



inbo



Instituut voor
Natuur- en Bosonderzoek

Secundaire intoxicatie bij het gebruik van rodenticiden

Analyse van leverresiduen bij bunzing en steenmarter

*Kristof Baert, Koen Van Den Berge, Ivy Jansen, Jan Gouwy,
Siska Croubels & Jim Casaer*

Auteurs:

Kristof Baert, Koen Van Den Berge, Ivy Jansen, Jan Gouwy, Siska Croubels & Jim Casaer
Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek

Het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO) is het Vlaams onderzoeks- en kenniscentrum voor natuur en het duurzame beheer en gebruik ervan. Het INBO verricht onderzoek en levert kennis aan al wie het beleid voorbereidt, uitvoert of erin geïnteresseerd is.

Vestiging:

INBO Geraardsbergen
Gaverstraat 4, 9500 Geraardsbergen
www.inbo.be

e-mail:

kristof.baert@inbo.be

Wijze van citeren:

Baert K, Van Den Berge K, Jansen I, Gouwy J, Croubels S & Casaer J (2015). Secundaire intoxicatie bij het gebruik van rodenticiden - Analyse van leverresiduen bij bunzing en steenmarter. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2015 (INBO.R.2015.9435187). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

D/2015/3241/233

INBO.R.2015.9435187

ISSN: 1782-9054

Verantwoordelijke uitgever:

Jurgen Tack

Druk:

Managementondersteunende Diensten van de Vlaamse overheid

Foto cover:

foto INBO

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van:

Vlaamse Milieu Maatschappij (VMM), Afdeling Operationeel Waterbeheer

**VLAAMSE
MILIEUMAATSCHAPPIJ**

Secundaire intoxicatie bij het gebruik van rodenticiden

Analyse van leverresiduen bij bunzing en steenmarter

**Kristof Baert, Koen Van Den Berge, Ivy Jansen, Jan
Gouwy, Siska Croubels & Jim Casaer**

Dankwoord/Voorwoord

Graag willen we in de eerste plaats de vele vrijwilligers van het Marternetwerk bedanken voor hun jarenlange inzet. Dankzij deze inzet werden, gespreid over geheel Vlaanderen, vele honderden verkeersslachtoffers onder de carnivore zoogdieren voor nader onderzoek ingezameld, zo ook de bunzings en steenmarters die als steekproefdieren voor dit onderzoek werden geselecteerd. Daarnaast willen we graag Filip Berlengee bedanken voor zijn aanstekelijk enthousiasme op de werkvloer en het nauwgezet uitvoeren van de autopsies van bunzing en steenmarter. Evengoed een woord van dank aan Dirk Vansevenant voor zijn hulp aan de uitgevoerde autopsies en allerhande praktische zaken, Lode De Beck voor het nalezen van een eerdere versie van dit rapport en Jelle Lambrecht voor haar bijdrage in de chromatografische analyse van de anticoagulantia residuen in de leverstalen.

Samenvatting

In België worden jaarlijks ongeveer 600 ton rodenticiden verhandeld (FOD VVVL 2012). Deze worden zowel door particuliere en professionele gebruikers aangewend bij de bestrijding van meerdere soorten knaagdieren als door de verschillende overheden die instaan voor de bestrijding van de bruine rat. Met de ontwikkeling van producten die inwerken op de bloedstolling, de anticoagulantia (AC) rodenticiden, is de bestrijding sinds de jaren 1950 vooral geëvolueerd naar een chemische bestrijding. Deze methode leek aanvankelijk zeer succesvol te zullen worden, maar kende gaandeweg problemen en beperkingen door de ontwikkeling van resistentie bij (vooral) de bruine rat tegen de toen gebruikte eerste generatie AC rodenticiden (o.a. warfarine, coumatetralyl en chloorfacinon). Met de ontwikkeling van de tweede generatie producten (die langer in het lichaam aanwezig blijven en dus toxischer zijn) zoals bromadiolone, difenacoum, brodifacoum, flocoumafen en difethialon werd echter ook duidelijk dat roofdieren en aaseters een verhoogd risico liepen op secundaire intoxicatie.

In deze studie werd bij 150 bunzings en 75 steenmarters de aanwezigheid van residuen van AC in de lever onderzocht. Hierbij werd de aanwezigheid van 8 verschillende AC geanalyseerd. Zowel de steenmarters als de bunzings waren verkeersslachtoffers die via het marternetwerk van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek ingezameld werden tussen 2006 en 2012.

De detectie en kwantificatie van de AC gebeurde aan het laboratorium voor Farmacologie en Toxicologie van de faculteit diergeneeskunde van de Universiteit Gent met behulp van vloeistof chromatografie gecombineerd met heated electrospray ionisatie tandem massaspectrometrie (LC-HESI-MS/MS).

Bij 171 van de 225 dieren werden sporen van AC teruggevonden in de levers. Bij 96 dieren werden waarden van meer dan 0,2 µg/g teruggevonden. Op basis van de gegevens in de literatuur kunnen we aannemen dat vanaf deze concentratie de overlevingskans afneemt en er een verhoogd risico is op sub-lethale effecten en sterfte door de intoxicatie met AC residuen.

Voor dit onderzoek werd uitgegaan van twee onderzoekshypotheses:

- ✓ Hypothese 1: *Er is een verschil in de graad van intoxicatie (som van de teruggevonden leverresiduen) op basis van soort, moment van het jaar, geslacht en leeftijdscategorie*
- ✓ Hypothese 2: *De graad van intoxicatie beïnvloedt de lichaamsconditie*

Er werd geen relatie gevonden tussen de concentratie van de leverresiduen en soort, seizoen, geslacht of leeftijdscategorie. Het best passende statistisch model omvat seizoen, soort en de interactie tussen beide, maar geen effect van geslacht of leeftijd. Dit betekent dat de kans op aanwezigheid van intoxicatie verschilt naargelang de combinatie van seizoen en soort. Voor een subset van adulte mannelijke bunzings, dood gevonden in de lente, werd er geen significante relatie gevonden tussen de mate van intoxicatie en de conditievariabelen (lichaamsconditie in functie ontweid gewicht en lengte, mesenteriaal-, nier- en onderhuids vet) van de ingezamelde dieren.

Aanbevelingen voor beheer en/of beleid

Het minimaliseren van niet gewenste neveneffecten vormt een belangrijk aandachtspunt bij de bestrijding van een ongewenste of overtallige diersoort. In die zin vormen zowel primaire als secundaire intoxicatie van niet-doelsoorten een ongewenst neveneffect bij het gebruik van rodenticiden bij de bestrijding van knaagdieren.

Uit onze studie bleek dat het overgrote deel van een steekproef van bunzingen en steenmarters, hoofdzakelijk ingezameld als verkeersslachtoffers, residuen van AC rodenticiden in hun lever hadden. Op basis van de teruggevonden concentraties, gerefereerd aan de in literatuur vermelde waarden, is de kans reëel dat ongeveer de helft van de dieren daadwerkelijk een verhoogd risico op sub-lethale effecten en sterfte door intoxicatie loopt.

Dergelijke cijfers nopen tot het in vraag stellen van de huidige manier van het bestrijden van knaagdieren c.q. de aanpak van de problemen. We raden aan om de focus bij preventieve maatregelen te leggen. Deze bestaan erin ratten en muizen zowel voedsel als nestplaats maximaal te ontnemen. Precies deze twee basisnoden zijn belangrijke redenen waarom deze commensale knaagdieren de omgeving van de mens opzoeken. Daarnaast kan, als de situatie dit toelaat, overgegaan worden tot mechanische bestrijding. Chemische bestrijding zou dan een laatste redmiddel moeten worden.

Als er toch vergif dient gebruikt te worden, komt het er op aan zoveel mogelijk risicobeperkende maatregelen in te bouwen. Recent werd er een document opgemaakt in opdracht van de Europese Commissie (Berny et al. 2014) waarin maatregelen worden opgesomd om de risico's van rodenticiden voor zowel de mens als zijn huisdieren en de in het wildlevende dieren te beperken.

Bestrijdingsmiddelen die snel en efficiënt werken en die daarom slechts kort dienen gebruikt te worden, zullen de kans op en omvang van de risico's beperken. Bestrijdingsmiddelen die langdurig gebruikt moeten worden om enig effect te hebben zullen de kans op en de omvang van de risico's verhogen.

Berny et al. (2014) geven onder andere volgende richtlijnen weer voor het beperken van secundaire intoxicatie:

- Het te gebruiken rodenticide moet effectief zijn tegen de te bestrijden pestsoort, dit geldt vooral voor huismuizen en resistente bruine ratten.
- Bij twijfel kan men beter zeker spelen, vooral in of nabij regio's waar resistentie werd vastgesteld. Concreet voor Vlaanderen betekent dit dat in de rivierbekkens IJzer, Brugse Polders, Gentse Kanalen, Benedenschelde en Maas Limburg buitenshuis de ratten best bestreden worden met difenacoum. In de andere bekkens is bromadiolone ook nog een optie.
- De gebruiker verzekert er zich van dat het vergif maximaal afgeschermd is voor de meeste niet-doelsoorten, door gebruik te maken van constructies die de toegang voor deze soorten tot het vergif verhinderen of commerciële lokaasdozen.
- De aanwezigheid van ratten kan best in kaart gebracht worden en voldoende lokaasposten worden aangewend zodat alle knaagdieren van de te bestrijden populatie toegang hebben tot het vergif.
- De bestrijdingsduur wordt zoveel mogelijk beperkt in tijd en gecombineerd met voldoende plaats-bezoeken om de bestrijding op te volgen en indien nodig bij te sturen, om dode dieren in te zamelen en te verwijderen, om de hoeveelheid lokaas te verminderen als de bestrijding is bereikt en om zich te verzekeren dat lokazen beschermd blijven tegen niet-doeldieren.
- Eens de bestrijding beëindigd is, worden alle lokazen verwijderd. Eventueel kan de situatie nog opgevolgd worden met blanco lokazen om de mogelijke aanwezigheid van resterende dieren na te gaan.

- Voldoende opleidingen voor professionele bestrijders maar ook voor professionele gebruikers zoals landbouwers worden voorzien.
- Opstellen van een 'best practice' handleiding, en die voor iedereen beschikbaar te stellen.

Daarnaast is het aangewezen ook een onderscheid te maken tussen particuliere en professionele bestrijding, met daaraan gekoppeld een aantal beperkingen in de hoeveelheid en het type gif dat kan aangekocht en gebruikt mag worden. Het gratis uitdelen van vergif door de technische dienst van de gemeentes is daarom niet aangewezen, gezien dit snel tot overmatig of onnodig aanwenden van het gif kan leiden (Van Bol 2012). In plaats daarvan kunnen (lokale) overheden blijvend overgaan tot sensibilisering van de burgers en hen wijzen op alternatieve oplossingen (preventie, mechanische bestrijding) of een correct gebruik van vergif.

Gezien de resultaten van dit verkennend onderzoek en de aanbevelingen voor de Europese Commissie, is het aangewezen de problematiek rond secundaire intoxicatie te blijven monitoren. Zo zou kunnen nagegaan worden of de hoger voorgestelde maatregelen afdoende werken. Hierbij zouden ook bepaalde roofvogels (torenvalk, kerkuil, ...) mee betrokken kunnen worden in het onderzoek, gezien deze nog meer dan bunzing en steenmarter aangewezen zijn op knaagdieren. Daarnaast zouden laboratoriumproeven opgezet kunnen worden om meer inzicht te verwerven in de relatie tussen residuen van rodenticiden in de lever en de overlevingskans voor de specifieke diersoorten. Voor bunzing kunnen fretten een perfect model zijn. Bovendien is er een blijvende noodzaak om de resistentieproblematiek op te volgen om zo goed mogelijk te kunnen reageren op veranderingen in de gekende situatie. En de bestrijding met rodenticiden zo efficiënt mogelijk te laten verlopen.

English abstract

The use of anticoagulant rodenticides (AR) can lead to secondary poisoning in non-target wildlife species like various predators. As in Belgium each year approximately 600 tons of AR are used, we examined the liver of 150 polecats (*Mustela putorius*) and 75 stone martens (*Martes foina*) for the presence of following 8 different AR-residues using a validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-HESI-MS/MS) method: warfarin, coumatetralyl, chlorophacinone, bromadiolone, difenacoum, brodifacoum, flocoumafen and difethialone.

Almost all animals were road kills, collected from 2006 to 2012. About 77% and 81% of the livers of respectively polecat and stone marten contained AR residues. The maximum (median) concentration was 3.813 µg/g (0.133 µg/g) for polecat and 1.370 µg/g (0.213 µg/g) for stone marten, while the maximum number of different AR residues detected simultaneously in one animal was six. 42% of the animals reached the cutoff of 0,2 µg/g from which survival probability starts to decrease and intoxication could be expected. Statistical analysis did not reveal any relationship between the sum of the residue levels and season, species nor age. We did find a significant effect of the interaction between season and species ($p=0.0409$). For a subset of adult male polecats ($n=54$) found dead in spring we analysed their residue level against the fitness of the animal expressed as body-condition (function of eviscerated weight and total length), mesenterial fat (g), kidney- and subcutaneous fat index. None of the observed variation in these condition variables could be explained by changes in residue concentrations. Hence we assume that the condition variables considered here are not altered by secondary poisoning.

Inhoudstafel

Dankwoord/Voorwoord	4
Samenvatting.....	5
Aanbevelingen voor beheer en/of beleid	6
English abstract	8
Lijst van figuren.....	11
Lijst van tabellen	12
1 Aanleiding en situering van het onderzoek.....	13
1.1 Rodenticiden en bestrijding.....	13
1.1.1 Primaire en secundaire intoxicatie	13
1.1.2 Antistollingsmiddelen in relatie tot secundaire intoxicatie.....	13
1.1.3 Residuconcentraties en mogelijke effecten.....	14
1.2 Bunzing en steenmarter	17
2 Onderzoekshypotheses	18
3 Algemene dataverzameling en methoden	19
3.1 Bunzing en Steenmarter.....	19
3.2 Toxicologische analyse	20
4 Dataverkenning	21
4.1 Beschrijvende dataverkenning van de kenmerken van de steekproefdieren.....	21
4.1.1 Aantallen per soort, per leeftijdscategorie en volgens geslacht	21
4.1.2 Conditievariabelen	22
4.1.3 Tijdstip van het jaar van inzameling.....	23
4.1.4 Besluit	23
4.2 Verkenkende analyse van de aanwezigheid van residuen van actieve stoffen ..	24
4.2.1 Testen voor de binaire respons voor aan- of afwezigheid van residuen	24
4.2.2 Geografische spreiding van de gevonden concentraties	24
4.2.3 Aantal dieren met residuen van AC, gevonden residuconcentraties en aantal gevonden residuen van verschillende AC per steekproefdier.....	25
5 Onderzoeksvragen.....	30
5.1 Hypothese 1: Er is een verschil in de graad van intoxicatie op basis van soort, moment van het jaar, geslacht en leeftijdscategorie	30
5.1.1 Materiaal en methoden.....	30
5.1.2 Resultaten	30
5.1.2.1 Concentratie als binaire (0/1) variabele.....	30
5.1.2.2 Concentratie als continue variabele.....	33
5.1.2.2.1 Bunzing en steenmarter	33
5.1.2.2.2 Bunzing.....	35
5.1.3 Conclusie.....	36
5.2 Hypothese 2: De graad van intoxicatie beïnvloedt de lichaamsconditie	36
5.2.1 Materiaal en methode	36
5.2.1.1 Berekenen van de lichaamsconditie	37
5.2.1.2 Analyse van de relatie tussen de residu-concentraties in de lever en de conditievariabelen	38
5.2.2 Resultaten	39
5.2.2.1 Lichaamsconditie	39
5.2.2.1.1 Graad van intoxicatie als < 200 of ≥ 200	39
5.2.2.1.2 Graad van intoxicatie als continue variabele.....	39
5.2.2.2 Mesenteriaal vet.....	40

5.2.2.2.1	Graad van intoxicatie als < 200 of ≥ 200	40
5.2.2.2.2	Graad van intoxicatie als continue variabele.....	41
5.2.2.3	Niervet.....	41
5.2.2.3.1	Onafhankelijkheid.....	41
5.2.2.3.2	Ordinale regressie	41
5.2.2.4	Onderhuids vet	41
5.2.2.4.1	Onafhankelijkheid.....	41
5.2.2.4.2	Ordinale regressie	41
5.2.3	Conclusies	41
6	Algemeen besluit, discussie en betekenis voor het beheer en beleid...	42
6.1	Conclusies	42
6.2	Discussie	43
6.3	Secundaire intoxicatie en de bestrijding van bruine rat in de praktijk	45
Referenties	47

Lijst van figuren

Figuur 1: Herkomst van de bunzingen in de steekproef.....	20
Figuur 2: Herkomst van de steenmarters in de steekproef.	20
Figuur 3: Aantal dieren opgesplitst per soort, leeftijd en geslacht (150 bunzings, 74 steenmarters).....	21
Figuur 4: Aantal dieren per klasse niervet, soort en geslacht (141 bunzings, 69 steenmarters).....	22
Figuur 5: Aantal dieren per klasse onderhuids vet, diersoort en geslacht (146 bunzings, 69 steenmarters).....	22
Figuur 6: Aantal dieren per seizoen, soort en geslacht (150 bunzings, 75 steenmarters).....	23
Figuur 7: Geografische verspreiding van bunzing en steenmarter opgedeeld per kwartiel van de som van de residuen. De aangegeven grenzen zijn die van de provincies in Vlaanderen.	25
Figuur 8: Aantal dieren met residuen opgedeeld in klassen om de 200 ng/g (blauwe staven), dieren zonder residuen weergegeven als groene staaf.....	25
Figuur 9: Spreiding van de som van de residuen per diersoort. De residuen zijn uitgedrukt in ng/g.	26
Figuur 10: Spreiding van de som van de residuen per geslacht. De residuen zijn uitgedrukt in ng/g.	26
Figuur 11: Residuconcentratie (ng/g) per soort, leeftijd en geslacht.	27
Figuur 12: Residuconcentratie (ng/g) per seizoen, diersoort, leeftijd en geslacht.	27
Figuur 13: Aantal (0 – 6) verschillende AC die bij een bepaald percentage van de onderzochte bunzingsen (n=150) en onderzochte steenmarters (n=75) werden teruggevonden.....	28
Figuur 14: Percentage van de onderzochte bunzingsen (n = 150) en onderzochte steenmarters (n = 75) waarbij de respectievelijke AC werden teruggevonden.	28
Figuur 15: De flowchart geeft alle mogelijke modellen weer met seizoen, geslacht en soort (= dier in de figuur) als verklarende variabelen, inclusief alle interacties tussen deze 3 variabelen.	30
Figuur 16: Voorspelde kans op intoxicatie met betrouwbaarheidsintervallen per combinatie van soort en seizoen, gebaseerd op model 4b.	32
Figuur 17: Verdeling van som van de residuen (in ng/g).	33
Figuur 18: De verdeling van de vierde machtswortel van de som van de residuen.....	33
Figuur 19: Gemiddelde graad van intoxicatie (in ng/g) met betrouwbaarheidsintervallen per combinatie van soort en seizoen, gebaseerd op model 4b.....	35
Figuur 20: Aantal mannelijke bunzingsen met residuen opgedeeld in klasse per 200 ng/g (blauwe staven), dieren zonder residuen weergegeven als groene staaf.	37
Figuur 21: Niet-lineair verband tussen lengte en gewicht. De functie $Y=0.366X^{2.157}$ gebruikten we om de lichaamsconditie van de dieren te berekenen.....	37
Figuur 22: Boxplots van de bodyconditie voor mannelijke bunzingsen met residu levels minder dan 200ng/g (0) en meer dan of gelijk aan 200ng/g (1).....	39
Figuur 23: Verband tussen lichaamsconditie (BC) en residuconcentratie (ng/g)	39
Figuur 24: Boxplots van mesenteriaal vet voor mannelijke bunzingsen met residu levels met minder dan 200ng/g (0) en meer dan of gelijk aan 200ng/g (1).....	40

Figuur 25: Verband mesenteriaal vet en residuconcentratie.....	41
--	----

Lijst van tabellen

Tabel 1: Leeftijdsverdeling per soort	21
Tabel 2: Aan(1)- of afwezigheid(0) van residuen bij bunzing per geslacht, leeftijd en seizoen. .	24
Tabel 3: Aan(1)- of afwezigheid(0) van residuen bij steenmarter per geslacht, leeftijd en seizoen.	24
Tabel 4: Score van niervet- en onderhuids vet-index bij bunzing en steenmarter opgedeeld volgens aan(1)- of afwezigheid(0) van residuen.	24
Tabel 5: Vrijheidsgraden (df) en de relatieve kwaliteit (AIC) van de verschillende statistische modellen (concentratie als binaire variabele).	31
Tabel 6: Sequentiële Anova-tabel voor model 4b (concentratie binair)	32
Tabel 7: Vrijheidsgraden (df) en de relatieve kwaliteit (AIC) van de verschillende statistische modellen (concentratie als continue variabele).	34
Tabel 8: Sequentiële Anova-tabel voor model 4b (4e machtswortel van de concentratie continue variabele).	34
Tabel 9: Vrijheidsgraden (df) en de relatieve kwaliteit (AIC) van de verschillende statistische modellen met enkel bunzing (concentratie als binaire respons)	35
Tabel 10: Vrijheidsgraden (df) en de relatieve kwaliteit (AIC) van de verschillende statistische modellen met enkel bunzing (concentratie als continue respons)	35

1 Aanleiding en situering van het onderzoek

1.1 Rodenticiden en bestrijding

1.1.1 Primaire en secundaire intoxicatie

Bij het gebruik van vergif voor het bestrijden van een bepaalde soort bestaat steeds de mogelijkheid dat ook niet-doelsoorten dit vergif opnemen. Deze vorm van intoxicatie waarbij giftig lokaas wordt opgenomen door ofwel de te bestrijden diersoort of de niet-doelsoorten beschouwen we als primaire intoxicatie. Primaire intoxicatie van de doelsoort zoals bijvoorbeeld ratten en huismuizen is wat men nastreeft in een bestrijdingssituatie. Primaire intoxicatie van niet-doelsoorten is echter ongewenst en het risico daarop dient zo klein mogelijk worden gehouden. Dit wordt onder andere gerealiseerd door het vergif afgeschermd te gebruiken en de bestrijding in de tijd te beperken.

