

Análisis de un protocolo basado en la norma USEPA 1.213 para la evaluación regulatoria de la eficacia de las cebaderas en el control seguro de roedores pequeños

Wolansky, M.J.

Laboratorio de Toxicología de Mezclas Químicas, Departamento Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (UBA). Instituto IQUIBICEN, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Resumen: Varios rodenticidas modernos son formulados con compuestos anticoagulantes superwarfarínicos. Debido a su alta toxicidad en humanos, los cebos suelen ser formulados con otros ingredientes destinados a generar respuestas de rechazo en el caso de ingestión accidental o intento de suicidio; aun así, las unidades hospitalarias reportan anualmente numerosos casos de intoxicaciones con rodenticidas. Se han desarrollado cebaderas con el propósito de brindar al usuario alta eficacia y seguridad extendida. Dado que en muchos países existe experiencia limitada para la evaluación regulatoria de cebos combinados con cebaderas, en este trabajo se presenta un protocolo adaptado a partir de la guía USEPA- 1.213/1990, el cual se propone para verificar la aptitud de las cebaderas para controlar roedores en ambientes hogareños, ocupacionales y otros espacios urbanos. Se incluye una discusión de aspectos técnicos que se espera que sean de ayuda para los asesores de las agencias regulatorias intervinientes al interpretar los resultados en términos de eficacia y seguridad. El sistema cebadera-cebo examinado mostró alta letalidad en ratas adultas jóvenes. La inspección, carga y recarga de producto fresco se realizó en forma simple, rápida y segura; sólo excepcionalmente se observó dispersión del cebo fuera de la cebadera. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el sistema que solicita un registro ante la autoridad regulatoria debe ser adecuado a la especie que se busca controlar, considerando las diferencias de peso corporal entre ratas y ratones, entre machos y hembras, y entre animales jóvenes y adultos, lo cual determina la facilidad de ingreso al interior del dispositivo (cebadera) donde se coloca el cebo contenido en su embalaje unitario original.

Palabras claves: Rodenticida; Eficacia; Evaluación; Cebadera; Guía USEPA-1.213

Abstract: *Analysis of a protocol based on the USEPA 1.213 standard for the regulatory evaluation of the efficacy of the bait station system in the safe control of small rodents*

Several modern rodenticides are formulated with anticoagulant superwarfarin compounds. Due to their high toxicity in humans, these baits are usually formulated with other ingredients intended to generate rejection responses in the case of accidental ingestion or suicide attempt. However, hospital units report numerous cases of poisoning with rodenticides every year. Box-like bait stations have been developed to provide the user with high efficacy and extended safety. Given that in many countries there is limited experience for the regulatory consideration of bait stations, this work presents a protocol adapted from the USEPA-1.213/1990 guideline, proposed to verify the aptitude of these devices to control wild rodents in home, work, and other urban spaces. The work includes a discussion of technical issues that are expected to be helpful to advisors of the regulatory agencies involved in interpreting the results in terms of efficacy and safety. The bait-station system examined showed high efficacy in young adult rats. The inspection, loading and reloading of fresh product were carried out in a simple, fast and safe way; bait dispersal outside the station was only rarely observed. However, it must be taken into account that the system that require a registration by the regulatory authority must be appropriate to the species sought to be controlled. This is important due to differences in body weight between rats and mice, between males and females, and between young and aged animals, which determines the ease of entry into the station where the bait contained in its original unitary packaging is placed.

