bilindiğinde, bu yaklaşım qPCR ve spesifik primerlerin kullanımıyla daha da basitleştirilebilir. Bu durumda, farklı genotipler (homozigot, heterozigot, dirençli ve duyarlı) test edilir ve karakteristik siklus eşik değerleri ( $\Delta C_t$ , yani eşleştirilmiş ve homozigot fareler için eşleşmeyen primer uzaması arasındaki fark ile bu farkın olmaması heterozigot hayvanlar için  $C_t$  değerleri) önemli ölçüde farklı sonuçlar verir. Bu yöntemde sadece çok küçük doku parçaları gereklidir ve bu tekniğin sıçan popülasyonlarının direnç tespitinde oldukça yaygın olarak kullanılabileceği ve toplanması kolay olan dışkı örneklerinde uygulanabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Berny, 2011).

*In vitro* teknikler ayrıca yeni mutasyonları ve VKOR aktivitesi üzerindeki potansiyel etkileri taramak için önemli araçlardır. Rekombinant maya hücreleri, bilinen mutasyonlarla doğrulamadan sonra sıçanlarda bulunan çeşitli mutasyonların potansiyel etkisini araştırmak için başarıyla kullanılmıştır. Bu karakterizasyon çalışmasının sürdürülmesi, saha koşullarında direncin uygun bir şekilde değerlendirilmesi için son derece önemlidir (Hodroge ve ark., 2011).

**Tablo 2.** Antikoagülan Rodentisitlere Karşı Direnç Belirleme Yöntemlerinin Avantaj ve Dezavantajları (Berny ve ark., 2018; Buckle ve Berny, 2015; Buckle ve Prescott, 2012; Pelz ve ark., 2005).

	Avantaj	Dezavantaj
<b>Ölümcül Beslenme Periyot Testi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>En önemli avantajı sınırlandırılan alandaki kemirgenlerde rodentisit performansı (ölüm oranını) belirlemesidir.</li> <li>İkinci nesil antikoagülan etkinlik denemeleri birinci nesil antikoagülanlara göre güçlüdür.</li> <li>Probit analizi için kullanılmaktadır.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Çok fazla sayıda hayvana ihtiyaç duyulmaktadır.</li> <li>Etik açıdan uygun görülmez.</li> <li>Hayvanların kafeslerde uzun süreli hapsedilmesi gerekmektedir.</li> <li>Test sonucu doğadaki kemirgenleri yansıtmamaktadır.</li> <li>Zehirli maddelere ihtiyaç duyulmaktadır.</li> </ul>



Tablo 2.(Devamı)

	Avantaj	Dezavantaj
<b>Kan Pıhtılaşma Tepkisi Testi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Duyarlı, hassas ve hızlı bir testtir.</li> <li>Norveç sıçanı ve ev faresinde yöntemin geliştirilmesi devam etmektedir.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pıhtılaşma süresi, kemirgenlerde bireysel farklılık gösterebilmektedir.</li> <li>Test farklı antikoagulara yanıtta dozdan çok fazla etkilenmektedir.</li> </ul>
<b>VKOR Aktivitesi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hızlı, etkili, güvenilir bir testtir.</li> <li>Sınırlı sayıda hayvana ihtiyaç vardır.</li> <li>Kemirgenlerin kafeste veya laboratuvar ortamında tutulmasını gerektirmez.</li> <li>Direncin belirlenmesinde birey ve popülasyon bazında etkilidir.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Yöntem, pahalı cihazlara ihtiyaç duymaktadır (HPLC, LC-MS/MS).</li> </ul>
<b>CYP450 Metabolizması</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Metabolik direncin belirlenmesinde rutin olarak kullanılmaktadır.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Yöntem, pahalı cihazlara ihtiyaç duymaktadır.</li> <li>Herbir AVK farklı CYP450 izormuyla metabolize olmaktadır.</li> </ul>
<b>VKORC1 geni</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kemirgenlerin kafeste veya laboratuvar ortamında tutulmasını gerektirmez.</li> <li>Çok küçük miktarlardaki doku örnekleri (kuyruk, kulak, kürk) test için yeterlidir.</li> <li>Bugüne kadar keşfedilen yöntemler içinde en etkili ve ucuz olanıdır.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>VKORC1 geninde meydana gelebilecek mutasyonların dikkate alınması gerekmektedir.</li> <li>Yöntem, moleküler genetik alanındaki çalışmalara ihtiyaç duymaktadır.</li> </ul>