Daarnaast bestaat een risico op secundaire intoxicatie wanneer een predator of aaseter een dier vangt en/of opeet dat zelf vergif heeft opgenomen en waarbij er nog residuen van dit vergif aanwezig waren in het prooidier.

Uit eigen (Stuyck et al. 2003) en buitenlands onderzoek (Brakes & Smith 2005, Geduhn et al. 2014) weten we dat in het geval van rattenbestrijding ook verschillende in het wild levende muizen en heel vaak ook slakken het lokaas opnemen. Dit betekent dat niet alleen de doelsoort, in dit geval bruine ratten, maar ook muizen en eventueel slakken aanleiding kunnen geven tot secundaire intoxicatie. Secundaire intoxicatie is beschreven bij vogels en dan vooral bij roofvogels (Newton et al. 1999, Rattner et al. 2015) en ook bij zoogdieren zoals wilde carnivoren (Berny et al. 1997, Elemeros et al. 2011), echter ook bij egels en spitsmuizen (Dowding et al. 2010, Geduhn et al. 2014). Secundaire intoxicatie kan aanleiding geven tot sterfte (Berny et al. 1997), maar ook sub-lethale effecten kunnen een rol spelen in de fitness van individuele dieren (Lemus et al. 2011).

1.1.2 Antistollingsmiddelen in relatie tot secundaire intoxicatie

Ratten en muizen worden bestreden met vergif op basis van antistollingsmiddelen of anticoagulantia (AC). Door de opstapeling van AC in het lichaam of bio-accumulatie vormen ze een verhoogd risico voor wilde predators en staat het gebruik van deze middelen ter discussie (Berny et al. 2014).

AC zijn traag werkende giften op basis van coumarine of indandionen die inwerken op de bloedstolling doordat ze de activatie van stollingsfactoren verhinderen. Ongeveer vier tot zes dagen na de opname van rodenticiden en na afbraak van de reeds aanwezige stollingsfactoren sterft het dier aan spontaan optredende diffuse bloedingen. Binnen de groep van AC is er een onderscheid tussen zogenaamde 'eerste' en 'tweede' generatie producten (Baert et al. 2012a). De eerste en tweede generatie AC die deel uitmaakten van onze studie zijn respectievelijk warfarine, coumatetralyl en chloorfacinon; en bromadiolone, difenacoum, brodifacoum, flocoumafen en difethialon. Eerste generatie AC vereisen een herhaalde opname voordat ze effectief zijn. Tweede generatie AC kennen een langere werking door een verhoogde lipofiliteit en verlengde eliminatiehalfwaardetijd¹, waardoor een eenmalige opname kan volstaan (Kerins et al. 2001). Kenmerkend voor AC is dat de eliminatie uit het lichaam in twee fases verloopt. Eerst is er een eliminatie uit het plasma, die vrij vlug verloopt; in een tweede fase treedt eliminatie uit de lever op, het orgaan bij uitstek voor de opslag van AC, die veel trager verloopt (Vandenbroucke et al. 2008a). Vandenbroucke et al. (2008a) rapporteerden eliminatiehalfwaardetijden in de lever die varieerden van 15,8 dagen voor coumatetralyl tot 307 dagen voor brodifacoum na éénmalige orale blootstelling

¹ Eliminatiehalfwaardetijd is de tijd die nodig is om een product met de helft te elimineren uit het lichaam

van muizen. Behalve in de lever zien we ook nog een beperkte opstapeling in de nieren en andere organen (Huckle et al. 1988).

De best gekende gevolgen van een intoxicatie met deze rodenticiden zijn de effecten op de bloedstolling. Sub-lethale dosissen zullen aanleiding geven tot een verlengde bloedstollingstijd, een effect waar mensen dagelijks gebruik van maken als ze bloedverdunners dienen te nemen voor medische indicaties. Lethale dosissen veroorzaken bij ratten sterfte door verbloeding na gemiddeld vier tot zes dagen - een periode die men binnen de toxicologie nog steeds als acute sterfte beschouwd. Zeer hoge dosissen kunnen leiden tot hyper-acute sterfte door directe bloedvatwand beschadiging (persoonlijke mededeling prof. P. De Backer). Na opname van rodenticiden zien we ook schade op cellulair niveau in de lever en nieren (Kumar & Saxena 1993, Revathi & Yogananda 2006). Rodenticiden werken in op het vitamine K metabolisme. Vitamine K speelt een belangrijke rol bij de carboxylering van gamma-carboxyl eiwitten. Het merendeel van deze eiwitten zijn gerelateerd aan de bloedstolling, echter sommige eiwitten spelen ook een rol in de botvorming, bloedvatontwikkeling en celdeling (Cranenburg et al. 2007, Tie et al. 2011). Een tekort van vitamine K kan dan leiden tot stollingsstoornissen, osteoporose en/of aderverkalking (Jacob et al. 2011).

AC als rodenticiden kunnen om volgende redenen aanleiding geven tot secundaire intoxicatie bij kleine en middelgrote wilde carnivoren.

- 1) Knaagdieren vormen een belangrijk aandeel in het dieet van wilde carnivoren (Roger et al. 1988, Libois & Waechter 1991).
- 2) Door de relatief trage werking, blijven knaagdieren na opname van AC gedurende een langere tijd als geïntoxiceerd prooidier in de omgeving aanwezig. Het kan daarbij zowel om pas opgenomen lokaas gaan dat zich nog in de maag-darmtractus bevindt, als om AC reeds opgeslagen in het lichaam, en dan vooral in de lever.
- 3) Na opname van AC worden knaagdieren uiteindelijk minder vitaal en vormen ze dus een gemakkelijker prooi (Littin et al. 2000). Bovendien leidt de opname van AC tot enkele gedragsveranderingen waardoor de dieren zich minder schuil houden, zich minder langs landschapselementen verplaatsen door het verlies van thigmotaxie² en hun dag- en nachtritme verstoord is (Cox & Smith 1992).
- 4) Door resistentie tegen AC bij de bruine rat worden meer en meer tweede generatie producten gebruikt die toxischer zijn en langer in het lichaam aanwezig blijven. Bovendien kunnen resistente ratten na opname van vergif langer als prooidier met residuen aanwezig blijven in de omgeving (Atterbey et al. 2005, Vein et al. 2013).

1.1.3 Residuconcentraties en mogelijke effecten

Commerciële lokazen hebben over het algemeen een concentratie van 50 mg/kg actieve stof. Direct nadat knaagdieren rodenticiden hebben gegeten leidt vooral de maagdarminhoud tot risico op secundaire intoxicatie. Na 24 uur vinden we daar echter nog weinig actieve stoffen in terug (Poché 1988), vanaf dan zien we vooral een opstapeling in de organen. 24 tot 72 uur na opname vinden we de hoogste concentratie respectievelijk in de lever en het plasma terug (Mosterd & Thyssen 1991).

In een studie met difenacoum van Atterby et al. (2005) varieerde de AC residuen verspreid over het hele lichaam in concentratie van 0,52 tot 0,74 µg/g. Poché (1988) vond gelijkaardige resultaten na opnametesten met bromadiolone bij de bruine rat na 24 uur, 2,08 µg/g en vervolgens twee tot drie dagen later respectievelijk 0,7 µg/g en 0,6 µg/g. Bij een veldstudie naar het intensief gebruik van bromadiolone lokazen voor de bestrijding van woelratten in Frankrijk vonden Giradoux et al. (2006) een gemiddelde concentratie van 1,22 µg/g. Goldade et al. 2001 vonden na 3 dagen opname van difethialon lokaas met een

² Thigmotaxie: beweging, of vaak juist rust, uitgelokt door (gebrek aan) aanraking

concentratie van 25 mg/kg bij laboratten een gemiddelde concentratie van 2,0 µg/g (0,77-2,67 µg/g, SD³ = 0,51 µg/g) terug.

In de lever zien we echter dat deze concentraties beduidend hoger liggen. Zo vonden Vein et al. (2013) bij verschillende stammen bruine rat mediane concentraties van 15 tot 19 µg/g chloorfacinon met een maximum van 24,9 µg/g. Fisher (2009) kwam tot een gemiddelde concentratie brodifacoum van 10,7 µg/g (6,7-17,0 µg/g). Ze berekende dat een lever van een bruine rat (gemiddeld 10 g) met een concentratie van 17 µg/g brodifacoum kan leiden tot de intoxicatie van een roofdier, met dezelfde gevoeligheid aan brodifacoum als een rat (LD50⁴ 0,27 mg/kg), van 600g. Howald et al. (1999) vonden tijdens een verdelgingsactie van bruine rat met brodifacoum op Langara eiland, Canada echter concentraties van 24,8 tot 35,3 µg/g in de rattenlevers: concentraties die in de buurt komen van de concentraties van de gebruikte lokazen zelf.

Voor ons ecologisch onderzoek van de bruine rat waarbij het terrein gebruik en de bestrijding met rodenticiden langs een waterloop werd opgevolgd, controleerden we toen ook van een dertigtal dood gevonden ratten de concentratie van rodenticiden in de lever. De som van de teruggevonden rodenticiden in de lever varieerde toen van 0,262 tot 13,824 µg/g (niet gepubliceerde resultaten). De rat met de laagste residuconcentratie vertoonde inwendige bloedingen, indicatief voor sterfte door een rodenticiden intoxicatie. Dit bevestigt dat dieren ook bij relatief lage concentraties vergif in de lever kunnen sterven aan een rodenticiden intoxicatie maar eveneens dat ratten een hoge opname van rodenticiden kunnen realiseren voordat ze eraan sterven.

De opstapeling van AC in de lever vormt een verhoogd risico op mogelijke secundaire intoxicatie van kleine carnivoren gezien deze vaak de lever als eerste opeten en pas nadien de rest van het karkas. De maag-darmtractus wordt door de kleine soorten vaak gemeden en niet opgegeten (Giraudoux et al. 2006).

In de literatuur worden verschillende drempelwaarden aangehaald waarboven leverresidu's aanleiding geven tot intoxicatie. Deze waarden variëren van 0,2 µg/g (Grolleau et al. 1989, Berny 1997, Elmeros et al. 2011), 0,5 µg/g (Dowding et al. 1999) tot 0,7 µg/g (Kaukeinen et al. 2000, Erickson & Urban 2004). Myllymäki et al. (1999) schatten modelmatig in dat de overlevingskans van woelmuizen afneemt vanaf een concentratie van 0,2 µg/g in de lever. Grolleau et al. (1989) baseerden deze drempelwaarde op de concentratie die ze terugvonden bij een hermelijn die gestorven was aan een geïnduceerde secundaire intoxicatie met bromadiolone-geïntoxiceerde woelmuizen. Het dier had een leverconcentratie van 0,23 µg/g bromadiolone. Berny (1997) daarentegen baseerde zich op zijn jarenlange ervaring met autopsies op wilde dieren en de daaraan gekoppelde analyses op leverresidu's van AC. Gezien hij bij concentraties lager dan 0,2 µg/g nooit bloedingen had teruggevonden, veronderstelde hij dat dit de grens is waarboven residu's aanleiding kunnen geven tot intoxicatie. Ook Littin et al. (2000) rapporteerden bij een opnametest van brodifacoum bij voskoesoes (*Trichosurus vulpecula*) een range van leverresidu's van 0,17 tot 1,04 µg/g na een gemiddelde opname van 0,88 mg/kg lichaamsgewicht (0,50 – 1,07 mg/kg). Kaukeinen et al. (2000) baseerden hun 0,7 µg/g grens onder meer op het werk van Huckle et al. (1988, 1989) die aantoonde dat bepaalde leverconcentraties geen aanleiding gaven tot stollingsstoornissen en/of de dood. Volgens deze auteurs dient er eerst een bepaalde saturatie van de lever bereikt te worden voordat er zich symptomen van intoxicatie voordoen. Zo vonden zij bij ratten die een eenmalige sub-lethale dosis flocoumafen kregen van 0,14 mg/kg een gemiddelde concentratie van 1,2 µg/g terug in de lever. Bij een gelijkaardige studie maar met herhaalde dosissen van 0,02 mg/kg en 0,1 mg/kg met een interval van 2 weken liep dit zelfs op tot respectievelijk 2,1 µg/g en 2,69 µg/g. Bij de hogere dosis stierven de ratten na 60 tot 70 dagen met een concentratie van 3,5 tot 5,1 µg/g in de

³ SD: standaarddeviatie

⁴ LD50: de dosis waarbij de helft van de geteste dieren/populatie zal sterven binnen een relatief korte tijdsspanne

lever. Ook Parmar & Batten (1987) vonden in vitro dat de werking van vitamine K epoxide reductase, het enzym dat instaat voor recyclage van vitamine K in de lever en dus van belang is voor de handhaving van de bloedstolling, pas verhinderd wordt bij een concentratie hoger dan de dosis die leidt tot een volledige saturatie van de bindingsplaats in de lever. Zij concludeerden dat leverresiduen hierdoor weinig effect hebben op de bloedstolling.

Mosterd en Thijssen (1991) vonden na toediening van 0,2 mg/kg brodifacoum aan ratten na 1 dag een leverconcentratie van 0,791 µg/g. Deze concentratie bleek, door de lange halfwaardetijd van brodifacoum, na 1 maand slechts gezakt te zijn tot 0,623 µg/g – en dit terwijl de bloedstolling op zich reeds na 1 week terug volledig genormaliseerd was. In tegenstelling tot de bevindingen van Parmar & Batten (1987) bleef de vitamine K epoxide reductase activiteit daarbij echter minstens nog een maand geïnhibeerd, met daaraan gekoppeld een opstapeling van vitamine K-epoxide in de lever. Verder bleek ook dat na toediening van een kleine hoeveelheid warfarine (0,1 mg/kg), de bloedstolling meer verstoord was bij de ratten die 25 dagen eerder brodifacoum hadden gekregen dan bij ratten van de controle groep. Dit toont aan dat eerder contact met rodenticiden een nadelig effect kan hebben bij een nieuwe blootstelling.

Een belangrijk aspect inzake de toxicologie van AC rodenticiden ligt in het gegeven dat de lethale dosis daalt bij herhaalde opnames: het effect neemt toe terwijl de achtereenvolgend toegediende dosissen afnemen. Zo zien we dat voor bromadiolone bij de hond de LD50 10 mg/kg bedraagt en dat de LD50 na vijf opeenvolgende dagen van blootstelling daalt tot 500 µg/kg/dag of in totaal een vierde van de eenmalige dosis. De laagst toxische dosis bedraagt nog slechts 150 µg/kg/dag (Giraudoux et al. 2006, Sage et al. 2008).

De leverconcentraties na toediening van 0,06 mg/kg brodifacoum en difethialon bij ratten op dag 0, 7, 14, en 21 geeft op dag 22 een maximale leverconcentratie van respectievelijk 2,01±0,15 en 1,28±0,15 µg/g. Zes maanden later was dit nog 0,87±0,16 en 0,29±0,08 µg/g (Erickson & Urban 2004). Kamil (1987) testte ratten met bromadiolone met 0,8 en 3mg/kg, wat resulteerde in een leverconcentratie van respectievelijk 1,08 en 1,60 µg/g. Gezien de korte duur van de test leverde dit echter geen gegevens op over de relatie leverresidu en eventuele symptomen van intoxicatie.

Alterio (1996) vond, bij een bestrijdingscampagne van konijnen langsheen de Nieuw-Zeelandse kust, in verwilderde fretten (=gedomesticeerde bunzing), gestorven kort na aanvang van de bestrijding met brodifacoum, residuen in de lever variërend van 1,47 tot 1,97 µg/g (gemiddeld 1,74 µg/g). Fretten in een aanpalend gebied waar geen bestrijding werd uitgevoerd en die 12 tot 16 weken nadien werden gevangen hadden concentraties van <0,2 tot 0,34 µg/g (gemiddeld 0,13 µg/g). Fournier-Chambrillon et al. (2004) vonden bij twee bunzings met duidelijke intoxicatie-symptomen waarden van 0,6 en 2,6 µg/g lever terug.

Het is duidelijk dat er behoorlijk wat variatie zit op de concentratie van residuen in de lever en de mogelijke gevolgen, gaande van geen effect tot sub-lethale effecten en sterfte. Daarom is de zienswijze van Myllymäki et al. (1999) waarschijnlijk de meest aangewezen manier om de risico's van AC leverresiduen in te schatten. Beter dan een vaste drempelwaarde te hanteren met betrekking tot wel of geen effect, kunnen we stellen dat het risico op verlies van fitness en sterfte toeneemt vanaf een concentratie van 0,2 µg/g. In dit rapport en bij de analyses van onze resultaten hanteerden we dan ook deze grens om mogelijke verschillen aan te tonen.

1.2 Bunzing en steenmarter

Dit onderzoek spitte zich toe op mogelijke secundaire intoxicatie van bunzing en steenmarter.

De bunzing (*Mustela putorius*) en de steenmarter (*Martes foina*) zijn twee inheemse marterachtigen die actueel nagenoeg in geheel Vlaanderen voorkomen. De populatieontwikkeling van beide soorten kende de laatste jaren evenwel een opmerkelijk verschillende trend. De bunzing was tot de laatste eeuwwisseling overal in Vlaanderen aanwezig, maar kende sindsdien een sterke terugloop (Van Den Berge & Gouwy 2012a). Actueel is de bunzing, met een recentelijke achteruitgang van minstens 25%, volgens de Rode Lijst een 'kwetsbare' soort geworden (Maes et al. 2014), en is de aan de Europese Unie gerapporteerde 'staat van instandhouding' in het kader van de Habitatrictlijn 'zeer ongunstig, verder achteruitgaand' (Louette et al. 2013). De steenmarter daarentegen was in zijn verspreiding decennialang beperkt tot een klein areaal in oostelijk Vlaams-Brabant en het zuiden van Limburg, maar realiseerde sinds de eeuwwisseling een succesvolle rekolonisatie (Van Den Berge et al. 2012). Volgens de Rode Lijst (Maes et al. 2014) is de soort 'momenteel niet in gevaar'.

De populatiestructuur van bunzing en steenmarter komt tot stand via een sociale organisatie gebaseerd op strikte territorialiteit, zoals kenmerkend is voor veel middelgrote roofdieren. Deze territorialiteit is onder meer gekoppeld aan een duurzame voedselbeschikbaarheid en resulteert in grote individuele leefgebieden en een van nature lage dichtheid (Van Den Berge & Gouwy 2012b).

De oppervlakte van deze individuele leefgebieden van bunzing en steenmarter ligt doorgaans in de grootteorde van enkele honderden (bv. 200 – 400) hectares (Van Den Berge & De Pauw 2003). In het dichtbevolkte Vlaanderen, waar de ruimtelijke ordening op het platteland gekenmerkt wordt door lintbebouwing en verspreide landelijke bewoning, komt dit neer op een algehele overlap van menselijke bewoning en activiteiten met het fysieke voorkomen van beide roofdiersoorten.