Keywords: Rodenticide; Efficacy; Assessment; Bait station; Guideline USEPA-1.213

Introducción

Las plagas de roedores han sido un problema para la Salud Pública, bienes materiales y el rendimiento productivo desde tiempos bíblicos. Existen registros históricos describiendo la asociación temporal y espacial entre la presencia de poblaciones de ratas y ratones en áreas urbanas y zonas industriales, y enfermedades y epidemias (Piret y Boivin, 2021; Petrie, 2011, reporte original publicado en 1911). Para combatir la presencia urbana o suburbana de estos animales silvestres se han desarrollado distintos métodos de eliminación con un grado variable de eficacia y distintos balances costo-beneficio, que a su vez en las últimas décadas han motivado debates sobre el carácter humano que se asigna a cada uno (GBC-Canadá, 2022; Humane Society, 2022). De los sistemas que utilizan cebos rodenticidas, los que se basan en preparaciones biocidas formuladas con inhibidores de la coagulación sanguínea como ingredientes activos representan la mayor parte del mercado de rodenticidas de uso urbano (hogares, oficinas, hospitales, estaciones de tren, sistema cloacal, puertos, etc.). De éstos, un grupo principal son los formulados con inhibidores de la cascada pro-coagulante de la clase superwarfarínicos (Murphy y Lugo, 2015). Muchos cebos anticoagulantes se comercializan como gránulos y, si bien no poseen volatilidad ni se descomponen rápidamente dejando residuos tóxicos en el ambiente, su apariencia y color puede inducir la ingesta accidental tanto de niños como de animales domésticos. Además, su uso en plantas agroindustriales y establecimientos de expendio de alimentos ocasionalmente puede causar problemas de contaminación de insumos y mesadas de trabajo (AIFS-Australia, 2015), y en algunos casos de dispersión de los gránulos hacia sitios de anidamiento debido a los comportamientos alimentarios típicos de los roedores silvestres (Strubbe y Woods, 2004; BPCA, 2019).

Se dispone de evidencia avanzada sobre la farmacocinética y toxicodinamia de los rodenticidas warfarínicos (Feinstein et al., 2016). El sitio molecular de acción, el camino fisiológico afectado y los efectos asociados al mecanismo de acción en ratas y ratones existen también en humanos (WHO, 1995; D'Silva y Krishna, 2019). En consecuencia, la exposición oral aguda accidental, intencional-suicida o por otras causas a rodenticidas superwarfarínicos puede causar intoxicaciones moderadas o graves, como indican los reportes de unidades de emergencia toxicológica (Feinstein et al., 2016; Isackson e Irizarry, 2022). Disponiendo de un compartimento semicerrado que contenga el cebo (cebadera), que reduzca la posibilidad de contacto con personas o animales de compañía y deje "invisible" la presencia de los gránulos coloreados aparece como un complemento deseable para optimizar la seguridad. Existen documentos de autoridades regulatorias estableciendo los procedimientos que deben seguir las empresas registrantes de productos rodenticidas para documentar la eficacia de los sistemas que se busca comercializar. También para predecir la seguridad (inviolabilidad) en el caso de los dispositivos portadores de dichos cebos bajo condiciones simuladas de uso en poblaciones humanas de adultos e infantes (USEPA, 2022a, 2022b). Sin embargo, no se encuentra en la literatura abierta ninguna consideración crítica de la eficacia de cebos encerrados en su sobre plástico sellado, a su vez retenido en un compartimento interno de la caja-cebadera. En este trabajo se describe una modificación del protocolo USEPA 1.213 (revisión N°11, Diciembre 1990; aun considerado válido según se

*e-mail: mjwolansky@qb.fcen.uba.ar

informa en USEPA, 2022a) con el fin de verificar 1) si el sistema cebadera-cebo mantenía los niveles de eficacia rodenticida que han sido reportados en forma consistente desde hace varias décadas para ese raticida, 2) si alguna característica de la cebadera puede influenciar la actividad biocida y 3) si el hecho de utilizar el sobre de cebo cerrado evita la dispersión del cebo, lo cual sugeriría mayor seguridad en un rango más amplio de condiciones ambientales.

Materiales y Métodos

Propósito

El estudio tuvo como propósito evaluar un protocolo de ensayo en animales de laboratorio para determinar la eficacia de una nueva forma de aplicación de cebos raticidas. El sistema propuesto consistió en el ofrecimiento del cebo encerrado en su embalaje termosellado (unidad de dosificación), colocado en un compartimento interno de la caja cebadera (ver abajo imágenes del dispositivo).