Tablo 3. Antikoagülan Rodentisitlere Karşı Direnç Belirleme Yöntemlerinde Türler Arası Farklılıklar (Berny ve ark, 2018; Pelz ve ark., 2005; Pelz ve Prescott, 2015).

	Norveç sıçanı ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Çatı sıçanı ( <i>Rattus rattus</i> )	Ev faresi ( <i>Mus musculus</i> )
<b>Ölümcül Beslenme Periyot Testi</b>	Uygulanıyor Standartlaştırılmış Belirleyici gücü yüksek 21 gün hayatta kalan canlıda uygulanır.	Uygulanıyor Standartlaştırılmış Belirleyici gücü yüksek 21 gün hayatta kalan canlıda uygulanır.	Uygulanıyor Standartlaştırılmış Belirleyici gücü yüksek 21 gün hayatta kalan canlıda uygulanır
<b>Kan Pıhtılaşma Tepkisi Testi</b>	Uygulanıyor Standartlaştırılmış, Belirleyici gücü yüksek <48 saat hayatta kalan canlıda uygulanır. Yeni çalışmalarla yöntem geliştirilmektedir. Bu türde direncin belirlenmesinde son derece önemlidir.	? Yayın bulunmamaktadır.	Uygulanıyor Standartlaştırılmış, Belirleyici gücü yüksek <48 saat hayatta kalan canlıda uygulanır. Yeni çalışmalarla yöntem geliştirilmektedir.

Tablo 3. (Devamı)

	Norveç sıçanı ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Çatı sıçanı ( <i>Rattus rattus</i> )	Ev faresi ( <i>Mus musculus</i> )
<b>VKOR aktivitesi</b>	Uygulanıyor In vitro Tüm AVK lar için Sınırlı sayıda hayvan Hızlı Metabolik direnç için değildir.	Uygulanıyor In vitro Tüm AVK lar için Sınırlı sayıda hayvan Hızlı Metabolik direnç için değildir.	Uygulanıyor In vitro Tüm AVK lar için Sınırlı sayıda hayvan Hızlı Metabolik direnç için değildir.
<b>VKORC1 geni</b>	Uygulanıyor İyi adapte edilmiş Rutinde kullanımı vardır. VKORC1 varyantlarında 139 gen mutasyonu tanımlanmıştır.  Mutasyon/aktivite hakkında bilgi gereklidir. Basit, ucuz, özellikle varfarin direncinin tespitinde kullanılır.	? Sınırlı kanıt var Rutinde kullanımı vardır. Dirençli VKORC1 varyantları; Trp59Arg,Arg58Gly,Tyr13 9Cys  Bu türde daha çok bilgiye ihtiyaç vardır. Varfarin direncinin tespitinde kullanılır.	Uygulanıyor. Sınırlı kanıt vardır. Rutinde kullanımı vardır. Dirençli VKORC1 varyantları; Leu128Ser,Syr139Cys, Arg12Trp,Ala26Ser Bu türde daha çok bilgiye ihtiyaç vardır. ?
<b>CYP450 Metabolizması</b>	Uygulanıyor	Uygulanıyor	Uygulanıyor