Deze overlapping confronteert de bunzing en de steenmarter tegelijk ook alom met het gebruik van rodenticiden bij het bestrijden van knaagdieren door de mens. Het gaat daarbij zowel om de particuliere en professionele aanwending van deze producten op bv. huiskavels, boerderijen en bedrijfsterreinen, als om de aanwending door overheden bij het beheer van openbare terreinen zoals bv. (water)wegen en ruimtes voor allerlei nutsvoorzieningen.

Knaagdieren maken een belangrijke voedselcomponent uit in het menu van zowel de bunzing als de steenmarter (Roger et al. 1988, Libois & Waechter 1991). Bij analyses van maaginhouden van zowel steenmarter (599 magen) als bunzing (620 magen) afkomstig uit Vlaanderen werden bij steenmarter in 34% van de gevallen restanten van knaagdieren aangetroffen, terwijl dit aandeel bij bunzing oploopt tot 41% (ongepubliceerde data K. Van Den Berge).

De vraag die daarbij rijst, is dan ook in welke mate deze roofdieren, via hun prooien, effectief ook het vergif binnenkrijgen dat bedoeld was voor hun prooi-soorten. Buitenlands onderzoek toonde reeds eerder aan dat dergelijke *secundaire intoxicatie* inderdaad kan optreden, en dit zowel in de context van bezorgdheid voor het behoud van roofdiersoorten (zie bv. Shore et al. 1996 & 1999, Birks 1998, Fournier-Chambrillon et al. 2004) dan wel als middel ter bestrijding ervan in het kader van de exotenproblematiek (zie bv. Alterio 1996, Alterio et al. 1997). Voor Vlaanderen is dit het eerste verkennende onderzoek gekaderd binnen deze problematiek.

2 Onderzoekshypotheses

Op basis van bestaande literatuur en de waargenomen populatietrends van bunzing en steenmarter werden voor dit onderzoek de volgende twee onderzoekshypotheses naar voor geschoven:

- Hypothese 1: Gezien de verschillen in de geobserveerde populatietrends tussen steenmarter en bunzing en de populatie-ecologische kenmerken van de beide soorten verwachten we een verschil waar te nemen in de intoxicatiegraad ten gevolge van secundaire intoxicatie tussen bunzing en steenmarter. Hierbij verwachten we dat zowel het geslacht, de leeftijd als het moment van het jaar waarop de specimen gevonden werden een rol spelen. Als hypothese 1 formuleren we daarom: Er is een verschil in de graad van intoxicatie (som van de teruggevonden leverresiduen) op basis van soort, moment van het jaar, geslacht en leeftijdscategorie
- Hypothese 2: De graad van intoxicatie beïnvloedt de lichaamsconditie

3 Algemene dataverzameling en methoden

3.1 Bunzing en Steenmarter

In functie van het INBO-onderzoek naar de ecologie en de verspreiding van roofdieren in Vlaanderen werd in 1996 het Marternetwerk opgericht, een vrijwilligersnetwerk dat o.m. instaat voor het inzamelen van dode marterachtigen over geheel Vlaanderen (Van Den Berge 2007, Van Den Berge et al. 2012).

De ingezamelde dieren werden gedurende een variabele tijd (weken, maanden) in een diepvriezer aan ca. - 20°C bewaard. Daarna werden ze in het autopsie-labo uitwendig en inwendig onderzocht. Bij deze autopsies werden diverse conditievariabelen gescoord (zie verder) en meerdere stalen genomen, waaronder ook de lever – het orgaan waarop in een latere fase de toxicologische analyses werden uitgevoerd. In afwachting van deze analyses werden de levers opnieuw ingevroren en bewaard (ca. -20°C).

Voor het onderzoek werden 150 bunzings en 75 steenmarters geselecteerd, respectievelijk ingezameld van 2006 tot 2011 en van 2009 tot 2012. De herkomst van de weerhouden steekproefdieren wordt weergegeven in figuur 1 en 2.

Bij de selectie van de steekproefdieren werden de volgende criteria gehanteerd:

- voorkeur voor recent ingezamelde dieren
- binnen een zo kort mogelijke periode gespreid
- geografisch gespreid over Vlaanderen
- voorkeur vindplaats en vinddatum nauwkeurig gekend
- voorkeur adulte dieren (> 1 jaar)
- maximale beschikbaarheid van potentieel relevante autopsiedata (conditie,...).

Omdat zowel de bunzing als de steenmarter van nature in relatief lage dichtheid voorkomen, en de specimen de facto vooral als verkeersslachtoffer werden ingezameld (en dus soms te zwaar gehavend, of niet meer voldoende vers waren), was het nodig de selectiecriteria minder strikt toe te passen dan idealiter vooropgesteld om aan het beoogde aantal steekproefdieren te komen.

Ten aanzien van het geslacht werd geen keuze gemaakt, de facto zijn bij de verzamelde specimen voor beide soorten de mannelijke dieren (wegens hun ruimtelijk gedrag, c.q. hoger risico tot verkeerssterfte) opmerkelijk meer vertegenwoordigd dan de vrouwelijke dieren.

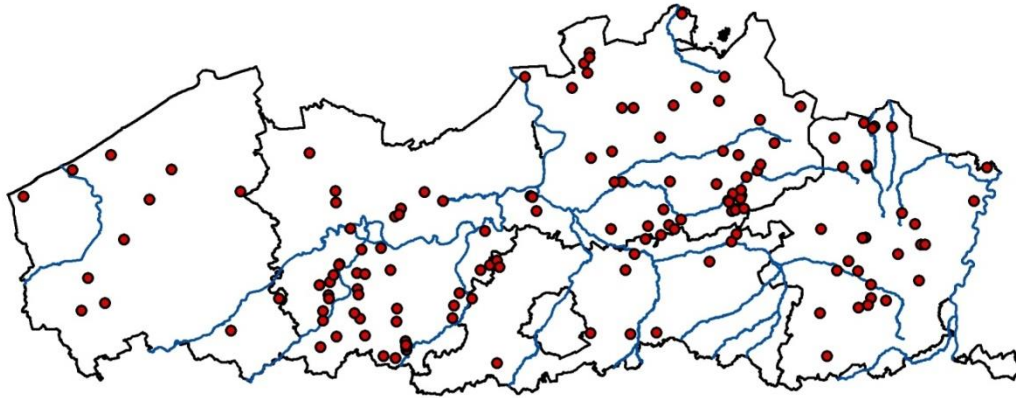
Het onderscheid tussen adulte en subadulte (< 1 jaar) dieren is gebaseerd op algemene biometrie (lichaamsgewicht en kopromplengte) en geslachtskenmerken (gewicht uterus en baculum, dracht).

De volgende conditieparameters (afgeleiden van) werden verzameld per dier:

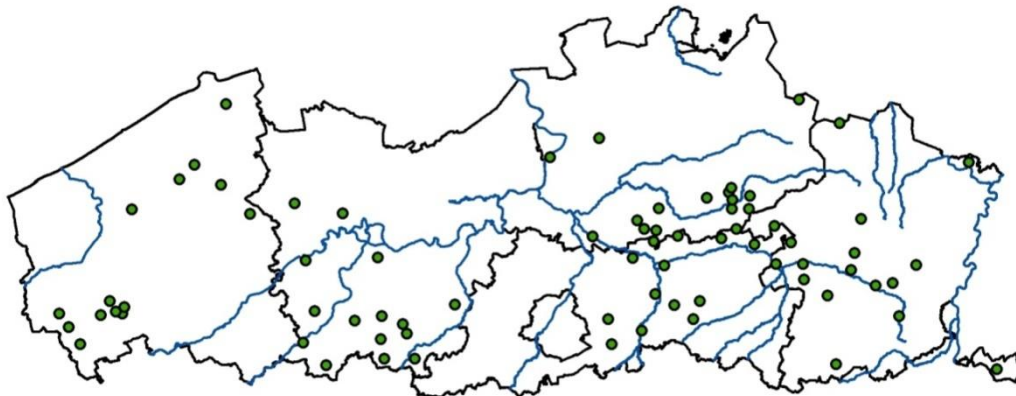
- lichaamsgewicht, totaal of ontweid⁵
- lengte van kop-romp en achtervoet
- gewicht mesenteriaal⁶ vet
- hoeveelheid niervet en hoeveelheid onderhuids vet volgens een visueel gescoorde index (1 < 2 < 3).

⁵ *Ontweid: ontdaan van de ingewanden*

⁶ *Mesenteriaal: met betrekking tot het mesenterium (een plooi van het buikvlies die over de darmen heen hangt en dient als ophangband voor de darmen en andere organen in de buikholte)*



Figuur 1: Herkomst van de bunzingen in de steekproef.



Figuur 2: Herkomst van de steenmarters in de steekproef.

3.2 Toxicologische analyse

Het toxicologisch onderzoek werd uitgevoerd aan het laboratorium voor Farmacologie en Toxicologie van de faculteit diergeneeskunde van de Universiteit Gent. In totaal werden 8 verschillende actieve ingrediënten opgespoord en gekwantificeerd: warfarine, coumatetralyl, chloorfacinon, bromadiolone, difenacoum, brodifacoum, flocoumafen en difethialon. De eerste drie producten behoren tot de eerste generatie rodenticiden, de vijf andere zijn tweede generatie rodenticiden. De analyses gebeurden aan de hand van vloeistof chromatografie gecombineerd met heated electrospray ionisatie tandem massaspectrometrie (LC-HESI-MS/MS), zoals uitvoerig beschreven in Vandenbroucke et al. (2008b). De detectielimiet van deze stoffen in lever varieerde van 0,37 ng/g voor warfarine tot 4,64 ng/g voor chloorfacinon (Vandenbroucke et al. 2008a,b). De analysemethode werd vooraf gevalideerd in lever, en de lineariteit, accuraatheid en precisie vielen binnen de aanvaardbare grenzen.

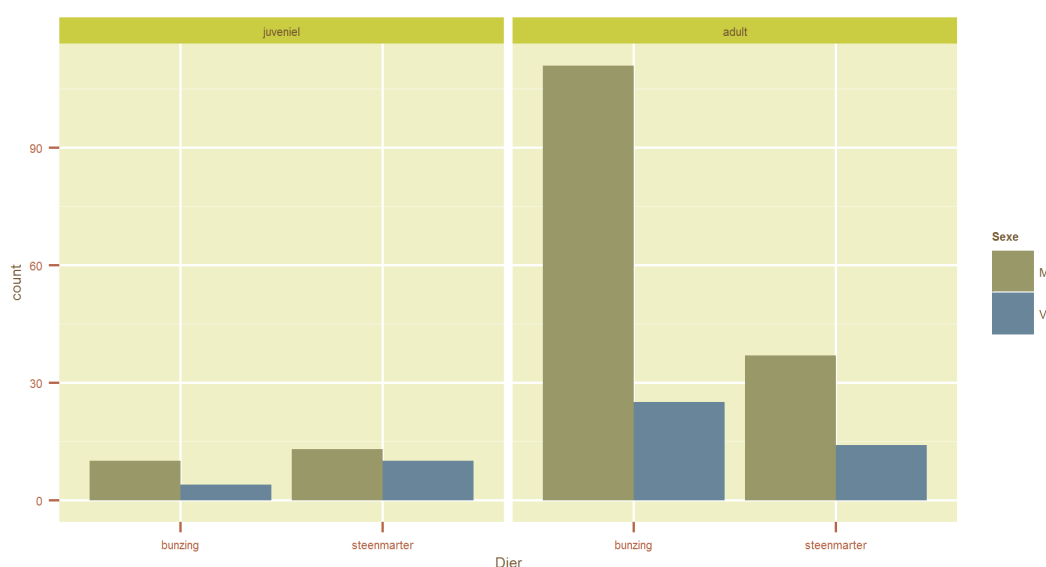
4 Dataverkenning

4.1 Beschrijvende dataverkenning van de kenmerken van de steekproefdieren

In totaal werden 150 bunzings en 75 steenmarters getest op aanwezigheid van AC residuen in de lever. Voor sommige van deze steekproefdieren is evenwel niet alle bijkomende informatie (kenmerken of variabelen) bekend. De dataverkenning heeft aldus soms betrekking op een subset van de steekproef. Dieren waarvan bepaalde variabelen niet beschikbaar waren, werden niet meegenomen in die specifieke statistische analyse.

Bij een eerste verkenning werd nagegaan of er een verschil was tussen de kenmerken (geslacht, leeftijd, conditie...) van de bunzings en steenmarters waarvoor de toxicologische waarden gekend waren.

4.1.1 Aantallen per soort, per leeftijdscategorie en volgens geslacht



Figuur 3: Aantal dieren opgesplitst per soort, leeftijd en geslacht (150 bunzings, 74 steenmarters).

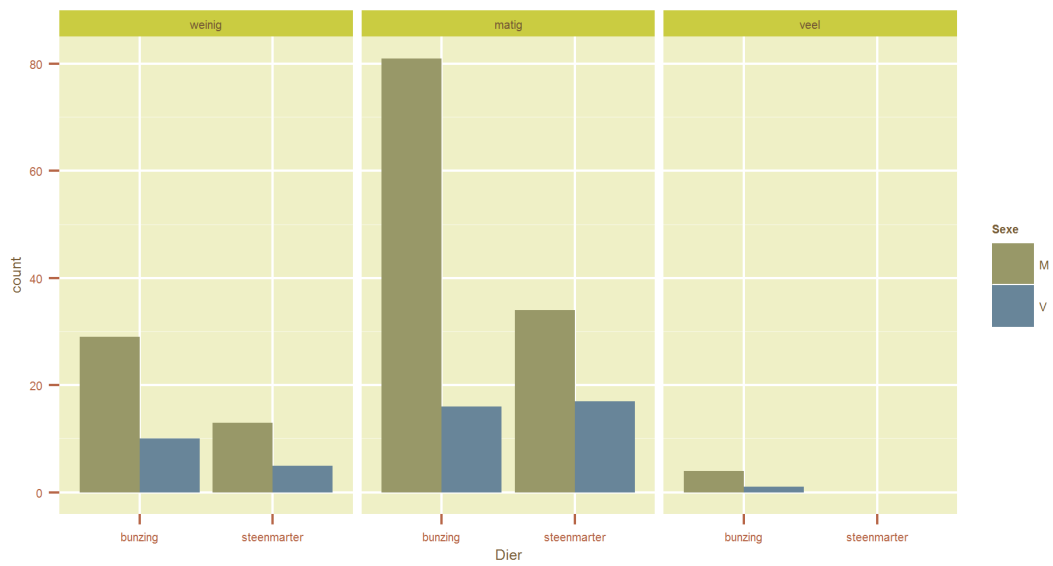
Er werd een significant verband gevonden tussen geslachtsverdeling en soort (Fisher's Exact test, $p = 0,0306$, figuur 3).

Tabel 1: Leeftijdsverdeling per soort

	bunzing	steenmarter
juveniel	14	23
adult	136	51

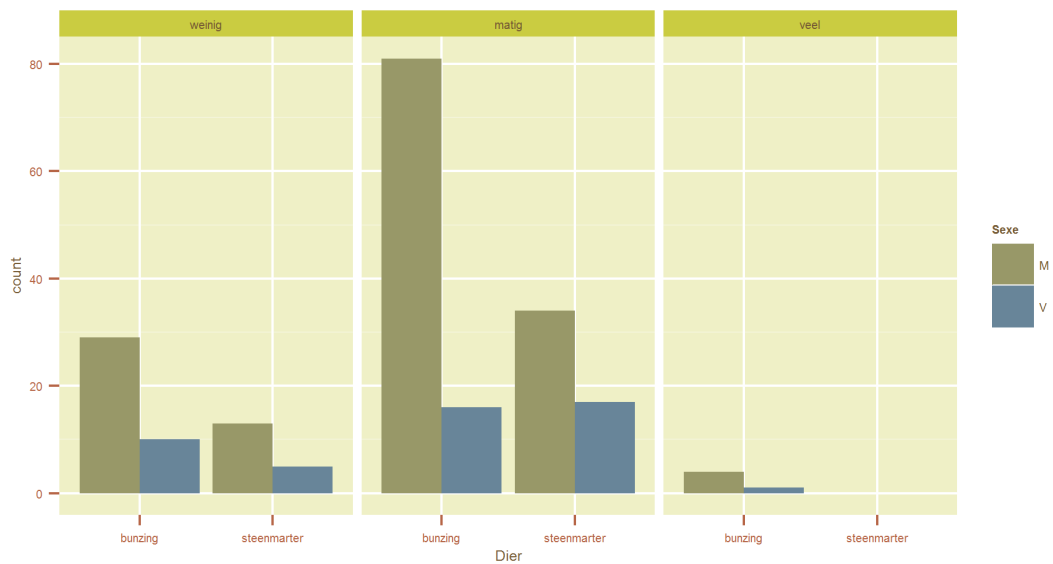
Er werd een significant verband gevonden tussen leeftijdsverdeling en soort (Fisher's Exact test, $p < 0,001$).

4.1.2 Conditievariabelen



Figuur 4: Aantal dieren per klasse niervet, soort en geslacht (141 bunzings, 69 steenmarters).

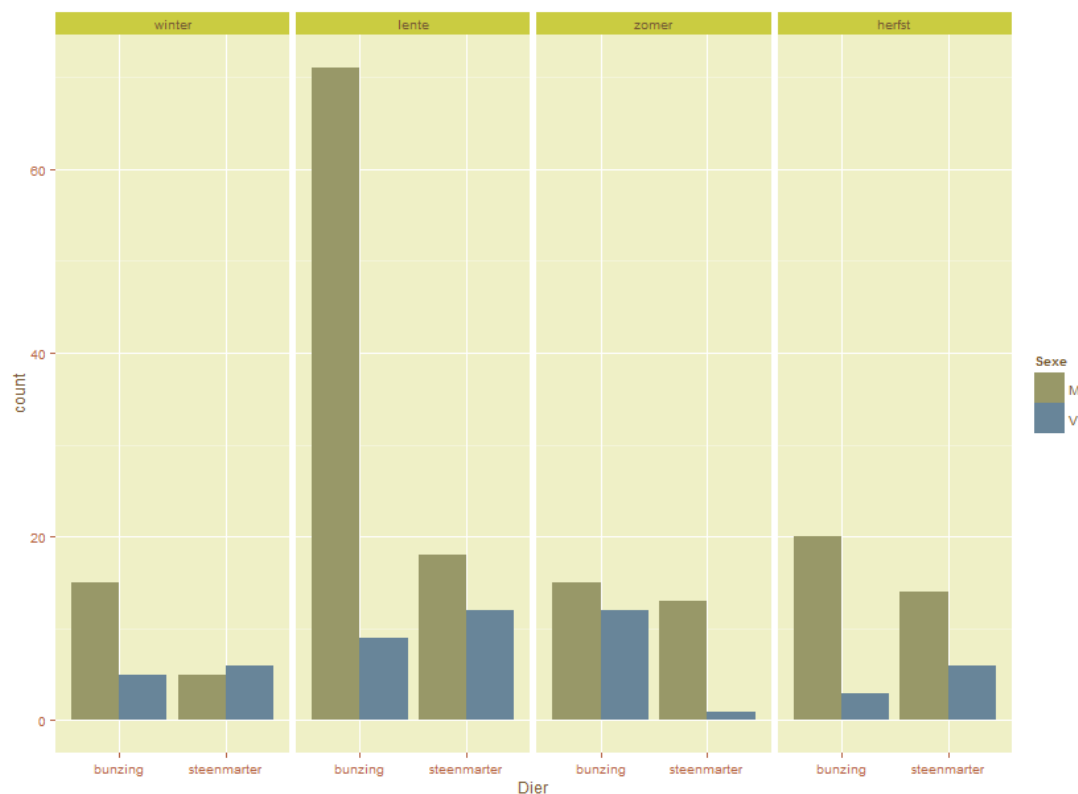
Er werd geen significant verband gevonden tussen de niervet-index en soort ($p = 0,3271$, figuur 4).



Figuur 5: Aantal dieren per klasse onderhuids vet, diersoort en geslacht (146 bunzings, 69 steenmarters).

We vonden een significant verband tussen onderhuids vet en soort ($p = 0,0036$, figuur 5).

4.1.3 Tijdstip van het jaar van inzameling



Figuur 6: Aantal dieren per seizoen, soort en geslacht (150 bunzings, 75 steenmarters)

Er is geen significant verband gevonden tussen beide soorten voor wat betreft het aantal steekproefdieren dat weerhouden werd per seizoen ($p = 0,1558$, figuur 6).