Producto evaluado

El material examinado fue el producto Ultra Plus® de Laboratorio BINKA S.A. (Buenos Aires, Argentina). El mismo se encuentra clasificado y registrado a nivel regulatorio en Argentina como rodenticida, con funcionalidad como raticida de actividad prolongada (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, ANMAT; registro R.N.P.U.D. N° 0250003). Este rodenticida se comercializa en cajas de 30 sobres individuales de 50 g cada uno (1,5 kg total), cada sobre cerrado por termosellado. Las recomendaciones de uso tradicionales de esta presentación del producto instruyen a utilizar un sobre completo como dosis inicial y reponer cebo fresco si la dosis original no fue consumida o si aún se observan roedores. El ingrediente activo (i.a.) de Ultra Plus® es Brodifacoum (en adelante, BFC; sal monosódica). La concentración de BFC (CAS N° 56073-10-0) fue 0,005%, según Certificado de Análisis. Esta droga es clasificada farmacológicamente como anticoagulante warfarínico (EC, 2009).

La matriz orgánica-apetitiva que contiene a BFC consiste en granos de cereales, colorantes y otros aditivos según fórmula patentada. El aspecto del cebo utilizado en este estudio fue granulado grueso (pellet), en forma de granos de cereal (mini-piezas homogéneas de forma tubular, ~1 cm de longitud por ~0,4 cm ϕ), color verde medio-oscuro, olor cercano a neutro. Este tipo de productos rodenticidas generalmente se formulan junto al ingrediente de seguridad benzoato de denatonium, BZD (CAS N° 3734-33-6; ver sinopsis de aspectos toxicológicos en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/19518> y ECHA, 2022), el cual es un agente amargante cuya funcionalidad es provocar rechazo ante la ingesta accidental o delictiva en humanos y animales domésticos. Para todos los experimentos realizados el cebo fue aplicado en su sobre, usando una unidad completa como dosis inicial.

Cebadera

La cebadera examinada, marca ACME mod. R2D2 (ACME, Argentina), se fabrica mediante inyección y moldeo de material plástico (polietileno virgen). Es de color íntegramente negro, con ninguna parte cortante o punzante al tacto, medidas 23 x 12,5 x 7 cm (largo x ancho x alto). La tapa se cierra y abre por medio de un sistema de bisagra por encastre de ambas partes (caja-tapa) (ver Fig. 1A y 1C).

Internamente consiste en 2 cámaras aproximadamente equivalentes en volumen. Una cámara tiene como funcionalidad el tránsito del animal (*in-out*) y la segunda es donde se deposita el sobre de cebo. En el modelo de cebadera utilizado en el estudio, las dimensiones de las aberturas de ingreso/salida permitían el ingreso de ratas adultas jóvenes de hasta 300-350 g de peso, por lo cual se anticipa que también ratas infantiles y adolescentes pueden entrar (Fig. 1B-C). Durante pruebas previas se pudo constatar que al agregar el sobre de cebo a la segunda cámara, debido al espacio que ocupa el mismo, se dificulta el ingreso de una rata adulta a esa sección de la cebadera y se limita el pisoteo y posible diseminación del cebo tóxico hacia el exterior (ver más abajo).