## SONUÇ VE ÖNERİLER

AR'ye karşı oluşan direnç kavramı kemirgenlerle mücadelede önemli bir sorundur. Bu soruna yönelik çalışmalar son 50 yıldır sürmektedir. Antikoagülanların yoğun kullanımı sonucu, Norveç ve çatı sıçanı, ev farelerinde dirençli suşlar ortaya çıkmıştır (Buckle ve Berny, 2015). Son yıllarda yapılan çalışmalar dirençle mücadelenin zor olduğunu ve direncin hızla yayıldığını göstermektedir. Bu nedenle, antikoagülan rodentisitlerin akılcı bir direnç yönetim stratejisiyle kullanımı sağlanmalıdır. Etkili aktif maddelerin kullanımı antikoagülan direnç gelişimini ve direncin yayılmasını engellemektedir. Antikoagülan direncinin üstesinden gelmek için; daha etkili ikinci nesil antikoagülanlar geliştirilmiştir. Birinci nesil antikoagülanlara karşı dirençten şüphelenildiğinde, ikinci nesil antikoagülanlar başarıyla kullanılabilir. Özellikle ikinci nesil antikoagülanların toksisitesi ve

birikimi yüksektir; bu nedenle birinci nesil antikoagülanlara karşı oluşan direnç durumlarında kullanılmalılardır. Direnç yönetiminin esas amacı, antikoagülan direncinin gelişmesini önlemek veya geciktirmek ile birlikte antikoagülan etkinliğinin sürekliliğini sağlamaktır. Etkili direnç yönetimiyle antikoagülanlara karşı oluşan direncin tamamen önlenmesi hedeflenmektedir. Direnç yönetimi; etkili, sistematik, verimli ve uygun maliyetli olarak tasarlanmalıdır. Antikoagülanların çevre ve hedef dışı canlılar üzerinde önemli bir etki yarattığının bilincinde olunmalıdır. Özellikle leşle beslenen ve yırtıcı hayvanlar üzerinde antikoagülanların birikimi sonucunda ikincil zehirlenmelerin meydana gelmesi son derece endişe verici bir durumdur (Berny ve ark., 2018; Buckle ve Prescott, 2012; Pelz ve Prescott, 2015).

Antikoagülanların bu hedef dışı canlılar üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak için çalışmalar

yoğunlaştırılmalıdır. Direnç yönetimiyle ilişkili önemli kılavuzlar bulunmaktadır. Direnç yönetimi ile ilgili İngiltere'nin Rodentisit Direnç Eylem Grubu (Rodenticide Resistance Action Group of the UK) tarafından "Committee of CropLife International" (RRAC, 2003; RRAC, 2010; RRAC, 2012) ve Almanya'da yayınlanan Fachausschuss Rodentizidresistenz (FARR, 2013) önemli kılavuzlardır.