4.1.4 Besluit

Op basis van deze testen blijkt dat in de beschikbare dataset het aantal dieren per leeftijdscategorie en geslachtscategorie significant verschilt tussen beide soorten, ook voor wat betreft de hoeveelheid onderhuids vet is er een significant verschil tussen de verzamelde bunzings en steenmarters.

Concreet zijn er bij de bunzing verhoudingsgewijs veel meer mannetjes dan wijfjes in vergelijking met de steenmarter, waar het overwicht van de mannetjes in de steekproef niet zo uitgesproken is. Analoog geldt dit voor de leeftijdscategorie. Bij de bunzing is er een sterk overwicht van adulte ten opzichte van juveniele dieren in de steekproef, terwijl dit bij de steenmarter minder uitgesproken is.

Inzake de conditieparameters blijkt het onderhuids vet (index) bij de bunzing meer onderscheidend te zijn dan bij de steenmarter: de verdeling over de drie index-categorieën blijkt bij de bunzing egalier te zijn dan bij de steenmarter, waar de middenklasse het sterkst vertegenwoordigd is en de andere klassen relatief minder voorkomen.

Daarentegen is er geen significant verschil tussen beide soorten voor wat betreft het aantal specimen verzameld per seizoen en werd er geen significant verschil gevonden tussen beide soorten voor de niervet-index.

4.2 Verkennende analyse van de aanwezigheid van residuen van actieve stoffen

4.2.1 Testen voor de binaire respons voor aan- of afwezigheid van residuen

Tabel 2: Aan(1)- of afwezigheid(0) van residuen bij bunzing per geslacht, leeftijd en seizoen.

BZ	M	V	juveniel	adult	winter	lente	zomer	herfst
0	27	7	8	26	6	12	8	8
1	94	22	6	110	14	68	19	15

Tabel 3: Aan(1)- of afwezigheid(0) van residuen bij steenmarter per geslacht, leeftijd en seizoen.

SM	M	V	juveniel	adult	winter	lente	zomer	herfst
0	11	3	7	6	0	2	2	10
1	39	22	16	45	11	28	12	10

Tabel 4: Score van niervet- en onderhuids vet-index bij bunzing en steenmarter opgedeeld volgens aan(1)- of afwezigheid(0) van residuen.

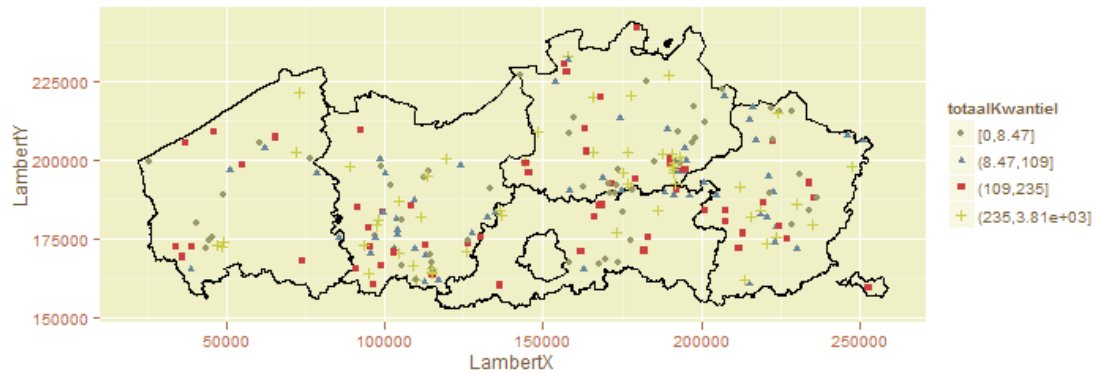
BZ&SM	niervet			onderhuisvet		
	weinig	matig	veel	weinig	matig	veel
0	8	34	1	6	20	17
1	49	114	4	24	81	67

4.2.2 Geografische spreiding van de gevonden concentraties

Voor de interpretatie van de resultaten werd er gewerkt met de som van de verschillende residuen teruggevonden in één lever. Waarden onder de kwantificatielimiet⁷ werden niet meegenomen in de analyse.

Op het eerste zicht lijkt er geen geografisch verschil te zijn voor wat betreft de teruggevonden concentraties AC-residuen in de lever (figuur 7).

⁷ Kwantificatielimiet: laagste concentratie die nauwkeurig bepaald kan worden

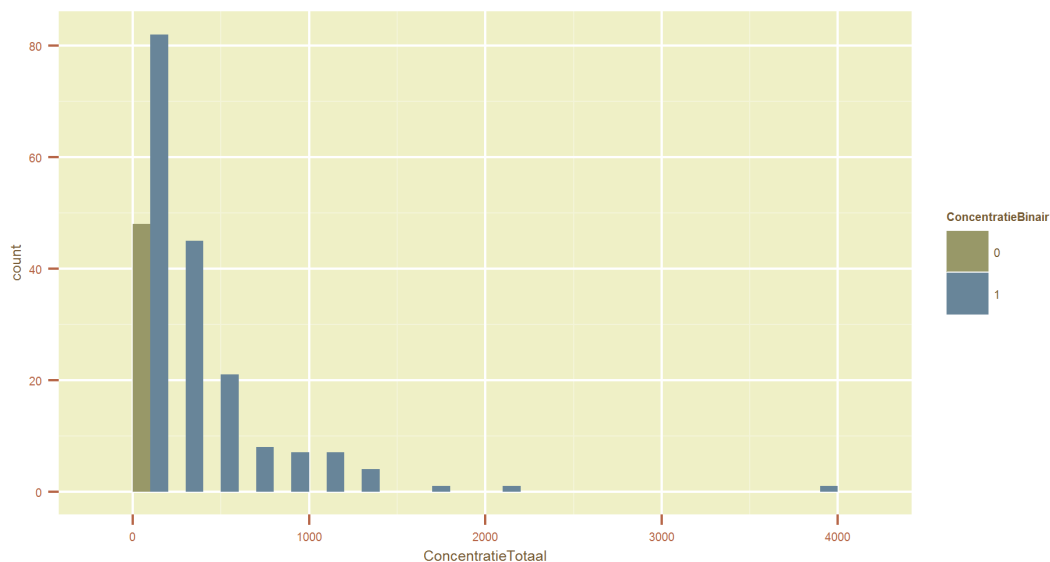


Figuur 7: Geografische verspreiding van bunzing en steenmarter opgedeeld per kwartiel van de som van de residuen. De aangegeven grenzen zijn die van de provincies in Vlaanderen.

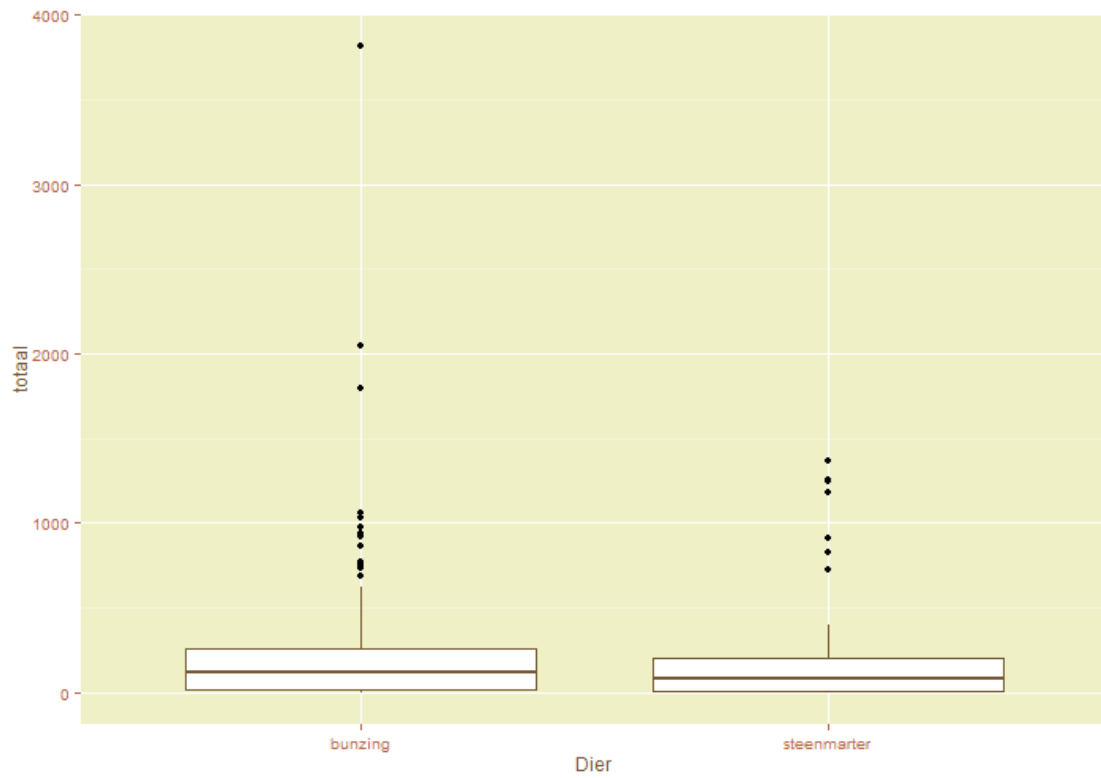
4.2.3 Aantal dieren met residuen van AC, gevonden residuconcentraties en aantal gevonden residuen van verschillende AC per steekproefdier

In totaal werden bij 116 bunzingen (77%) en 61 steenmarters (81%) residuen van AC teruggevonden (figuur 8), waarbij heel vaak ook meerdere stoffen bij eenzelfde dier. Om de mogelijke totaal-impact van deze residuen te kunnen inschatten, werden de respectievelijke concentraties te worden opgeteld analogo aan de studie van Elmeros et al. (2011).

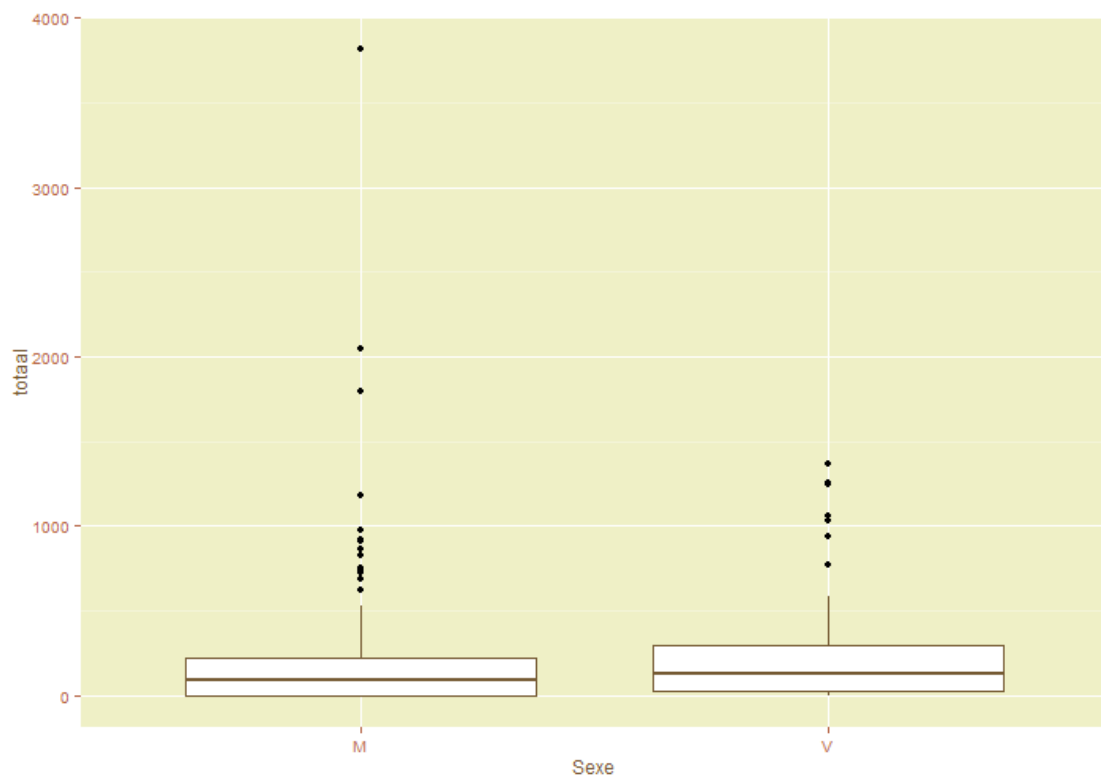
De hoogst teruggevonden som van residuen bedraagt bij bunzing 3,813 µg/g en bij steenmarter 1,370 µg/g. Een spreiding van de som van de residuen per soort en geslacht vind je in figuur 9 en 10. De mediaan bedraagt respectievelijk 0,133 µg/g voor bunzing en 0,196 µg/g voor steenmarter.



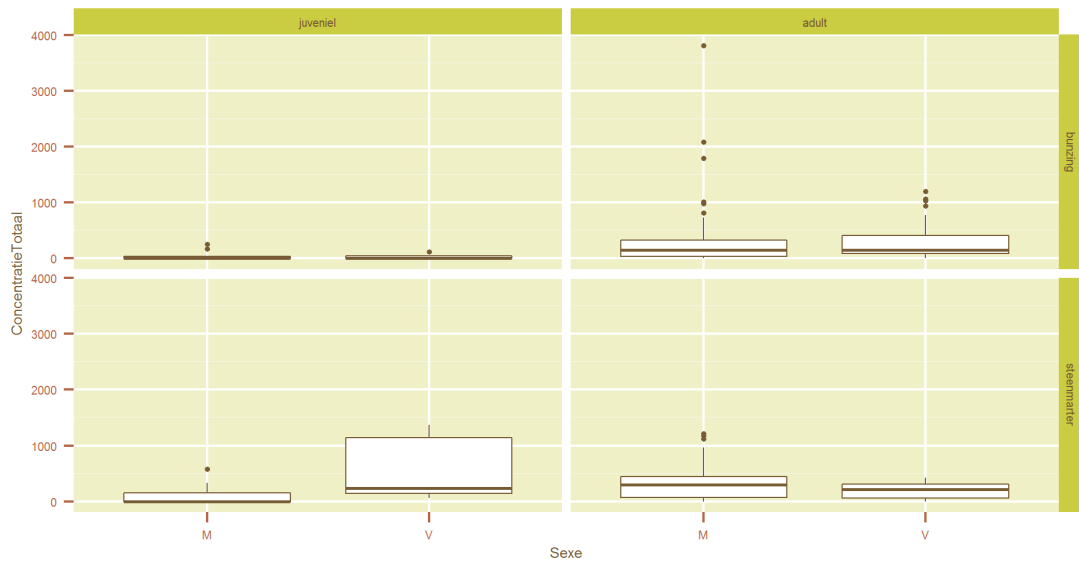
Figuur 8: Aantal dieren met residuen opgedeeld in klassen om de 200 ng/g (blauwe staven), dieren zonder residuen weergegeven als groene staaf.



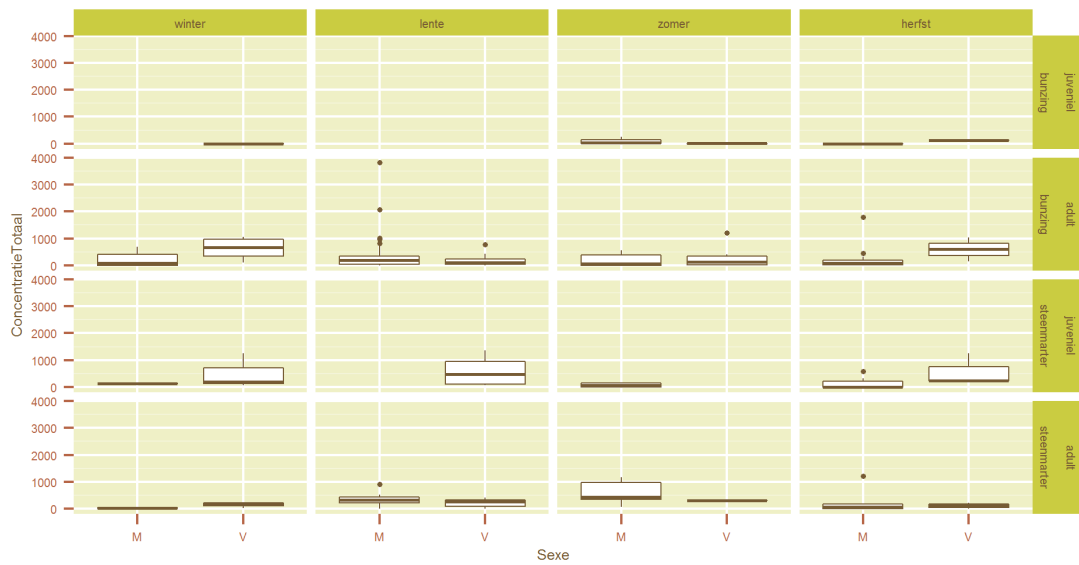
Figuur 9: Spreiding van de som van de residuen per diersoort. De residuen zijn uitgedrukt in ng/g.



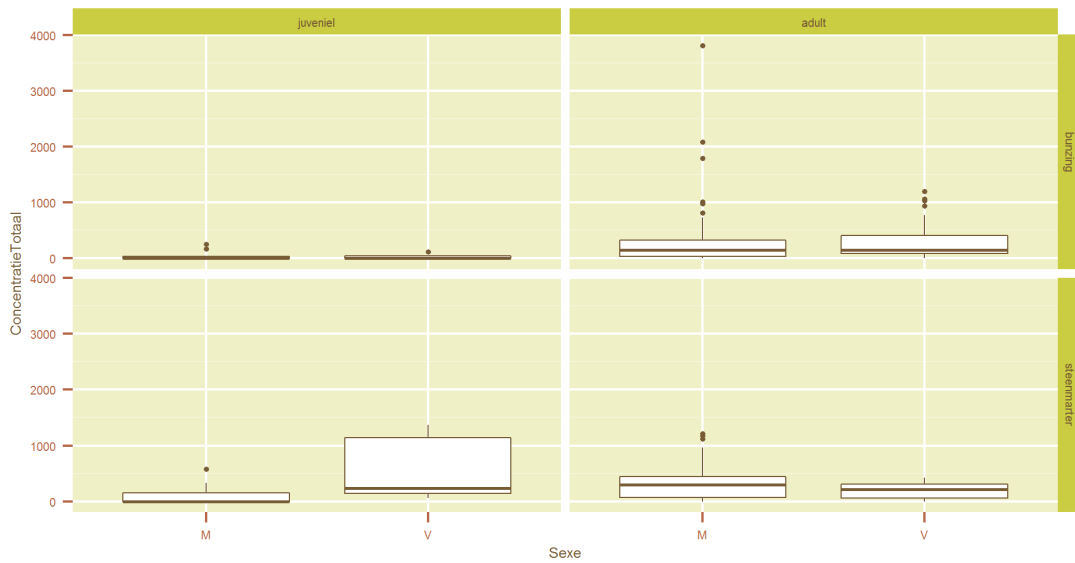
Figuur 10: Spreiding van de som van de residuen per geslacht. De residuen zijn uitgedrukt in ng/g.



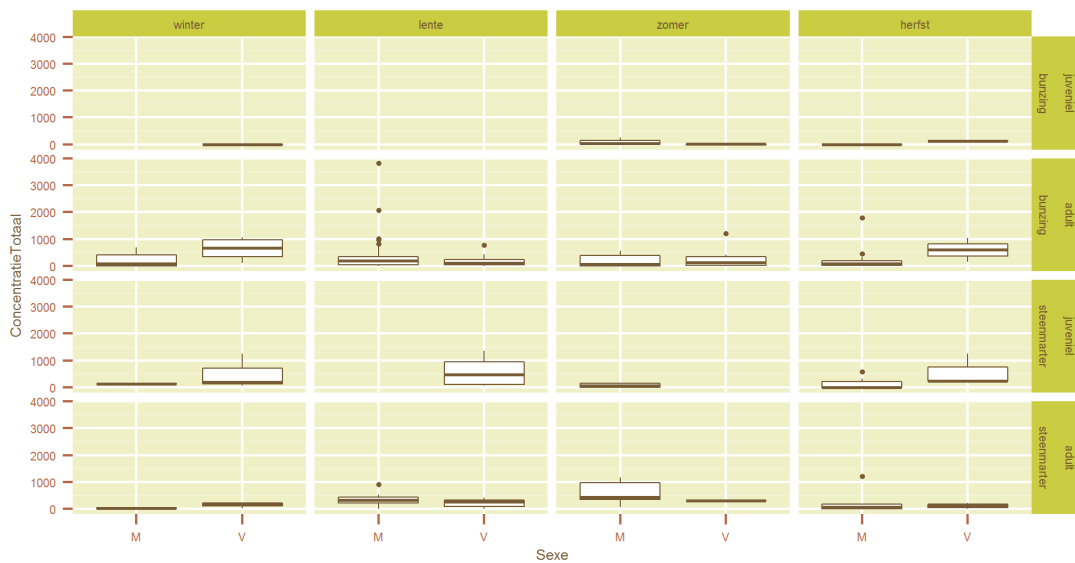
Figuur 11: Residuconcentratie (ng/g) per soort, leeftijd en geslacht.