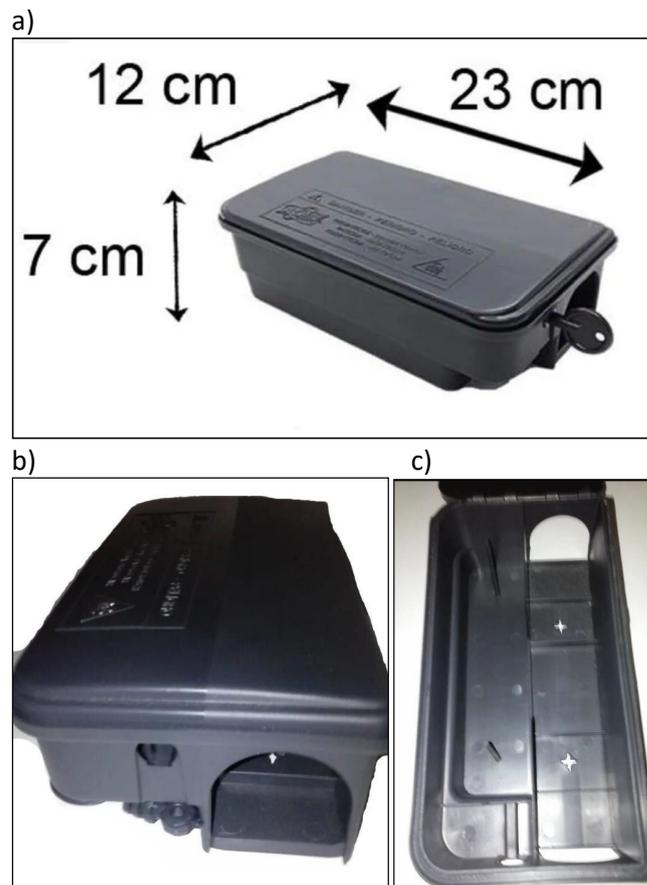


Figura 1. Modelo de cebadera utilizado en el estudio. A - Vista general – Cebadera cerrada. Se observa llave inserta en la cerradura. B – Vista de frente y puerta superior. Se muestra vía de acceso del animal al interior de la cebadera. C - Vista superior – Cebadera abierta (sin cebo). Se pueden ver marcas (cruces), que son puntos para eventual fijación a pisos o paredes mediante tornillos. Nótese la influencia del tamaño de la abertura de ingreso para el ingreso facilitado de los animales en función de la atractabilidad del cebo y el comportamiento exploratorio instintivo de los roedores.

La cebadera se mantiene cerrada por medio de un sistema de cerradura activada por una llave plástica que se opera manualmente por medio de la introducción en la abertura (cerradura) y giro de media vuelta (Fig. 1A-B). Si bien tiene un orificio para anclaje a piso o paredes, en el estudio se dispuso sin fijación dentro de la jaula, apoyada en el lecho de viruta.

Animales

Al momento del ingreso a la sala experimental los animales tenían 7 semanas de vida, para permitir un periodo de aclimatación previo al estudio formal. Al momento de la evaluación, los animales alcanzaron la adultez temprana (8 semanas de vida; DOB Mayo 25, 2022). Se utilizaron ambos sexos de la cepa Sprague-Dawley (8 hembras y 8 machos), provenientes del Bioterio Central, Facultad de Farmacia y Bioquímica (Universidad de Buenos Aires). Al momento del retiro del proveedor, los pesos corporales estuvieron dentro de lo esperable para esa colonia de animales y dentro del rango considerado aceptable para la especie, cepa, sexo y edad incluida en el estudio. El certificado microbiológico patológico mostró resultado negativo para todos los patógenos examinados. Durante la aclimatación, los animales no mostraron ninguna manifestación clínica de enfermedad.

En la sala experimental, los animales se mantuvieron siempre en jaulas de policarbonato translucido de dimensiones (largo x ancho x alto) 482 x 267 x 210 mm, superficie total del piso, 940 cm² (modelo 2154F; Tecniplast, Italia), con viruta de madera de pino como lecho (medio de insulación térmica), y agua de red ofrecida en botellas de vidrio opaco

de 250 mL, con cierre por tapón de goma y pico de acero inoxidable. En todos los casos los animales fueron alimentados con alimento balanceado extrusado de alta proteína para rata/ratón marca Ganave (Grupo Pilar SA, Argentina; vencimiento lote, Julio 2023).

Al ser introducidos en la sala experimental donde se realizó el estudio, y siguiendo las indicaciones del protocolo OPP 1.213 (ver más detalles más adelante), la semana previa al inicio del estudio los animales fueron monitoreados para su consumo de agua, ingesta de alimento y aumento de peso corporal. La diferencia entre las hembras y los machos fue la esperable. La sala experimental fue iluminada con luz artificial, fotoperiodo controlado, luz/oscuridad (ciclo D07:N19) y acondicionamiento de temperatura ambiente (20-25°C).