### KAYNAKLAR

- Baert K, Stuyck J, Breyne P, Maes D. (2012). Distribution of anticoagulant resistance in the brown rat in Belgium. *Belg J Zool*, 142(1):39-48.
- Bailey CI, Eason CT. (2000). Anticoagulant resistance in rodents, Conservation Advisory Science Notes No. 297, Department of Conservation, Wellington. Citesecr.; 1-8. Erişim: <https://www.doc.govt.nz/globalassets/documents/science-and-technical/casn297.pdf>. Erişim tarihi:11.06.2019.
- Bentley E. (1972). A review of anticoagulant rodenticides in current use. *Bull World Health Organ*, 47(3):275.
- Berny P. Challenges of Anticoagulant Rodenticides: Resistance and Ecotoxicology. In, Margarita Stoytcheva Editor. *Pesticide in the Modern World- Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. InTech; 2011. pp 441-468.
- Berny P, Esther A, Jacob J, Prescott C. Development of Resistance to Anticoagulant Rodenticides in Rodents. In, Brink N, John E, Shore E. Editors. *Anticoagulant Rodenticides and Wildlife*. 5th ed. Oak Ridge, TN, USA. Rattner Springer, 2018. pp 259-286.
- Bonnefoy X, Kampen H, Sweeney K. (2008). Commensal rodents. Public health significance of urban pests. Battersby S, Hirschhorn B (eds). pp 387-419. WHO Regional Office for Europe, Denmark.
- Buckle A, Berny P. RRAC. (2015). Guidelines on anticoagulant rodenticide resistance management. Ed: Rodenticide Resistance Action Committee (RRAC) of CropLife International.
- Buckle A, Prescott C. (2012). The current status of anticoagulant resistance in rats and mice in the UK. A Report to HSE from the Rodenticide Resistance Action Group. Erişim: <https://www.pestmagazine.co.uk/media/244076/rrag-anticoagulant-resistance-in-rats-and-mice-report-to-hse-may-2012.pdf>. Erişim tarihi:11.06.2019.
- Buckle AP, Eason CT. Control Methods: Chemical. In, Pelz H.J, Prescott CV. Editors. *Rodent pests and their control*. 2nd ed. USA, CABI, 2015. pp 123-154.
- Buckle AP, Prescott C, Ward KJ. (1994). Resistance to the first and second generation anticoagulant rodenticides-a new perspective. Proceedings of the Sixteenth Vertebrate Pest Conference. University of Nebraska – Lincoln. Erişim: [http://digitalcommons.unl.edu/vpc16/7/?utm\\_source=digitalcommons.unl.edu%2Fvpc16%2F7&utm\\_medium=PDF&utm\\_campaign=PDFCoverPages](http://digitalcommons.unl.edu/vpc16/7/?utm_source=digitalcommons.unl.edu%2Fvpc16%2F7&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages). Erişim tarihi:11.06.2019.
- Drummond D, Rennison BD. (1973). The detection of rodent resistance to anticoagulants. *Bull World Health Organ*, 48(2):239.
- EPPO (1995) Guideline for the evaluation of resistance to plant protection products testing rodents for resistance to anticoagulant rodenticides. *EPPO Bulletin*, 25, 575-593.
- FARR (2013) Strategie des Fachausschusses Rodentizid Resistenz (FARR) zum Schadnager Management bei Antikoagulanzen-Resistenz. *Berichte aus dem Julius. Kolloquium Rodentizidresistenz, Braunschweig 10. Kühn-Institut, Germany 176;4-9.*
- Gill J, MacNicoll A. (1991). Determination of the susceptibility of wild populations of the Norway rat (*Rattus norvegicus*) to the anticoagulant rodenticide brodifacoum. *Z Angew Zool (Germany, FR)*.
- Grandemange A, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Benoit E, Berny P. (2010). Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. *Pest Manag Sci*, 66(3):270-276.
- Greaves, JH. Resistance to anticoagulant rodenticides. In, Buckle AP, Smith, R. Editors. *Rodent Pests and Their Control*. Wallingford, UK. CAB International, 1994. pp 197-217.
- Greaves J, Shepherd D, Gill J. (1982). An investigation of difenacoum resistance in Norway rat populations in Hampshire. *Ann Appl Biol*, 100(3):581-587.
- Hadler M, Shadbolt R. (1975). Novel 4-hydroxycoumarin anticoagulants active against resistant rats. *Nature*, 253(5489):275.
- Hodroge A, Longin-Sauvageon C, Fourel I. (2011). Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch Biochem Biophys*, 515(1-2):14-20.
- Ishizuka M, Okajima F, Tanikawa T, Min H. (2007). Elevated warfarin metabolism in warfarin-resistant roof rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. *Drug Metab Dispos*, 35(1):62-66.
- Lasseur R, Grandemange A, Longin-Sauvageon C. (2006). Heterogeneity of the coumarin anticoagulant targeted vitamin K epoxide reduction system. Study of kinetic parameters in susceptible and resistant mice (*Mus musculus domesticus*). *J Biochem Mol Toxicol*, 20(5):221-229.
- Lasseur R, Grandemange A, Longin-Sauvageon C. (2007). Comparison of the inhibition effect of different anticoagulants on vitamin K epoxide reductase activity from warfarin-susceptible and resistant rat. *Pestic Biochem Physiol*, 88(2):203-208.

- Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Videmann B. (2006). Warfarin resistance in a French strain of rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 19(6):379-385.
- Li W, Schulman S, Dutton RJ, Boyd D, Beckwith J, Rapoport TA. (2010). Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. *Nature*. 463(7280):507.
- Lund M. (1972). Rodent resistance to the anticoagulant rodenticides, with particular reference to Denmark. *Bull World Health Organ*, 47(5):611.
- MacNicoll A. Resistance to 4-hydroxycoumarin anticoagulants in rodents. In, Glass E. Editor. *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*. Washington DC. National Academy Press, 1986. pp 87-99.
- MacNicoll AD, Gill JE. (1993). Vitamin K3 in feedstuffs: antidotal effects in captive anticoagulant-resistant rats and mice. *J Wildl Manag*, 57(4):835-841.
- Martin A, Steed LC, Redfern R, Gill J, Huson L. (1979). Warfarin-resistance genotype determination in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Lab Anim*, 13(3):209-214.
- Misenheimer TM, Lund M, Baker AEM, Suttie J. (1994). Biochemical basis of warfarin and bromadiolone resistance in the house mouse, *Mus musculus domesticus*. *Biochem Pharmacol*, 47(4):673-678.
- Oldenburg J, Marinova M, Müller-Reible C, Watzka M. (2008). The vitamin K cycle. *Vitam Horm*, 78:35-62.
- Pelz HJ, Prescott CV. Resistance to Anticoagulant Rodenticides In, Buckle AP, Smith RH. Editors. *Rodent pests and their control*. 2nd ed. USA. CABI, 2015. pp 187-208.
- Pelz H, Rost S, Hünerberg M. (2005). The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*, 170: 1839–1847.
- Pelz HJ, Rost S, Hünerberg M, Fregin A, Heiberg A-C, Baert K, MacNicoll AD, Prescott CV, Walker A-S, Oldenburg J. (2005). The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*, 170(4):1839-47.
- Prescott CV, Buckle AP, Hussain I, Endepols S. (2007). A standardised BCR resistance test for all anticoagulant rodenticides. *Int J Pest Manag*, 53(4):265-272.
- Prescott CV, Buckle AP. (2000). Blood-clotting response tests for resistance to diphacinone and chlorofacinone in the Norway Rat (*Rattus norvegicus* Berk.). *Crop Prot*, 19(5):291-296.
- Redfern R, Gill J. (1980). Laboratory evaluation of bromadiolone as a rodenticide for use against warfarin-resistant and non-resistant rats and mice. *Epidemiol Infect*, 84(2):263-268.
- Rost S, Fregin A, Ivaskевичius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz H-J, (2004). Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, 427(6974):537.
- Rost S, Pelz H-J, Menzel S, MacNicoll AD, León V, Oldenburg J. (2009) Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice—a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genet*, 10(1):4.
- RRAC (2003) Anticoagulant Resistance Management Strategy for Pest Management Professionals, Central and Local Government and Other Competent Users of Rodenticides. Technical Monograph, Rodenticide Resistance Action Committee, CropLife International, Brussels, Belgium.
- RRAG (2010) Anticoagulant Resistance in the Norway Rat and Guidelines for the Management of Resistant Rat Infestations in the UK. Rodenticide Resistance Action Group, British Pest Control Association, Derby, UK. Erişim: <https://www.pestmagazine.co.uk/media/246897/management-of-resistant-norway-rat-infestations-in-the-uk-rrag-june-2010.pdf>. Erişim tarihi: 11.06.2019.
- RRAG (2012) House Mouse Resistance Guideline. Rodenticide Resistance Action Group, British Pest Control Association, Derby, UK. Erişim: <https://bpca.org.uk/write/MediaUploads/Documents/Other%20Documents/RRAG-house-mouse-resistance-guidelines-aug-2012.pdf>. Erişim tarihi: 11.06.2019.
- Sugano S, Kobayashi T, Tanikawa T, Kawakami Y, Kojima H. (2001). Suppression of CYP3A2 mRNA expression in the warfarin-resistant roof rat, *Rattus rattus*: possible involvement of cytochrome P450 in the warfarin resistance mechanism. *Xenobiotica*, 31(7):399-407.
- Sutcliffe FA, MacNicoll AD, Gibson GG. (1990). Hepatic microsomal warfarin metabolism in warfarin-resistant and susceptible mouse strains: influence of pretreatment with cytochrome P-450 inducers. *Chem Biol Interact*, 75(2):171-184.
- Thijssen HH. (1995). Warfarin-based rodenticides: mode of action and mechanism of resistance. *Pestic Sci*, 43(1):73-78.