Figuur 12: Residuconcentratie (ng/g) per seizoen, diersoort, leeftijd en geslacht.

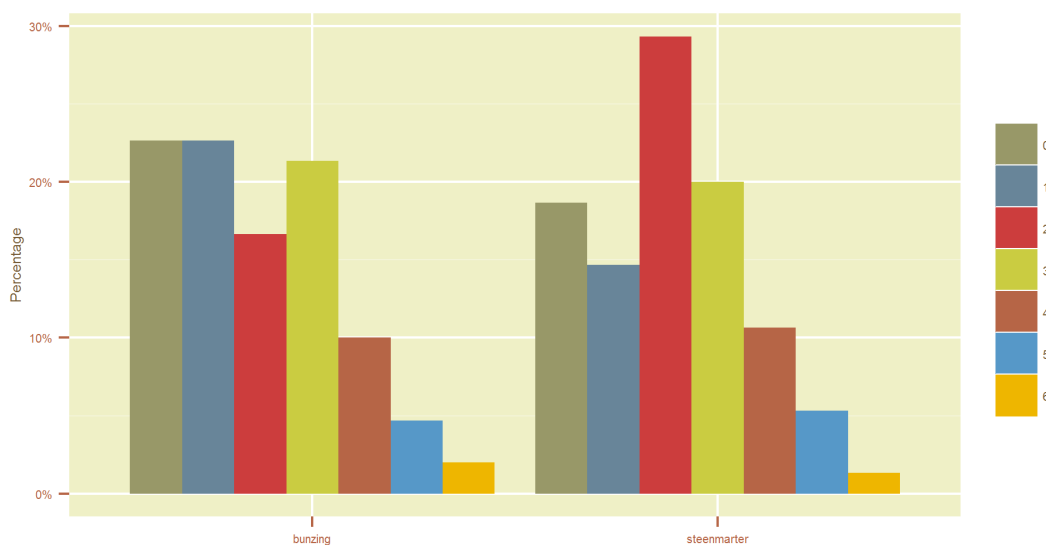


Figuur 11: Residuconcentratie (ng/g) per soort, leeftijd en geslacht en

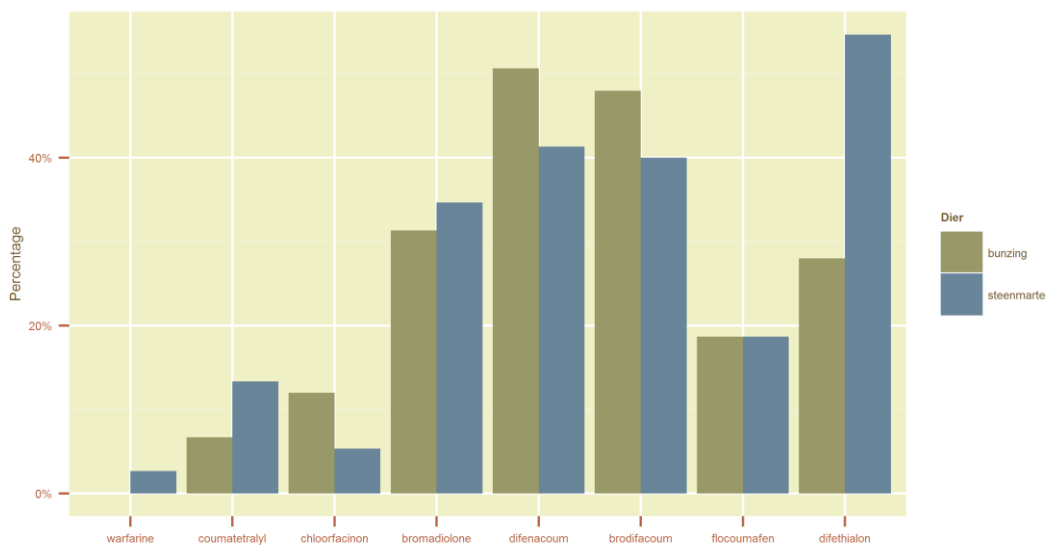


tonen grafisch de aanwezige interacties tussen de verschillende factoren die opgenomen zijn in onze eerste hypothese. De concentratie wordt immers blijkbaar telkens beïnvloed door de combinatie van meerdere factoren (vb. leeftijd en seizoen).

Bij sommige analyses werd een bepaalde actieve stof onder de kwantificatielimit teruggevonden, in totaal 12 keer bij 11 verschillende dieren. Voor de berekening van het aantal verschillende AC zoals in de twee onderstaande grafieken werd deze bevinding wel meegenomen. Bij verschillende dieren werden meerdere AC teruggevonden. Zowel voor bunzing als voor steenmarter was het maximum aantal teruggevonden AC bij één en hetzelfde dier zes (figuur 13).



Figuur 13: Aantal (0 – 6) verschillende AC die bij een bepaald percentage van de onderzochte bunzingen (n=150) en onderzochte steenmarters (n=75) werden teruggevonden.



Figuur 14: Percentage van de onderzochte bunzingen (n = 150) en onderzochte steenmarters (n = 75) waarbij de respectievelijke AC werden teruggevonden.

Het zijn vooral tweede generatie AC die we terugvonden bij zowel bunzing als steenmarter (**Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**iguur 14). Bij bunzing was dat in volgorde van dalende prevalentie het geval voor difenacoum, brodifacoum, bromadiolone en difethialon. Bij steenmarter was dit eveneens in volgorde van dalende prevalentie vooral difethialon, difenacoum, brodifacoum en bromadiolone. Flocoumafen is het tweede generatie AC dat zowel bij bunzing als steenmarters het minst werd teruggevonden.

Opmerkelijk is het verschil in het percentage dieren waarbij difethialon werd teruggevonden. Het percentage steenmarters (55%) waarbij deze stof werd teruggevonden bedraagt

ongeveer het dubbele van het percentage bunzings (28%). Dit verschil tussen beide diersoorten is het duidelijkst in de provincie West-Vlaanderen waarbij geen enkele onderzochte bunzing (n=12) sporen van difethialon vertoonde in tegenstelling tot 10 van de 14 onderzochte steenmarters.

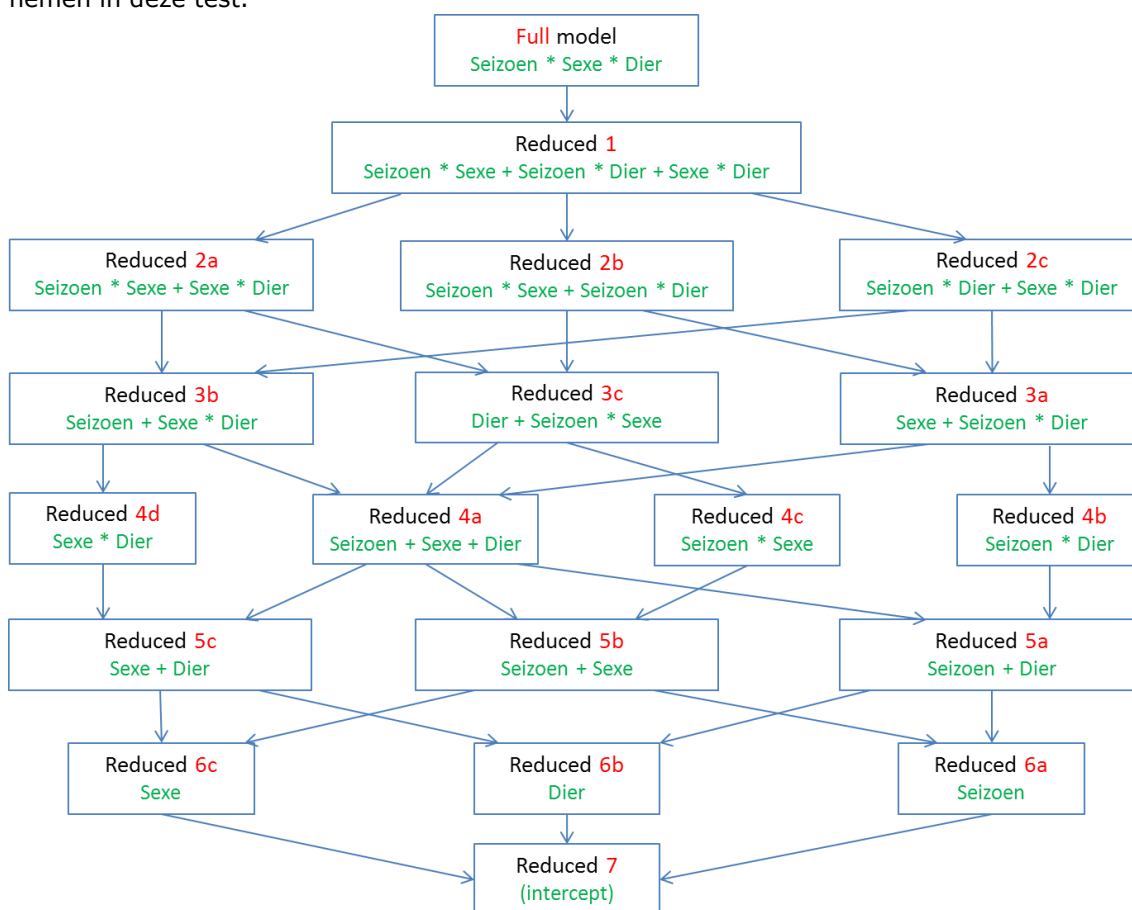
Dergelijke relatieve verschillen tussen de beide soorten zijn analoog of zelfs sterker voor de producten van de eerste generatie. Hier zijn de absolute aantallen evenwel laag, zodat het toeval hier een grotere rol kan spelen en er mogelijk geen reële verklaring voor bestaat.

5 Onderzoeksvragen

5.1 Hypothese 1: Er is een verschil in de graad van intoxicatie op basis van soort, moment van het jaar, geslacht en leeftijdscategorie

5.1.1 Materiaal en methoden

Uit de verkennende analyse bleek dat er verschillen zaten tussen de aantallen bunzingen en steenmarters per leeftijds- en geslachts categorie. Om hypothese 1 te testen werd er gebruik gemaakt van een lineair model met seizoen, geslacht en soort als onafhankelijke variabele en de graad van intoxicatie als de afhankelijke variabele. Hierdoor kunnen we in het resultaat rekening houden met eventuele interacties tussen seizoen, geslacht en diersoort (figuur 15). Wegens het relatief beperkt aantal juveniele dieren in de totale dataset en de onevenwichtige bijdrage ervan voor beide soorten, werd beslist enkel adulte dieren op te nemen in deze test.



Figuur 15: De flowchart geeft alle mogelijke modellen weer met seizoen, geslacht en soort (= dier in de figuur) als verklarende variabelen, inclusief alle interacties tussen deze 3 variabelen.

5.1.2 Resultaten

5.1.2.1 Concentratie als binaire (0/1) variabele

We fitten alle eerder genoemde modellen die deel uitmaken van de flowchart en gebruiken in deze eerste analyse als afhankelijke variabele 1 of 0 (wel of geen aanwezigheid van residuen). Hiervoor gebruiken we een logistische regressie. **Fout! Verwijzingsbron niet**

gevonden. geeft voor elk model de relatieve kwaliteit uitgedrukt als Akaike Information Criterium (AIC) en het aantal vrijheidsgraden weer.

Tabel 5: Vrijheidsgraden (df) en de relatieve kwaliteit (AIC) van de verschillende statistische modellen (concentratie als binaire variabele).

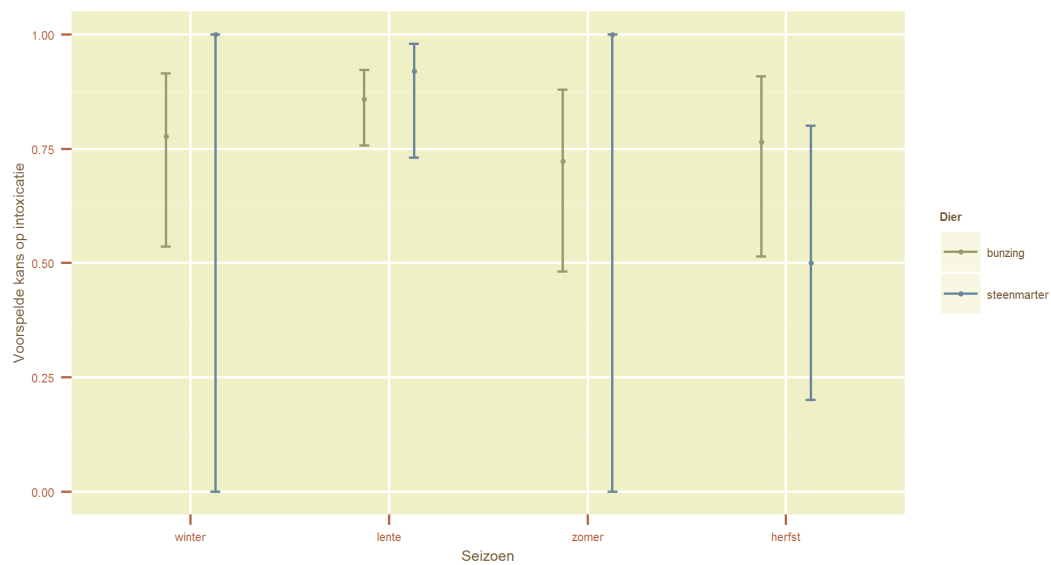
	df	AIC
FullModelBinair	16	169.8
ReducedModelBinair1	13	164.2
ReducedModelBinair2a	10	166.1
ReducedModelBinair2b	12	162.8
ReducedModelBinair2c	10	161.0
ReducedModelBinair3a	9	159.5
ReducedModelBinair3b	7	163.7
ReducedModelBinair3c	9	164.5
ReducedModelBinair4a	6	161.9
ReducedModelBinair4b	8	157.6
ReducedModelBinair4c	8	163.3
ReducedModelBinair4d	4	163.0
ReducedModelBinair5a	5	159.9
ReducedModelBinair5b	5	161.1
ReducedModelBinair5c	3	161.1
ReducedModelBinair6a	4	159.1
ReducedModelBinair6b	2	159.1
ReducedModelBinair6c	2	160.0
ReducedModelBinair7	1	158.1

Het AIC is een maat die weergeeft hoeveel informatie er verloren gaat door een statistisch model te gebruiken om een set van gegevens te beschrijven, rekening houdend met de complexiteit van dat model. Hoe lager de AIC, hoe minder informatie verloren gaat. Wanneer we een hele reeks statistische modellen met mekaar willen vergelijken op basis van AIC, gaan we op zoek naar het model dat de gegevens het beste beschrijft, dus waar het verlies aan informatie, en dus de AIC, zo klein mogelijk is. Voor de hele set van statistische modellen in figuur 15 vinden we dat model 4b de laagste AIC waarde heeft. Dit model bevat zowel de term seizoen, als soort, en de interactie tussen beide variabelen ($p=0.0409$), maar geslacht en leeftijd niet. Dit betekent dat de kans op aanwezigheid van intoxicatie verschilt naargelang de combinatie van seizoen en soort. Ook de klassieke statistische modelreductie (vertrekkende van het meest uitgebreide model worden niet-significante termen een voor een verwijderd uit het model) leidt tot hetzelfde finale model 4b.

Uit Figuur 16 blijken echter de zeer grote betrouwbaarheidsintervallen op de modelvoorspellingen voor steenmarter wat deels te verklaren is door de beperkte aantallen steenmarters voor elk seizoen.

Tabel 6: Sequentiële Anova-tabel voor model 4b (concentratie binair)

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL			171	156.06	
Seizoen	3	4.9378	168	151.12	0.1764
Dier	1	1.2209	167	149.90	0.2692
Seizoen:Dier	3	8.2616	164	141.64	0.0409

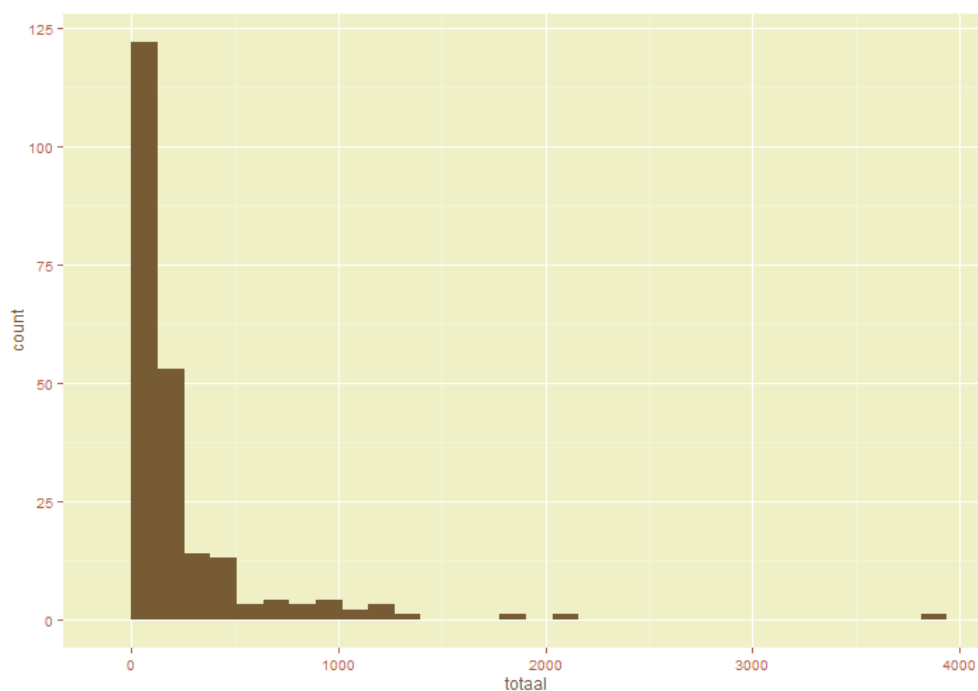


Figuur 16: Voorspelde kans op intoxicatie met betrouwbaarheidsintervallen per combinatie van soort en seizoen, gebaseerd op model 4b.

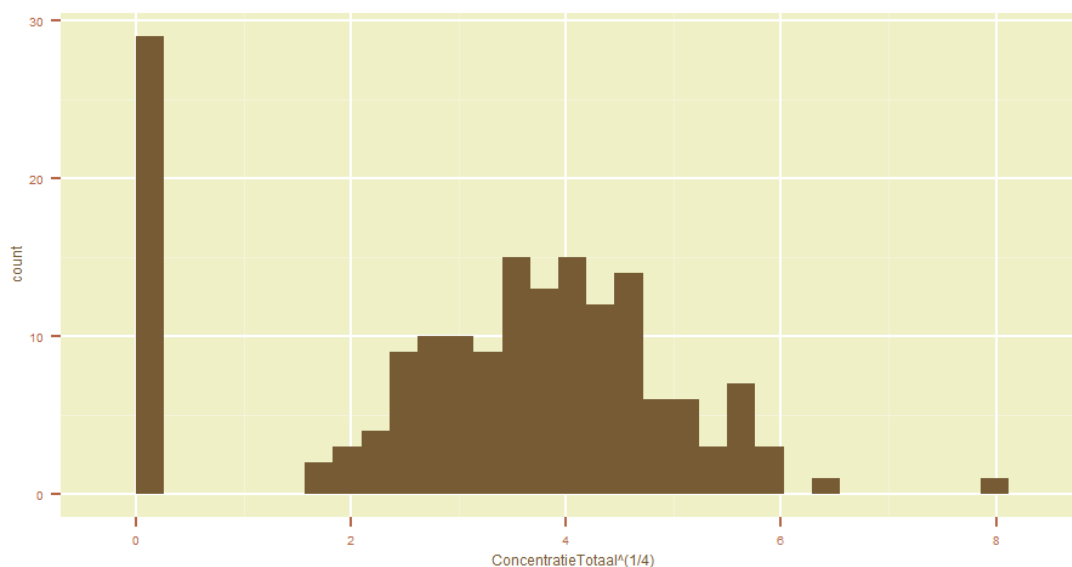
5.1.2.2 Concentratie als continue variabele

5.1.2.2.1 Bunzing en steenmarter

Een grafische verkenning van de totale concentratie leert ons dat we te maken hebben met een heel scheve verdeling (figuur 17). We transformeerden dit via de vierde machtswortel (figuur 18), omdat die los van de nullen het best een normale verdeling benaderde. Een normale verdeling is een noodzakelijk uitgangspunt voor de betrouwbaarheid van de toegepaste statistische analyse.