Protocolo

Se usó como referencia el protocolo recomendado por la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (US Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs), guía 1.213 (última revisión, Febrero de 1990), adaptándolo a la evaluación del dispositivo cebadera y la modalidad de aplicación de interés (sobre de cebo cerrado). Los procedimientos siguieron los lineamientos y recomendaciones técnicas y éticas del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, CICUAL), Universidad de Buenos Aires. La primera fase del estudio consistió en estimar el consumo de agua, alimento y monitorear la actividad dentro de la jaula durante la semana previa al inicio del experimento formal. En base a esos datos, luego se ofreció la ración diaria de alimento junto a la dosis unitaria inicial de cebo (50 g), provocando competencia entre cebo y alimento regular, y se monitoreó los animales de la misma forma que en la semana previa. Además, se observaron la exploración, manipuleo y palatabilidad del cebo (comportamiento apetitivo), estimando el consumo diario y acumulativo de cebo. El consumo del cebo fue calculado como la diferencia de peso entre la masa de cebo remanente en cada día de monitoreo respecto al valor inicial (día D0).

El estudio incluyó animales controles de ambos sexos, con o sin dispositivo cebadera dentro de la jaula; en el primer caso, la cebadera se dispuso sin presencia de cebo (grupos CTLABS, CTLCBD). Las condiciones de alojamiento individual, agua y dieta fueron idénticas a las de los animales tratados con cebo. En las jaulas de los animales tratados se colocaron cebaderas cargadas con el sobre completo del producto rodenticida (grupo TCEBO). Los sobres de cebo se colocaron cerrados, abriendo apenas 2 de sus ángulos con tijeras dejando orificios de ~1 cm en cada uno para facilitar la liberación de estímulos olfatorios y la atractabilidad del cebo en los animales, tratando de evitar la dispersión de los gránulos por fuera de la caja-cebadera, en acuerdo con los lineamientos de seguridad indicados en documentos internacionales (USEPA, 2022a).

Según el protocolo de la guía USEPA 1.213, los animales fueron monitoreados diariamente para detectar tempranamente la aparición de signos de estrés o toxicidad. En correspondencia con las descripciones de las intoxicaciones con drogas superwarfarínicas en rata (Feinstein et al., 2016), los signos clínicos monitoreados fueron los siguientes: disminución de ingesta líquida y sólida, reducción parcial de la locomoción y movilidad vertical, debilidad general, marcha desorganizada o con arrastre de abdomen, postración, ausencia de respuesta a la aproximación del experimentador o estímulos sonoros, baja o nula respuesta al manipuleo, pérdida de peso corporal, hematomas en planta de pies, testículos y bajo uñas, hemorragia a nivel ocular y/o nasal, insuficiencia respiratoria y muerte. Los animales que presentaron signos de toxicidad avanzada se los excluyó del estudio y se procedió a realizar su sacrificio ético. Tanto los animales encontrados muertos como los sacrificados para evitar sufrimiento prolongado se los contabilizó como muertes. Si luego de una semana no se verificaba que el animal haya realizado un consumo toxicológicamente considerable (>2% de dosis inicial) del cebo, se reemplazaba el sobre de cebo por uno nuevo y se continuaba el estudio hasta completar 14 días de monitoreo como indica la guía.

Para casos de rodenticidas anticoagulantes ya registrados que hayan presentado previamente reportes de su caracterización de peligrosidad y riesgos en base a un cuerpo de evidencia concluyente, se sugiere no incluir un grupo tratado sólo con cebo (sin cebadera), en acuerdo con las recomendaciones y lineamientos de las 3Rs en el uso ético de animales de laboratorio en estudios regulatorios (Hubrecht y Carter, 2019). Este fue el caso del rodenticida BFC, cuyas propiedades fisicoquímicas, farmacológicas y toxicológicas son conocidas desde hace varias décadas a nivel local (Argentina) e internacional (Kaudeinen y Rampaud, 1986; Feinstein et al., 2016; Frankova et al., 2022). Luego del período de monitoreo de signos clínicos de toxicidad, en el caso de los animales controles y tratados supervivientes se extendieron las observaciones clínicas por 1 semana más. Como indica la guía OPP-1.213 (USEPA, 2022b), si la supervivencia en el grupo de animales tratados alcanza 0% dentro del período de 14 días y, además ningún animal control presenta signos clínicos o comportamentales que ameriten una observación extendida en el tiempo, el estudio se considera finalizado.