Figuur 17: Verdeling van som van de residuen (in ng/g).



Figuur 18: De verdeling van de vierde machtswortel van de som van de residuen.

Tabel 7: Vrijheidsgraden (df) en de relatieve kwaliteit (AIC) van de verschillende statistische modellen (concentratie als continue variabele).

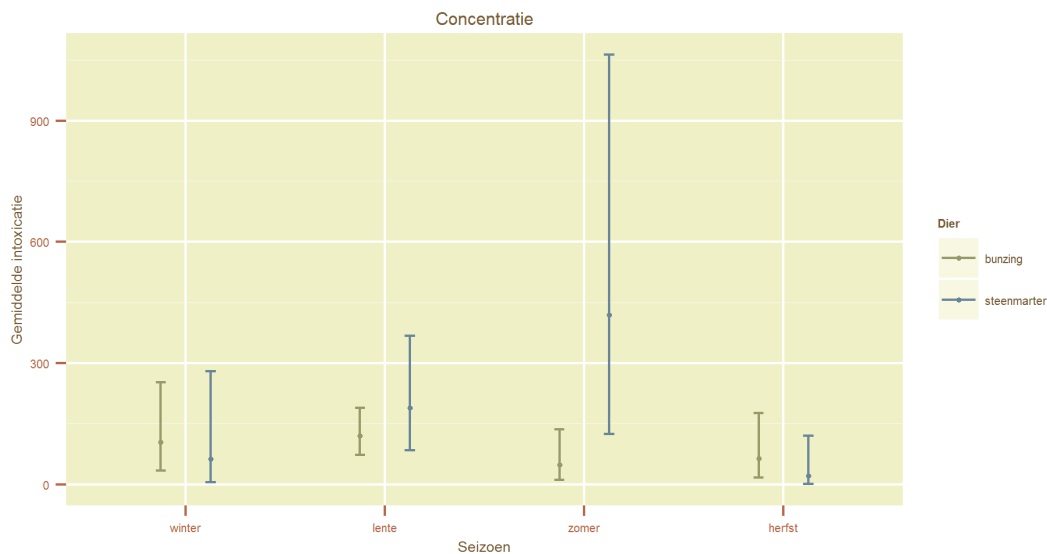
	df	AIC
FullModelContinu	17	690.0
ReducedModelContinu1	14	684.8
ReducedModelContinu2a	11	687.9
ReducedModelContinu2b	13	684.5
ReducedModelContinu2c	11	683.9
ReducedModelContinu3a	10	683.8
ReducedModelContinu3b	8	686.8
ReducedModelContinu3c	10	687.9
ReducedModelContinu4a	7	686.4
ReducedModelContinu4b	9	682.9
ReducedModelContinu4c	9	686.9
ReducedModelContinu4d	5	686.1
ReducedModelContinu5a	6	684.6
ReducedModelContinu5b	6	685.7
ReducedModelContinu5c	4	685.3
ReducedModelContinu6a	5	684.0
ReducedModelContinu6b	3	683.4
ReducedModelContinu6c	3	684.3
ReducedModelContinu7	2	682.6

We fitten alle mogelijke modellen met de vierde machtswortel van de totale concentratie als respons aan de hand van een eenvoudig lineair model. Onderstaande geeft voor elk model de AIC waarde en het aantal vrijheidsgraden.

De klassieke modelreductie, startende van het meest uitgebreide model, resulteert opnieuw in het weerhouden van model 4b, dat zowel de factor seizoen als soorten en de interactieterm tussen beide factoren bevat. De voorspelde modelwaarden en hun betrouwbaarheidsintervallen worden weergegeven in figuur 19.

Tabel 8: Sequentiële Anova-tabel voor model 4b (4e machtswortel van de concentratie continue variabele).

	Df	Deviance Resid.	Df	Resid. Dev	F	Pr(>F)
NULL			171	520.49		
Seizoen	3	135.893	168	506.90	15.453	0.20478
Dier	1	41.874	167	502.72	14.285	0.23373
Seizoen:Dier	3	219.911	164	480.72	25.008	0.06132



Figuur 19: Gemiddelde graad van intoxicatie (in ng/g) met betrouwbaarheidsintervallen per combinatie van soort en seizoen, gebaseerd op model 4b.

5.1.2.2.2 Bunzing

Op basis van vorige resultaten herhaalden we deze analyse ook enkel voor de gegevens met betrekking tot bunzing. Voor steenmarter deden we dat niet gezien het beperkte aantal geteste dieren en het relatief grote aantal juveniele dieren. Door het wegvallen van de verklarende variabele diersoort konden enkel volgende modellen nog bekeken worden: ReducedModel4c, ReducedModel5b, ReducedModel6a, ReducedModel6c en ReducedModel7.

Tabel 9: Vrijheidsgraden (df) en de relatieve kwaliteit (AIC) van de verschillende statistische modellen met enkel bunzing (concentratie als binaire respons)

	df	AIC
ReducedModelBinair4cB	8	129.1
ReducedModelBinair5bB	5	126.1
ReducedModelBinair6aB	4	124.6
ReducedModelBinair6cB	2	122.9
ReducedModelBinair7B	1	120.9

Tabel 10: Vrijheidsgraden (df) en de relatieve kwaliteit (AIC) van de verschillende statistische modellen met enkel bunzing (concentratie als continue respons)

	df	AIC
ReducedModelContinu4cB	9	504.9
ReducedModelContinu5bB	6	503.2
ReducedModelContinu6aB	5	503.7
ReducedModelContinu6cB	3	501.6
ReducedModelContinu7B	2	500.4

Zowel voor de binaire respons (tabel 9) als voor de continue respons (4^e machtswortel) (tabel 10) concluderen we dat ReducedModel7 (intercept) de laagste AIC heeft en de gegevens het best beschrijft. M.a.w. geen enkele van de vooropgestelde variabelen kan het verschil in concentratie tussen de bunzings onderling verklaren.

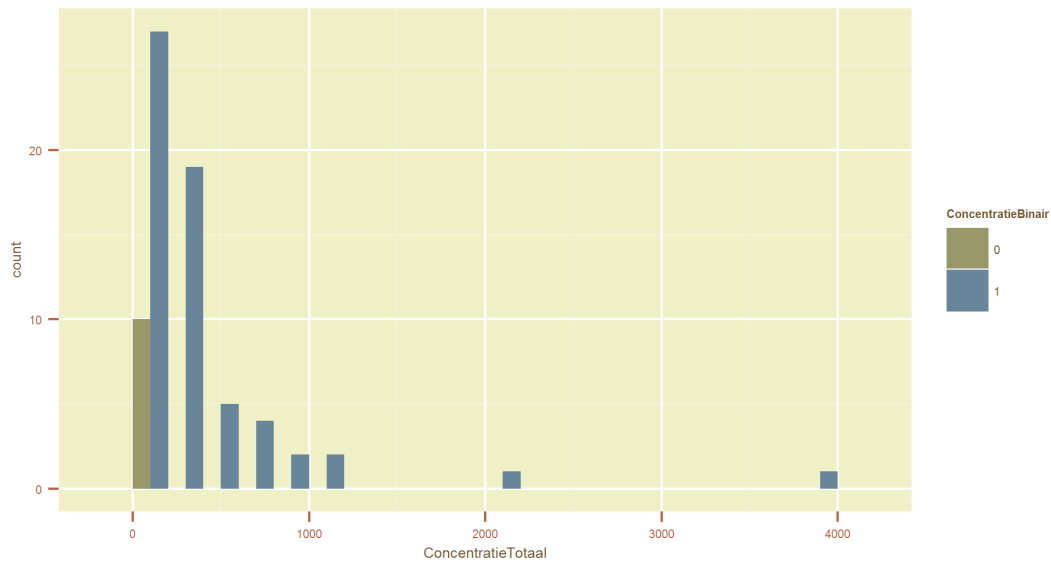
5.1.3 Conclusie

Deze modelmatige aanpak toonde aan dat voor de variatie in de residuconcentratie geen significante relatie kon aangetoond worden met soort, seizoen of geslacht van de steekproefdieren. Het model dat weerhouden wordt op basis van onze analyses omvat zowel de term seizoen, als de term soort en de interactieterm tussen beide factoren, maar geen effect van geslacht. Dit betekent dat de kans op aanwezigheid van intoxicatie verschilt naargelang de combinatie van seizoen en soort. Wanneer we echter het soorteffect uitsluiten door enkel de dataset van de geanalyseerde bunzings te analyseren valt ook het effect van seizoen volledig weg.

5.2 Hypothese 2: De graad van intoxicatie beïnvloedt de lichaamsconditie

5.2.1 Materiaal en methode

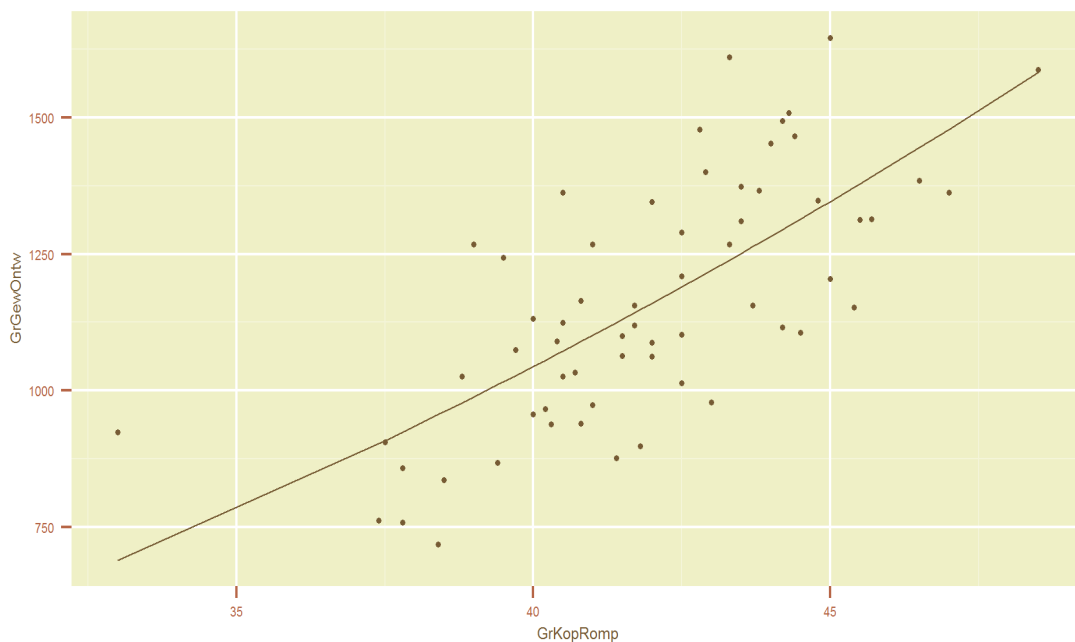
Uit eerder (eco)toxicologisch onderzoek is gebleken dat niet eenduidig kan gesteld worden vanaf welke concentratie residuen in de lever sub-lethale effecten of sterfte door intoxicatie veroorzaken. Daarom onderzochten we of er een verband was tussen de residuconcentraties en een aantal conditievariabelen namelijk niervet, onderhuids vet, mesenteriaal vet en lichaamsconditie als functie van gewicht ten opzichte van lengte. Deze analyses werden enkel uitgevoerd op volwassen mannelijke bunzings die dood teruggevonden werden in de lente. Door ons te beperken tot deze groep konden we effecten van seizoen, geslacht en leeftijd op de conditievariabelen uitsluiten. Van de 71 mannelijke bunzings hielden we 55 dieren over omdat we enkel gebruik maakten van die dieren waarvan we de vier conditievariabelen ter beschikking hadden. Daarnaast elimineerden we nog één dier met een duidelijk hogere concentratie als de andere. Het totaal aantal dieren dat we testten was dus 54 (figuur 20).



Figuur 20: Aantal mannelijke bunzingen met residuen opgedeeld in klasse per 200 ng/g (blauwe staven), dieren zonder residuen weergegeven als groene staaf.

5.2.1.1 Berekenen van de lichaamsconditie

Om de lichaamsconditie te bepalen, fitten we eerst een niet-lineaire regressie van de vorm $Y = aX^b$, waarbij Y het gewicht is en X de lengte (Elmeros et al. 2011, Mc Donald et al. 1998). Als lengte X gebruikten we de kop-romp lengte (GrKopRomp), voor het gewicht Y gebruikten we het ontweid gewicht (GrGewOntw). Op deze manier bekommen we schattingen voor a en b , die werden gebruikt om voor elk dier de lichaamsconditie te berekenen als $BC = \frac{Y}{aX^b}$. Deze niet-lineaire relatie tussen lengte en gewicht stellen we voor in figuur 21.



Figuur 21: Niet-lineair verband tussen lengte en gewicht. De functie $Y=0.366X^{2.157}$ gebruikten we om de lichaamsconditie van de dieren te berekenen.

5.2.1.2 Analyse van de relatie tussen de residu-concentraties in de lever en de conditievariabelen

Voor de continue conditievariabelen lichaamsconditie (BC) en mesenteriaal vet (VetMes) voerden we 2 types analyses uit.

1. Enerzijds analyseren we het effect van de intoxicatiegraad, als binaire variabele, gedefinieerd als < 200 of ≥ 200 , op de beide conditievariabelen. Dit met behulp van t-test voor het vergelijken van 2 gemiddeldes. Dit komt telkens neer op het beantwoorden van de vraag of de gemiddelde conditie van de bunzings verschilt tussen dieren met een lage graad van intoxicatie (< 200) en een hoge graad van intoxicatie (≥ 200).
2. Anderzijds beschouwen we graad van intoxicatie als een continue variabele, en voeren we een lineaire regressie uit die nagaat of er een lineair verband bestaat tussen graad van intoxicatie en de beide continue conditievariabelen.

Voor de categorische conditievariabelen niervet (VetNier) en onderhuids vet (VetOnd) voerden we eveneens 2 types analyses uit.

1. Enerzijds negeerden we de volgorde in de mogelijke waarden voor VetNier en VetOnd en testen we enkel of deze variabelen onafhankelijk zijn van de intoxicatiegraad (uitgedrukt als 0/1 variabele) m.b.v. een Fisher-exact test.
2. Anderzijds gebruiken we de extra informatie weinig<matig<veel voor beide variabelen, en voerden we een ordinale regressie uit, waarbij we de continue graad van intoxicatie als de verklarende variabele gebruiken.

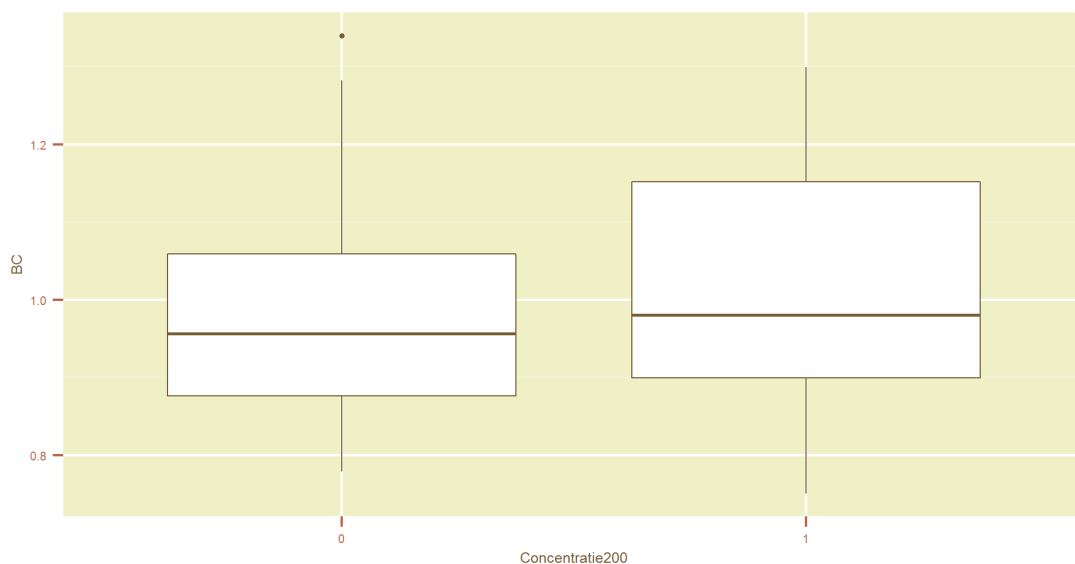
Alle statistische analyses werden met het softwarepakket R⁸ versie 3.0 of later uitgevoerd.

⁸ R Core Team (2015). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>

5.2.2 Resultaten

5.2.2.1 *Lichaamsconditie*

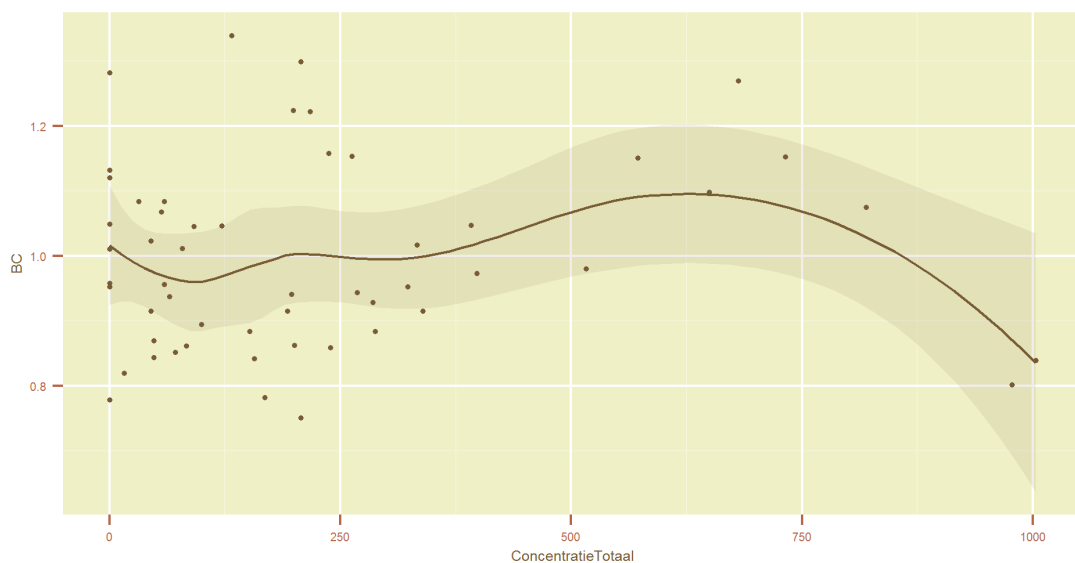
5.2.2.1.1 Graad van intoxicatie als < 200 of ≥ 200



Figuur 22: Boxplots van de bodyconditie voor mannelijke bunzings met residu levels minder dan 200ng/g (0) en meer dan of gelijk aan 200ng/g (1).

De t-test bevestigde het vermoeden, afgaande op de grafische voorstelling, dat er geen significant verschil is in lichaamsconditie tussen dieren met lage en hoge graad van intoxicatie (p-waarde = 0,46).

5.2.2.1.2 Graad van intoxicatie als continue variabele



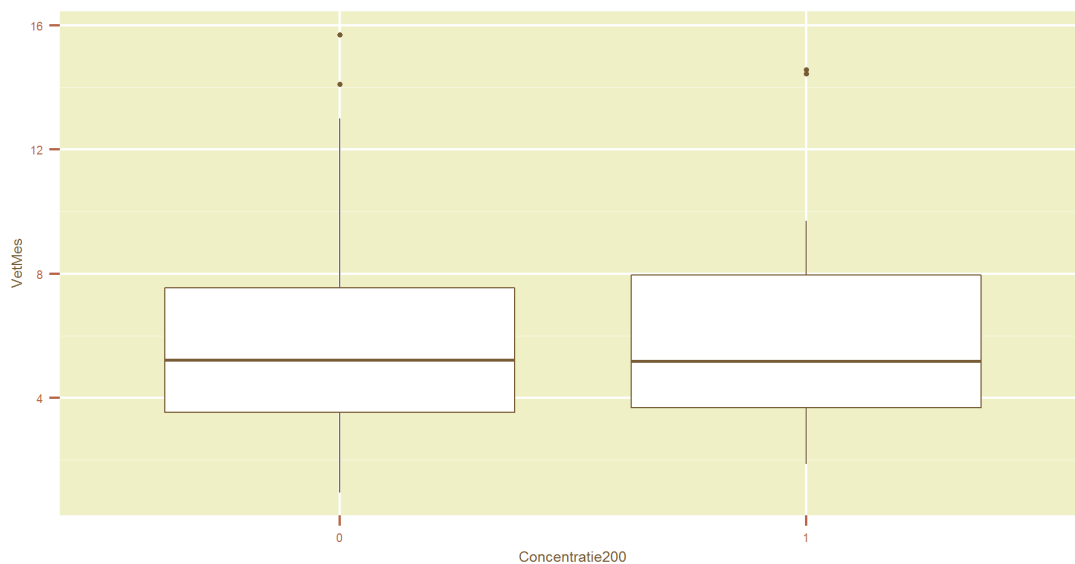
Figuur 23: Verband tussen lichaamsconditie (BC) en residuconcentratie (ng/g)

Een eerste grafische verkenning van de bodyconditie versus graad van intoxicatie laat vermoeden dat er geen lineair verband is tussen beide variabelen. Het lineaire

regressiemodel toont dan ook aan dat er geen significant effect is van de teruggevonden totale concentratie AC-residuen en de lichaamsconditie van de adulte bunzigen (p-waarde = 0,72).

5.2.2.2 Mesenteriaal vet

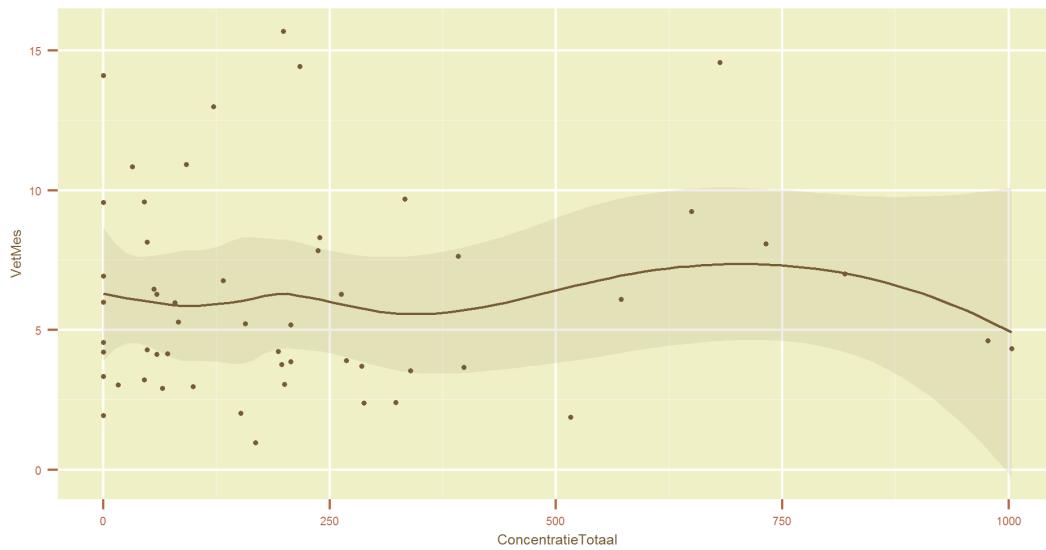
5.2.2.2.1 Graad van intoxicatie als < 200 of ≥ 200



Figuur 24: Boxplots van mesenteriaal vet voor mannelijke bunzings met residu levels met minder dan 200ng/g (0) en meer dan of gelijk aan 200ng/g (1).

Een eerste grafische verkenning van het mesenteriaal vet voor lage en hoge intoxicatie laat vermoeden dat er geen verschil is tussen beide groepen. Elke analyse bevestigt het vermoeden dat er geen significant verschil is in mesenteriaal vet tussen dieren met lage en hoge graad van intoxicatie (p-waarde = 0,99).

5.2.2.2.2 Graad van intoxicatie als continue variabele



Figuur 25: Verband mesenteriaal vet en residuconcentratie

Grafisch zagen we geen lineair verband tussen beide variabelen. Het lineaire regressiemodel bevestigde het vermoeden dat er geen lineaire relatie bestaat tussen mesenteriaal vet en intoxicatie (p -waarde = 0,75).

5.2.2.3 *Niervet*

5.2.2.3.1 Onafhankelijkheid

De Fisher's exact test geeft aan dat niervet en graad van intoxicatie onafhankelijk zijn van mekaar (p -waarde = 1).

5.2.2.3.2 Ordinale regressie

Ook via een ordinale regressie kunnen we geen significant verband aantonen tussen niervet en graad van intoxicatie (p -waarde = 0,72).

5.2.2.4 *Onderhuids vet*

5.2.2.4.1 Onafhankelijkheid

De Fisher's exact test leert ons dat onderhuids vet en graad van intoxicatie onafhankelijk zijn van mekaar (p -waarde = 0,2749).

5.2.2.4.2 Ordinale regressie

Ook via een ordinale regressie kunnen we geen significant verband aantonen tussen onderhuids vet en graad van intoxicatie (p -waarde = 0,81).

5.2.3 Conclusies

Alle uitgevoerde testen geven aan dat er voor geen enkele van de vooropgestelde conditievariabelen een significant effect van de intoxicatiegraad (binair of continu) op de conditievariabelen gevonden werd.

De tweede onderzoekshypothese dat er een effect van de intoxicatiegraad op de conditieparameters is kan aan de hand van deze (beperkte) dataset niet aangetoond worden.

6 Algemeen besluit, discussie en betekenis voor het beheer en beleid

6.1 Conclusies

- Op levers van 150 bunzings en 75 steenmarters, vooral verkeerslachtoffers van de periode 2006 tot 2012, werd een toxicologische analyse uitgevoerd naar de aanwezigheid van 8 verschillende rodenticiden residuen: warfarine, coumatetralyl, chloorfacinon, bromadiolone, difenacoum, brodifacoum, flocoumafen en difethialon.
- In totaal werden bij 116 bunzingen (77%) en 61 steenmarters (81%) residuen van AC teruggevonden. Dit percentage ligt duidelijk hoger dan vastgesteld in een onderzoek in het Verenigd Koninkrijk op basis van 100 bunzings verzameld in de jaren '90. Van deze dieren vertoonde 30% residuen van rodenticiden in de lever (Shore et al. 2003). Een onderzoek in Denemarken (Elmeros et al. 2011) daarentegen rapporteerde hogere percentages bij kleine marterachtigen dan deze gevonden in ons onderzoek. 97% van de in die studie onderzochte hermelijnen en 95% van de wezels, hoofdzakelijk daterend van 2000 tot 2003, vertoonden residuen van AC in de lever.
- De hoogst teruggevonden som van residuen in onze studie bedroeg bij bunzing 3,813 µg/g en bij steenmarter 1,370 µg/g. Bij 42% van de dieren werd een residuconcentratie hoger dan 0,2 µg/g of 200 ng/g teruggevonden, d.i. een drempelwaarde waarboven volgens meerdere auteurs negatieve effecten kunnen spelen. Bij bunzing was dit 38% van de onderzochte dieren en bij steenmarter 54%.
- Via een regressiemodel gingen we na of seizoen, geslacht of diersoort de waargenomen variatie in de graad van intoxicatie konden verklaren. Het model met zowel de factoren seizoen, soorten en de interactie tussen seizoen en diersoort werd weerhouden. Dit wil zeggen dat er wel een gecombineerd effect van soort en seizoen gevonden werd, maar dat de bijdrage van deze twee factoren niet uit elkaar gehaald kon worden. Wanneer de analyse herhaald werd op de dataset van enkel de bunzings – ten einde de interactie met de factor soort uit te sluiten – kon ook voor de factor seizoen geen significante relatie met de graad van intoxicatie aangetoond worden.
- Als tweede hypothese werd gesteld dat de intoxicatiegraad een effect heeft op de lichaamsconditie van de geïntoxiceerde dieren. Om deze hypothese te testen werd er gewerkt met een subset van enkel de mannelijke adulte bunzings gevonden in de lente. Op deze manier konden mogelijke interacties met seizoen, soort of geslacht uit de analyse gelaten worden. Voor deze subset kon geen relatie vastgesteld worden tussen de intoxicatiegraad (noch uitgedrukt als binaire, noch als continue onafhankelijke variabele) en de verschillende de conditievariabelen: lichaamsconditie (uitgedrukt als relatie tussen lichaamsgewicht en -lengte), mesenteriaal vet, niervet en onderhuidsvet.
- De beperkte dataset resulteert na opsplitsing naar soort, seizoen en geslacht in zeer kleine subsets waarbij bovendien het aantal steekproefdieren in elk van deze combinaties sterk verschilt. Hierdoor wordt het testen van de significantie van de relatie tussen soort, seizoen en geslacht met intoxicatiegraad bemoeilijkt. De gebruikte statistische technieken voor de graad van intoxicatie als continue respons veronderstellen ook nog dat de gegevens normaal verdeeld zijn, waaraan door het relatief grote aantal steekproefdieren waar geen AC-residuen in waargenomen werd, niet voldaan is (figuur 17). De zogenaamde zero-inflated modellen, die overweg kunnen met een overvloed aan nul-waarnemingen, zijn echter niet beschikbaar voor continue gegevens, en kunnen in deze context niet gebruikt worden. We moeten ons er dus van bewust zijn dat de bekomen resultaten een vertekend beeld kunnen geven door het negeren van deze modelvoorwaarde.

6.2 Discussie

McDonald et al. (1998) vonden eerder reeds geen significant verschil tussen de lichaamsconditie van hermelijnen met of zonder leverresiduen. Elmeros et al. (2011) stelden bij wezel en hermelijn in Denemarken echter wel een negatieve correlatie vast tussen graad van intoxicatie en lichaamsconditie, al geven ze aan dat dit vooral bepaald werd door een beperkt aantal dieren met een hoge graad van intoxicatie en een zeer slechte bodyconditie.

In onze analyses werd er geen verband gevonden tussen residuconcentratie en de conditievariabelen. Heeft dit te betekenen dat er geen effecten zijn op de relatieve fitness van dieren die teruggevonden werden met residuen in de lever of dat er geen risico op intoxicatie bestaat? In sommige gevallen zouden we kunnen vermoeden dat er wel een effect is, doordat bijvoorbeeld door een gebrek aan eetlust (Littin et al. 2000) de lichaamsconditie achteruitgaat. Anderzijds bestaat de kans dat hoewel AC als traag werkend beschouwd worden en leiden tot sterfte na gemiddeld 4 à 6 dagen, ze wel resulteren in een acute vergiftiging (Berny 2007), waardoor effecten op lichaamsconditie mogelijk tijdig niet tot uiting kunnen komen. Berny et al. (1997) gaven aan dat er vóór het ontstaan van bloedingen door intoxicatie zich geen andere klinische symptomen voordoen, waardoor we niet kunnen uitsluiten dat de residuen die we terugvonden geen effect hadden op de overlevingskans van het dier. Bovendien kunnen dieren, ook al sterven ze niet rechtstreeks door blootstelling aan een AC intoxicatie, een verhoogde gevoeligheid hebben om aan andere doodsoorzaken te sterven, zoals verkeersslachtoffer en predatie (Shore et al. 2003, Fournier-Chambrillon et al. 2004).

Het verband tussen AC residuen in de lever en eventuele kans op ziekte of sterfte is complex. Eerst en vooral zitten we met een verschillende diersoortgevoeligheid. Sommige diersoorten verdragen hogere dosissen dan andere. Zo zijn bijvoorbeeld ratten vrij gevoelig aan AC, terwijl herkauwers minder gevoelig zijn (Berny 2007). Hoewel alle AC een vergelijkbaar werkingsmechanisme hebben, kan een bepaalde diersoort bepaalde AC mogelijk toch beter verdragen dan andere. Zo is een hond in vergelijking met andere dieren relatief minder gevoelig aan bromadiolone (LD50 10mg/kg) dan aan flocoumafen (LD50 0,075-0,25 mg/kg) (www.inchem.org⁹). Van een aantal doel- en proefdieren is de LD50 van de verschillende gangbare AC ooit wel getest en gekend, maar voor veel wilde dieren, en in concreto voor bunzing en steenmarter is deze niet gekend. Door deze diersoortspecifieke eigenschappen kunnen we gekende gegevens uit de literatuur van de ene diersoort niet naar de andere diersoort extrapoleren – laat staan dat we op basis hiervan de leverconcentraties zouden kennen tot dewelke dergelijke dosissen zouden leiden.

Globaal gezien en bij een voldoende hoge dosering hebben de verschillende AC een gelijkaardig effect, maar dit berust niet altijd op dezelfde farmacokinetiek. Het best gekend is het verschil tussen eerste (warfarine, chloorfacinon, coumatetralyl) en tweede generatie producten (bromadiolone, difenacoum, brodifacoum, flocoumafen, difethialon) die door hun verhoogde lipofiliteit en eliminatiehalfwaardetijd langer in het lichaam aanwezig blijven en hierdoor toxischer zijn (Kerins et al 2001). We zien daarenboven ook binnen de tweede generatie producten verschillen in farmacokinetiek. Zo hebben difenacoum en brodifacoum bij konijnen weliswaar een vergelijkbare halfwaardetijd, echter met een totaal verschillende plasma klaring¹⁰ en distributievolume¹¹, waardoor beide producten zich verschillend in het lichaam gedragen (Breckenridge et al. 1985). De residuen die wij terugvonden in de lever waren vaak een cocktail van verschillende AC. Ook al vermoedt men dat deze een zelfde

⁹ <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc175.htm>

¹⁰ De klaring van een actieve stof is een maat voor de eliminatiecapaciteit van het lichaam en kan worden gedefinieerd als het volume plasma dat per tijdseenheid volledig wordt geklaard van de actieve stof (in l/uur of l/uur/kg).

¹¹ Het distributievolumme is een maat voor de verdeling van de actieve stof in het lichaam en bestaat uit de verhouding van de hoeveelheid geneesmiddel in het lichaam en de plasmaconcentratie. Het distributievolumme wordt 'schijnbaar' of 'fictief' genoemd, omdat het geen werkelijk volume is.

bindingsplaats hebben in de lever, dan sluit dit niet uit dat deze residuen onderling bijvoorbeeld geen versterkend effect hebben, mogelijk geïnduceerd door een verschillende affiniteit voor deze bindingsplaats (Parmar et al. 1987). Daarenboven is het geweten dat herhaalde opname van AC of een eerdere opname het effect kan versterken (cf. supra), en herhaling van opname is zeker een feit als we verschillende AC residuen terugvinden.

Dowding et al. (1999) bestudeerden na een bestrijding van bruine rat, huismuis en konijn met brodifacoum op een eiland in Nieuw-Zeeland het effect van secundaire intoxicatie bij verwilderde huiskatten. Een aantal katten die 9 maanden na de bestrijdingsactie werd gevangen had dezelfde brodifacoum concentratie in de lever als katten die tijdens de bestrijding stierven ten gevolge van secundaire intoxicatie (0,98 en 1,38 µg/g). De dieren hadden dus een vergelijkbare residuconcentratie maar blijkbaar wel met een verschillende overlevingskans tot gevolg. Ze opperden dat de blootstelling aan meerdere kleine dosissen leidde tot tolerantie aan de aldus opgebouwde residu levels, die echter wel dodelijk zouden zijn als ze het gevolg waren van een enkele opname. Op het eerste zicht lijkt dit tegenstrijdig met het voorgaande waar de herhalingen het effect van de intoxicatie versterken. De hypothese van Dowding et al. vertrekt evenwel van een vastgestelde gelijke residuconcentratie in de lever, en stelt dat er een verschil is naargelang de opbouw van deze concentratie – via een eenmalige hoge dosis dan wel via herhaalde kleine dosissen. In het laatste geval leiden de herhalingen precies tot een verminderde kans op intoxicatie.

Voor hogere dosissen dan de LD50 van brodifacoum toonde Fisher (2009) aan dat er een lineaire relatie bestaat tussen de opgenomen dosis actieve stof en de teruggevonden leverconcentratie. Het is niet duidelijk of er voor lagere doses ook een dergelijke verband bestaat. Dit zou ons mee in staat kunnen stellen om een beter inzicht te verwerven in de relatie tussen residu en mortaliteit.

Lund en Rasmussen (1986) stellen dat steenmarters nagenoeg ongevoelig zijn voor secundaire intoxicatie. In hun proefopzet waarbij ze 4 steenmarters voedden met grote bosmuizen (*Apodemus flavicollis*) die giftig lokaas hadden gekregen, gingen ze ervan uit dat alle gifstof die door de muizen was opgenomen ook ter beschikking kwam van de steenmarters. Dit is evenwel onterecht als men weet dat bromadiolone voor een groot deel (75%) na korte tijd onveranderd wordt uitgescheiden (Poché 1988).

Bij een toxicologisch onderzoek naar secundaire intoxicatie bij fretten kwamen Goldade et al. (2001) tot het besluit dat een lokaas van hondenvoer en difethialon 750 mg/kg moet bevatten om aan de LD50 te komen. Zelf gaven ze aan dat de proefopzet mogelijk met te weinig fretten (n=2) per dosis was opgezet om een sluitende conclusie te trekken, en dat ze bijvoorbeeld ook reeds bij 200 mg/kg 100% sterfte hadden. Ze besluiten echter wel dat fretten en dus ook bunzing weinig risico lopen op secundaire intoxicatie. Ook Fisher et al. (1991) stellen dit nadat ze 6 fretten elk 3 prairiehonden voederden die zelf gestorven waren na opname van bromadiolone lokaas (25 mg/kg) gedurende 3 dagen. De fretten hadden na 30 dagen 0,2 tot 0,4 µg/g bromadiolone residu in hun levers, de prairiehonden hadden concentraties van 1,3 tot 1,7 ppm in hun lever. In een eerdere gelijkaardige studie vonden Fisher & Timm (1987) daarentegen voor fretten gevoederd met 4 chloorfacinon-geïntoxiceerde prairiehonden (4 dagen lokaas met 25 mg/kg) wel een risico op secundaire intoxicatie: 5 van de 6 fretten stierven immers na de opname. De onderzochte leverresiduen werden echter niet gerapporteerd. Bovendien is het steeds verraderlijk om laboratoriumstudies te extrapoleren naar situaties in het veld. In het laboratorium worden de dieren doorgaans individueel gehuisvest met een beperkte bewegingsvrijheid. Het is te verwachten dat veldomstandigheden het risico op ernstige verbloedingen verhogen en zo dus ook de toxiciteit van AC rodenticiden (Sage et al. 2008).

We besluiten dat er heel wat factoren zijn zoals diersoort, éénmalige opname versus herhaalde opname, dosis, type AC, verschil in vivo en in vitro testen of labo- en veldomstandigheden die van belang zijn bij de interpretatie van het effect van teruggevonden AC leverresiduen. Uit de vermelde onderzoeken is gebleken dat lagere

leverconcentraties soms aanleiding kunnen geven tot mortaliteit, terwijl dit niet zo bleek te zijn voor een aantal hogere concentraties. Dit resulteert er in dat er een overlap is tussen de laagste lethale en hoogste sub-lethale residuconcentratie in de lever (Fisher 2010).

Er is dus meer specifiek onderzoek nodig om de relatie tussen teruggevonden leverresiduen en de impact op het individuele dier te onderzoeken. Dit kan gebeuren door monitoring van AC residuen in wilde dieren, analoog aan dit onderzoek, maar dan op een grotere schaal om zo, over voldoende gegevens te beschikken en tot betere inzichten te komen. Anderzijds kunnen ook weloverwogen laboratorium studies met bijvoorbeeld fretten helpen om deze onduidelijkheid uit te klaren.

Voor het mogelijke effect op populatieniveau kijken we naar de ecotoxicologische risicoanalyse van Rattner et al. (2014). Zij gaven aan dat secundaire intoxicatie door rodenticiden minder van belang is in populaties die het goed doen. Echter in populaties die in lagere dichtheden voorkomen kan een dergelijke intoxicatie de spreekwoordelijke druppel zijn die de emmer doet overlopen en ertoe leiden dat het voortbestaan van de populatie bedreigd wordt. Vertalen we dit naar de Vlaamse context waarbij we weten dat de steenmarterpopulatie in opmars is en de bunzingpopulatie achteruitgaat, dan kunnen we stellen dat het effect op de steenmarterpopulatie vermoedelijk gering is maar dat dit voor de bunzingpopulatie wel kritiek zou kunnen zijn en dat de populatie zich mogelijk in een negatieve spiraal bevindt. Een verschil in intoxicatiegraad tussen beide soorten – als testhypothese geformuleerd in relatie tot het gekende verschil in populatietrend tussen bunzing en steenmarter - werd echter niet gevonden in dit onderzoek (hypothese 1).