Resultados

Aclimatación inicial

Durante la aclimatación a la sala experimental los animales permanecieron en jaulas grupales (4 por jaula) de acero inoxidable con provisión de agua y alimento *ad libitum*. Durante la aclimatación y en el estudio formal se mantuvieron registros de temperatura ambiente y temperaturas mínimas y máximas (memoria reiniciada cada 24 h). La temperatura ambiente se mantuvo aceptablemente estable, con ocasionales variaciones <1°C respecto al rango pre-establecido (Fig. 2).

Respuesta a la presencia de la cebadera

Durante el fin de semana previo al día de inicio de la exposición al cebo (Julio 16-18, 2022) los animales experimentales fueron transferidos a jaulas translúcidas de policarbonato, de a uno por jaula. Se introdujo una cebadera por jaula para explorar la respuesta comportamental a la presencia de la cebadera en los animales tratados (ver Fig. 3). Los animales inmediatamente mostraron la tendencia esperable e instintiva a utilizar el interior del dispositivo como un compartimento seguro, cargándolo de viruta y usándolo a modo de nido. En los días que siguieron, al momento de la observación la mayoría de los animales utilizaron el interior de las cebaderas como alojamiento.

La Fig. 4 muestra los datos de consumo diario de alimento y agua durante el período de aclimatación. Los animales continuaron consumiendo agua y alimento, y ganando peso corporal en el período de aclimatación con cebadera (sin cebo). En el caso de las hembras, durante las observaciones planificadas los animales fueron frecuentemente encontrados dentro de sus cebaderas. Lo mismo ocurrió, pero en menor magnitud y frecuencia, en el caso de los machos, especialmente cuando fueron aumentando su peso corporal. Además, en el caso de los machos hubo una leve disminución considerada *a priori* no relevante en el consumo de alimento respecto a los valores observados cuando se encontraban en jaulas grupales, que podría deberse a factores comportamentales-sociales (al pasar de cohabitación a la condición de alojamiento individual) y la disminución del espacio de locomoción vertical y horizontal debido a la presencia de la cebadera (volumen de la cebadera ≈10% volumen interno de la jaula).

Tratamiento con cebo incluido en cebadera

En el día D0 se inició la exposición de los animales al cebo. Se introdujo un sobre completo de cebo (peso registrado de los sobres utilizados, 53,4 ± 0,34 g, media ± DE) en el compartimento interno correspondiente destinado a tal fin (ver Fig. 3). En la gran mayoría de los casos, la efectividad del cebo hizo innecesaria la sustitución por otro material fresco, excepto en un único caso donde la mortalidad se observó luego de reemplazar el primer cebo por otro a los 7 días de iniciado el estudio (ver más adelante).

Temperatura Sala Experimental (°C)

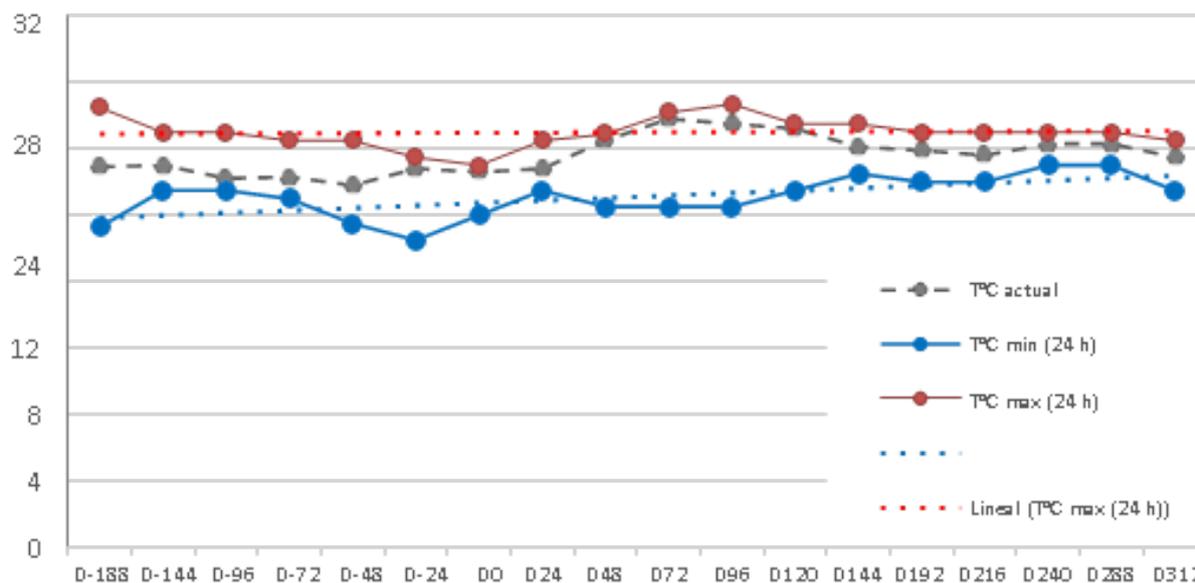


Figura 2. Mantenimiento de la temperatura ambiente (TA) en la sala experimental. En el eje X se presentan los días previos (aclimatación) y a partir de la exposición a la cebadera con cebo (tiempo D0, inicio de presencia del cebo), desde 7 días antes (-188 h = tiempo D-188) hasta 13 días después del inicio del tratamiento (+312 h = tiempo D312). El eje Y muestra la temperatura de la sala (en °C), y el rango diario mínimo (azul) / máximo (rojo). Durante todo el estudio la TA se mantuvo dentro del rango pre-establecido.



Figura 3. Vista de la cebadera instalada dentro de una de las jaulas utilizadas en el estudio, mostrando a uno de los animales y el cebo (3 días después de inicio del período de exposición), durante los procedimientos de monitoreo del consumo de cebo.

En todos los casos, se observó que al cerrar la cebadera el sobre quedaba con limitado espacio para moverse dentro del compartimento dosificado. En general, el contenido del sobre (gránulos verdes que se observan en la Fig. 3) permanecieron primariamente dentro de ese compartimento interno. En pocos casos y, en muy baja magnitud, se observaron partículas del cebo dispersas en el lecho de la jaula por fuera de la cebadera. Durante la exposición al cebo se ofreció simultáneamente alimento tradicional (25-30 g para hembras, y 30-35 g para machos, según progreso de peso corporal) en la zona destinada a comedero de la tapa de la jaula, apenas en cantidad superior al promedio diario consumido en los días previos.

En todos los casos menos 1 (animal macho, código M1.3; 8,3% de los casos), el consumo diario del alimento se mantuvo aproximadamente estable, hasta que sobrevino una caída rápida del mismo 24-72 h antes de encontrar al animal muerto o con signos de toxicidad cuasi-letal