6.3 Secundaire intoxicatie en de bestrijding van bruine rat in de praktijk

Het gebruik van rodenticiden valt zowel onder de wetgeving betreffende de biociden (Europese verordening (EU) 528/2012¹², vervangt Europese richtlijn 98/8/EC¹³) als betreffende de gewasbeschermingsmiddelen (Europese richtlijn 91/414/EEG¹⁴). Als gewasbeschermingsmiddel zijn slechts bromadiolone en difenacoum erkend.

Volgens de biocidenwetgeving zijn er beperkingen in het gebruik van een aantal tweede generatie producten zoals brodifacoum, flocoumafen en difethialon. Deze producten mogen niet buitenshuis gebruikt worden. Het valt in onze studie echter op dat er ook behoorlijk wat residuen zijn teruggevonden van deze AC. Zo zien we dat voor flocoumafen, brodifacoum en difethialon respectievelijk 19, 48 en 28% van de bunzingen en 19, 40 en 55% steenmarters residuen in de lever hadden. Dit verschilt niet, tenzij voor flocoumafen, van het percentage dieren met bromadiolone (bunzing 31%, steenmarter 35%) of difenacoum residuen (bunzing 51%, steenmarter 41%). Het is geweten dat bunzing zich vaak ophoudt in stallingen, vooral in de winter, waardoor deze soort zich kwetsbaar opstelt voor de blootstelling aan rodenticiden en secundaire intoxicatie (Birks 1998, Shore et al. 1999). Voor de steenmarter geldt dit in hogere mate gezien het een uitgesproken cultuurvolger is die het jaarrond gebruik maakt van gebouwen als dagrustplaats (Van Den Berge & Gouwy 2012). Het lijkt dus dat restrictie tot binnenshuis gebruik om secundaire intoxicatie te vermijden zijn doel dus deels voorbij schiet. Al kunnen de resultaten mogelijk beïnvloed zijn door het onoordeelkundig gebruik van rodenticiden door bepaalde gebruikers, die zich niet houden aan de opgelegde restricties tot binnenshuis gebruik.

¹² Europese verordening (EU) nr.528/2012 van het Europees parlement en de raad Van 22 mei 2012 betreffende het op de markt aanbieden en het gebruik van biociden.

¹³ Europese richtlijn 98/8/EG van het Europees parlement en de raad van 16 februari 1998 betreffende het op de markt brengen van biociden.

¹⁴ Europese richtlijn 91/414/EEG van de Raad van 15 juli 1991 betreffende het op de markt brengen van gewasbeschermingsmiddelen.

Resistentie bij de bruine rat tegen AC rodenticiden lag aan de basis van de ontwikkeling van de krachtiger tweede generatie AC rodenticiden (Buckle & Smith 1996). Daarnaast zien we ook dat resistente ratten na opname van vergif langer in de omgeving aanwezig kunnen zijn (Atterbey et al. 2005, Vein et al. 2013) en daardoor het risico op secundaire intoxicatie verhogen. Dit geldt zeker voor producten waartegen ze resistent zijn. Daarom is het aangewezen de evolutie van resistentie tegen AC in Vlaanderen te blijven opvolgen en de dieren met een aangepast rodenticide te bestrijden. Actueel bedraagt het percentage resistente ratten ongeveer 30% (Baert et al. 2012a).

Het overgrote deel van de resistente bruine ratten zijn drager van de mutatie Y139F in het VKORC1-gen, wat aanleiding geeft tot resistentie tegen bromadiolone (Pelz et al. 2005, Baert et al. 2012a, Baert et al. 2012b). Slechts een beperkt aantal van de gescreende ratten zijn resistent tegen difenacoum, wat tot hertoe de beste keuze is van AC om resistente ratten in Vlaanderen buitenshuis te bestrijden. Zou resistentie hiertegen echter ook toenemen dan valt het te overwegen om producten zoals brodifacoum, die voorlopig niet geregistreerd zijn voor buitengebruik, aan te wenden, mits overeenkomstige aanpassing van de betreffende regelgeving. Het gebruik van rodenticiden waardoor de ratten niet sterven moet immers vermeden worden om het risico op secundaire intoxicatie te beperken (Daniells et al. 2011).

Mogelijke maatregelen om het risico op secundaire intoxicatie te verminderen zijn (Laakso et al. 2010):

- gebruik rodenticiden beperken tot in en rond gebouwen of enkel binnenshuis
- bepaalde kleuren van lokaas worden vooral door vogels minder goed opgenomen, wat de kans op primaire intoxicatie vermindert
- gebruik van stofvrije lokazen, om verspreiding in het milieu tegen te gaan
- lokaas afgeschermd uitleggen in lokaasposten, waarin het dan ook nog eens verankerd is
- dode dieren na een bestrijdingsactie opsporen en verwijderen
- actieve bestrijding waarbij de hoeveelheid rodenticiden aangepast zijn aan de bestrijdingssituatie en het aantal te bestrijden dieren
- bestrijdingscampagnes strikt beperken in de tijd
- bestrijden met eerste generatie producten indien geen resistentie aanwezig
- residu-monitoring programma

Referenties

- Alterio N. (1996) Secondary poisoning of stoats (*Mustela erminea*), feral ferrets (*Mustela furo*), and feral house cats (*Felis catus*) by the anticoagulant poison, brodifacoum. *New Zealand Journal of Zoology*, 23: 331-338.
- Alterio N., Brown K., Moller H. (1997) Secondary poisoning of mustelids in a New Zealand Nothofagus forest. *Journal of Zoology*, 243: 863-869.
- Atterby H., Kerins G., MacNicoll A. (2005) Whole-carcass residues of the rodenticide difenacoum in anticoagulant-resistant and -susceptible rat strains (*Rattus norvegicus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24: 318-323.
- Baert K., Stuyck J., Breyne P., Jansen I., Pieters S. (2012a) Bestrijding van de bruine rat in Vlaanderen – resistentie tegen rodenticiden. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel, 69 pp.
- Baert K., Stuyck J., Breyne P., Maes D., Casaer J. (2012b) Distribution of anticoagulant resistance in the brown rat in Belgium. *Belgian Journal of Zoology*, 142: 39-48.
- Berny P., Buronfosse T., Buronfosse F., Lamarque F., Lorgue G. (1997) Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere*, 35: 1817-1829.
- Berny P. (2007) Pesticides and the intoxication of wild animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30: 93-100.
- Berny P., Esther A., Jacob J., Prescott C. (2014) Risk mitigation measures for anticoagulant rodenticides. Contract n° 07-0307/2012/638259/ETU/D3.
- Birks J. (1998) Secondary rodenticide poisoning risk arising from winter farmyard use by the European polecat (*Mustela putorius*). *Biological Conservation*, 85: 233-240.
- Brakes C., Smith R. (2005) Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. *Journal of Applied Ecology*, 42: 118-128.
- Breckenridge A., Cholerton S., Hart J., Park B., Scott A. (1985) A study of the relationship between the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of the 4-hydroxycoumarin anticoagulants warfarin, difenacoum and brodifacoum in the rabbit. *British Journal of Pharmacology*, 84: 81-91.
- Buckle A. (1996) Rodent control methods: chemical. In: Buckle A., Smith R. (eds) *Rodent Pests and Their Control*, CAB International, Wallingford, 127-160.
- Cox P., Smith R. (1992) Rodenticide ecotoxicology: pre-lethal effects of anticoagulants on rat behaviour. *Proceedings of the Fifteenth Vertebrate Pest Conference*, Newport Beach, 1992. University of California, Davis, 165-170.
- Cranenburg E., Schurgers L., Vermeer C. (2007) Vitamin K: the coagulation vitamin that became omnipotent. *Thrombosis and Haemostasis*, 98: 120-125.
- Daniells L., Buckle A., Prescott, C. (2011) Resistance as a factor in environmental exposure of anticoagulant rodenticides - a modelling approach. In: Jens Jacob, Alexandra Esther (Editors) 8th European Vertebrate Pest Management Conference, Berlin, Germany, 26-30 September 2011 Book of Abstracts.

- Dowding J., Murphy E., Veitch C. (1999) Brodifacoum residues in target and non-target species following an aerial poisoning operation on Motuihe Island, Hauraki Gulf, New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology*, 23: 207-214.
- Dowding, C., Shore, R., Worgan A., Baker P., Harris S. (2010) Accumulation of anticoagulant rodenticides in a non-target insectivore, the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Environmental Pollution*, 158: 161-166.
- Elmeros M., Christensen T. and Lassen P. (2011) Concentrations of anticoagulant rodenticides in stoats (*Mustela ermine*) and weasels (*Mustela nivalis*) from Denmark. *Science of the Total Environment*, 409: 2373-2378.
- Erickson, W. and Urban, D. (2004) Potential Risk of Nine Rodenticides to Birds and Mammals: A Comparative Approach. Washington DC, United States Environmental Protection Agency, 225pp.
- Fisher D., Timm R. (1987) Laboratory trial of chlorophacinone as a prairie dog toxicant. Great Plains Wildlife Damage Control Workshop Proceedings, Paper 65.
- Fisher D.D., Timm R.M., Poche R., Hygnstrom S.E. (1991) Laboratory study on bromadiolone: effectiveness on prairie dogs and secondary hazards to domestic ferrets. Great Plains Wildlife Damage Control Workshop Proceedings, Paper 23.
- Fisher (2009) Residual Concentrations and Persistence of the Anticoagulant Rodenticides Brodifacoum and Diphacinone in Fauna. Phd thesis, Lincoln University, New Zealand, 155pp
- Fisher P. (2010) Environmental fate and residual persistence of brodifacoum in wildlife. Landcare Research Contract Report: LC 57, 20pp.
- FOD Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu (2012) De biocidenmarkt in België 2011.
- Fournier-Chambrillon C., Berny P., Coiffier O., Barbedienne P., Dasse' B., Delas G., Galineau H., Mazet A., Pouzenc P., Rosoux R. & Fournier P. (2004) Evidence of secondary poisoning of free-ranging riparian mustelids by anticoagulant rodenticides in France: implications for conservation of European mink (*Mustela lutreola*). *Journal of Wildlife Diseases*, 40: 688-695.
- Geduhn A. , Esthera A. , Schenke D., Mattes H., Jacob J. (2014) Spatial and temporal exposure patterns in non-target small mammals during brodifacoum rat control. *Science of The Total Environment*, 496: 328-338
- Giraudoux P., Tremollières C., Barbier B., Defaut R., Rieffel D., Bernard N., Lucot E., Berny P. (2006) Persistence of bromadiolone anticoagulant rodenticide in *Arvicola terrestris* populations after field control. *Environmental research*, 102: 291-298.
- Goldade, D., Savarie P., Hurley J., Gaddis S., Johnson J. (2001) Design of a laboratory secondary hazard study. 146-156. In: Johnston J. (ed.), *Pesticides and Wildlife*. American Chemical Society Symposium Series 771.
- Grolleau G., Lorgue G., Nahas K. (1989) Toxicité secondaire, en laboratoire, d'un rodenticide anticoagulant (bromadiolone) pour des prédateurs de rongeurs champêtres: buse variable (*Buteo buteo*) et hermine (*Mustela erminea*). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 19: 633-48.

- Howald G. (1997) The risk of non-target species poisoning from brodifacoum used to eradicate rats from Langara Island, British Columbia, Canada. Master thesis, The University of British Columbia, Vancouver, Canada, 159pp.
- Huckle K., Hutson D., Warbur-ton P. (1988) Elimination and accumulation of the rodenticide flocoumafen in rats following repeated oral administration. *Xenobiotica*, 18: 1465-1479.
- Huckle K., Hutson D., Logan C., Morrison B., Warburton P. (1989) The fate of the rodenticide flocoumafen in the rat – retention and elimination of a single oral dose. *Pesticide Science*, 25: 297-312.
- Jacob J., Endepols S., Pelz HJ, Kampling E., Cooper T., Yeung C., Redmann K., Schlatt S. (2012) Vitamin K requirement and reproduction in bromadiolone-resistant Norway rats. *Pest management science*, 68: 378-385.
- Kamil N. (1987) Kinetics of bromadiolone, anticoagulant rodenticide, in the Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Pharmacological Research Communications*, 19: 767-775.
- Kaukeinen D. (1982) A review of the secondary poisoning hazard potential to wildlife from the use of anticoagulant rodenticides. *Proceedings Vertebrate Pest Conference*, 10: 151-158.
- Kerins G., Dennis N, Atterby H, Gill J., Macnicoll A. (2001) Distribution of resistance to anticoagulant rodenticides in the Norway rat (*Rattus norvegicus* Berk.) in England 1995-98. In: Pelz H., Cowan D. & Feare C. (eds), *Advances in Vertebrate Pest Management*, Filander Verlag, Fürth, 149-160.
- Kumar D., Saxena Y. (1993) Hepatotoxic effects of bromadiolone (C30 H23 Bro4) in *Rattus (Rattus rufescens)*. *The Journal of animal morphology and physiology*, 40:1-6.
- Laakso S, Suomalainen K, Koivisto S. Literature review on residues of anticoagulant rodenticides in non-target animals. *Nordic Council of Ministers, Copenhagen, TemaNord*: 541.
- Lemus J., Bravo C., García-Montijano M., Palacín C., Ponce C., Magaña M., Alonso J. (2011) Side effects of rodent control on non-target species: Rodenticides increase parasite and pathogen burden in great bustards. *Science of the Total Environment*, 409: 4729-4734.
- Libois R., Waechter A. (1991) La Fouine (*Martes foina*). *Encyclopédie des Carnivores de France n° 10. Société Française pour l’Etude et la Protection des Mammifères, Nort s/Erdre*.
- Littin K., O’Conner C., Eason C. (2000) Comparative effects of Brodifacoum on rats and possums, *Proceedings 53rd Conference of the New Zealand Plant Protection Society Incorporated*, 53: 310-315.
- Louette G., Adriaens D., De Knijf G., Paelinckx D. (2013) Staat van instandhouding (status en trends) habitattypen en soorten van de Habitatrichtlijn (rapportageperiode 2007-2012) – Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2013 (INBO.R.2013.23). *Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel*.
- Lund M. and A.M. Rasmussen. (1986) Secondary poisoning hazards to stone martens (*Martes foina*) fed bromadiolone-poisoned mice. *Nordic Veterinary-Medicine* 38: 241-243.

- Maes D., Baert K., Boers K., Casaer J., Criel D., Crevecoeur L., Dekeukeleire D., Gouwy J., Gyselings R., Haelters J., Herman D., Herremans M., Huysentruyt F., Lefebvre J., Lefevre A., Onkelinx T., Stuyck J., Thomaes A., Van Den Berge K., Vandendriessche B., Verbeylen G. & Vercayie D. (2014) De IUCN Rode Lijst van de zoogdieren in Vlaanderen – Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2014.1828211. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.
- McDonald R., Harris S., Fletcher M., Brown P., Turnbull G. (1998) Anticoagulant rodenticides in stoats (*Mustela erminea*) and weasels (*Mustela nivalis*) in England. *Environmental Pollution*, 103: 17-23.
- Mosterd J., Thijssen H. (1991) The long-term effects of the rodenticide, brodifacoum, on blood coagulation and vitamin K metabolism in rats. *British Journal of Pharmacology*, 104: 531-535.
- Myllymäki A., Pihlava J., Tuuri H. (1999) Predicting the exposure and risk to predators and scavengers associated with using single-dose second-generation anticoagulants against field rodents. In: Cowan D., Feare C. (eds) *Advances in Vertebrate Pest Management* Fürth, Filander, 387-404.
- Newton I., Shore R., Wyllie I., Birks J. (1999) Empirical evidence of side-effects of rodenticides on some predatory birds and mammals. In: Cowan D., Feare C. (eds) *Advances in Vertebrate Pest Management* Fürth, Filander, 347–367.
- Parmar G., Batten, P. (1987) Detection of an Anticoagulant Binding Site in Rat Liver Microsomes and its Relevance to the Anticoagulant Effect. *Human Toxicology*, 6: 432
- Parmar G., Bratt H., Moore R., Batten, P. (1987) Evidence for a common binding site in vivo for the retention of anticoagulants in rat liver. *Human Toxicology*, 6: 431–432
- Pelz H., Rost S., Hunerberg M., Fregin A., Heiberg AC., Baert K., Macnicoll A., Prescott C., Walker A., Oldenburg J., Muller C. (2005) The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*, 170: 1839-1847.
- Poché R. (1988) Rodent tissue residue and secondary hazard studies with bromadiolone. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 18: 323-330.
- Rattner B., Horak K., Lazarus R., Schultz S., Knowles S., Abbo B., Volker S. (2015) Toxicity reference values for chlorophacinone and their application for assessing anticoagulant rodenticide risk to raptors. *Ecotoxicology*, DOI 10.1007/s10646-015-1418-8, published online: 20 January 2015
- Rattner B., Lazarus R., Elliott J., Shore R., van den Brink N. (2014) Adverse outcome pathway and risks of anticoagulant rodenticides to predatory wildlife. *Environmental Science & Technology*, 48: 8433-8445.
- Revathi K., Yogananda M. (2006) Effect of bromadiolone on haematology, liver and kidney in *Mus musculus*. *Journal of Environmental Biology*, 27: 135-140.
- Roger M., Delattre P., Herrenschmidt V. (1988) Le Putois (*Mustela putorius*). *Encyclopédie des Carnivores de France n° 15*. Société Française pour l’Etude et la Protection des Mammifères, Nort s/Erdre.
- Sage, M., Caeurdassier, M., Defaut, R., Gimbert, F., Berny, P. and Giradoux, P. (2008) Kinetics of bromadiolone in rodent populations and implications for predators after

- field control of the water vole, *Arvicola terrestris*. *Science of the Total Environment*, 407: 211-222.
- Shore R., Birks J., Afsar A., Wienburg C., Kitchener, A. (2003) Spatial and temporal analysis of second generation anticoagulant rodenticide residues in polecats (*Mustela putorius*) from throughout their range in Britain, 1992–1999. *Environmental Pollution* 122: 183-193.
 - Shore R., Birks J., Freestone P. (1999) Exposure of non-target vertebrates to second-generation rodenticides in Britain, with particular reference to the polecat (*Mustela putorius*). *New Zealand Journal of Ecology* 23: 199-206.
 - Shore R., Birks J., Freestone P., Kitchener A. (1996) Second-generation rodenticides and polecats (*Mustela putorius*) in Britain. *Environmental Pollution* 91 (3): 279-282.
 - Stuyck J., Verbeylen G., Baert K., Lens B. (2003) Jaarrapport onderzoeksgroep rattenbestrijding. Instituut voor Bosbouw en Wildbeheer.
 - Tie J., Nicchitta C., Von Heijne G., Stafford D. (2005) Membrane Topology Mapping of Vitamin K Epoxide Reductase by in Vitro Translation/Cotranslocation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 16410-16416.
 - Van Bol V. (2012) FOD Volksgezondheid, Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu. Rapport van het Programma voor de Reductie van Pesticiden en Biociden (PRPB) 2005-2012.
 - Van Den Berge K., De Pauw W. (2003) Roofdieren Carnivora, in: Verkem S., De Maeseneer J., Vandendriessche B., Verbeylen G. & Yskout S. (red.) Zoogdieren in Vlaanderen. Ecologie en verspreiding van 1987 tot 2002 – Natuurpunt Studie en JNM-Zoogdierenwerkgroep, Mechelen & Gent, België, 310-313.
 - Van Den Berge K., Gouwy J. (2012a.) Bunzing op de dool ? – *Meander* 10 (2): 4-8.
 - Van Den Berge K., Gouwy J. 2012b. Dagrustplaatsen bij middelgrote roofdieren – *Natuur.focus* 11: 62-73.
 - Van Den Berge K. (2007) Verspreidingsonderzoek marterachtigen. Samenvattend overzicht van opzet, functioneren en basisresultaten van het Marternetwerk – Intern rapport Koninklijk Belgisch Instituut voor Natuurwetenschappen (KBIN) & Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek (INBO), INBO.IR.2007.6, Brussel & Geraardsbergen.
 - Van Den Berge K., Gouwy J., Berlengee F., Vansevenant D. (2012) Populatieontwikkeling van de steenmarter (*Martes foina*) in Vlaanderen in relatie tot schaderisico's. Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel, 103pp
 - Vandenbroucke V., Bousquet-Melou A., De Backer P., Croubels S. (2008a) Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31: 437-445.
 - Vandenbroucke V., Desmet N., De Backer P., Croubels S. (2008b) Multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatography combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 869: 101-110.
 - Vein J., Vey D., Fourel I., Berny P. (2013) Bioaccumulation of chlorophacinone in strains of rats resistant to anticoagulants. *Pest Management Science*, 69: 397-402.