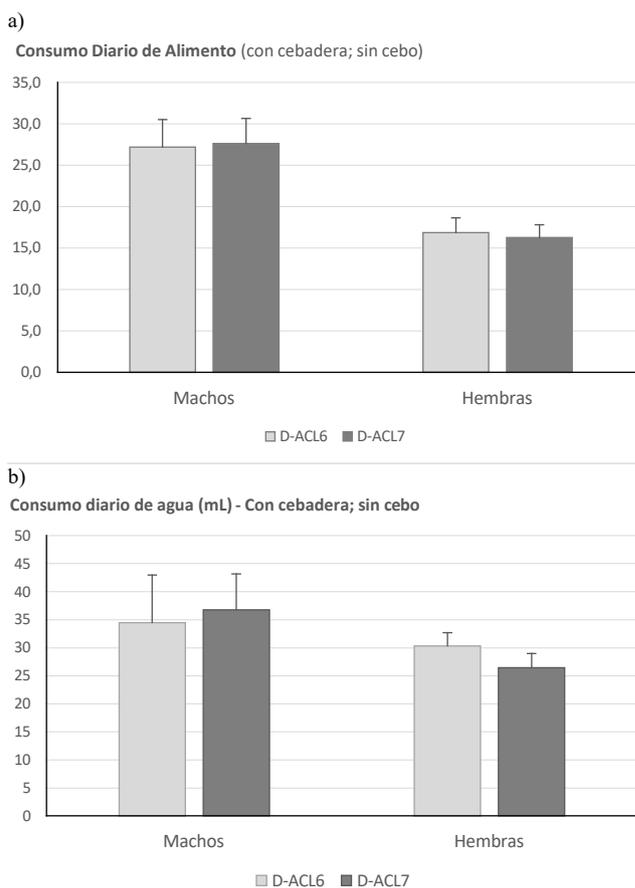


Figura 4. Consumo diario de alimento y agua en los días de aclimatación 6° (D-ACL6, barras en gris claro) y 7° (D-ACL7, barras en gris oscuro) en presencia de la cebadera vacía, justo antes del inicio de la exposición a cebo (día D0). Los resultados se muestran como media \pm DE (N=6). Panel A, alimento. Panel B, agua. El consumo fue parejo día a día. Durante el período de pre-tratamiento, no hubo diferencias considerables entre el consumo en jaulas de cohabitación y la etapa de habituación a las jaulas bajo condición de alojamiento individual.

(sacrificio ético contabilizado a los fines del estudio como muerte).

En la Fig. 5 se grafica la ganancia de peso corporal a lo largo del periodo de exposición al sobre de cebo. Al comparar animales tratados y controles, se observa que el registro de la ganancia de peso no mostró alteraciones hasta que la toxicidad estuvo próxima a un cuadro de intoxicación cuasi-letal. Lo mismo fue evidente al monitorear el consumo de alimento y agua. En casi todos los casos, los signos de toxicidad observados en los animales tratados demostraron el progreso de las alteraciones hacia la letalidad característica de la intoxicación con warfarinas.

La Fig. 6 muestra que el consumo del cebo fue principalmente observado dentro de las primeras 48-72 h de inicio del período exposición. En la mayoría de los casos, la diferencia entre el peso inicial y el actual del cebo pudo asumirse como consumo del animal y no como dispersión en la jaula dentro o fuera de la cebadera; sólo en unos pocos casos y en baja magnitud los gránulos verdes fueron observados fuera de la cebadera. En la mayoría de los casos la muerte ocurrió a las 96-120 h; las hembras con una tendencia a una intoxicación más rápida que los machos.

En pocos casos se visualizaron partículas/gránulos de cebo fuera de la cebadera (diseminados en el lecho de la jaula), por lo cual es razonable proponer que la estimación diaria de consumo de cebo puede haber tenido un margen de error de hasta $\pm 5\%$.

Aproximadamente la mitad de las cebaderas utilizadas sufrieron deterioros menores o mayores del plástico. Esto indica que los animales dedicaron tiempo a roer el material, un comportamiento natural de este tipo de roedores ante materiales noveles suficientemente blandos para su dentadura (Froberg-Fejko, 2014). Esto también quedó evidenciado

con residuos plásticos esparcidos dentro de la cebadera. De este modo, no se puede descartar que los animales tratados hayan ingerido pequeñas cantidades de partículas plásticas junto al cebo, lo cual podría contribuir a irritar las mucosas gastrointestinales y exacerbar las hemorragias internas que pudiera haber causado el tratamiento anticoagulante.

Supervivencia

Como fuera mencionado, todos los animales fueron contabilizados como muertos o sometidos a sacrificio ético dentro del periodo de 14 días del estudio. La mortalidad fue del 91,7% a las 144 h (6 días de exposición) y del 100% a las 312 h (Fig. 7).

Discusión

En evaluaciones de riesgo de productos rodenticidas existen muchos aspectos que deben ser considerados. Al haber muchas formas de presentación en los productos repelentes y biocidas para roedores, los ensayos exigidos para comprobar la eficacia al momento del registro del sistema rodenticida tienen diferenciaciones. A su vez, para cada impacto colateral indeseado potencial en el uso de los distintos sistemas de aplicación existen estudios específicos de la seguridad que las autoridades regulatorias exigen a las empresas registrantes (USEPA, 2022a, 2022b). En este trabajo, evaluamos las condiciones experimentales para determinar la eficacia de productos rodenticidas y la interpretación de los resultados en el marco de procesos de registro de sistemas de cebaderas que contengan cebos formulados con ingredientes activos ya registrados. En muchos países, como en Argentina, los asesores de los organismos públicos intervinientes disponen de amplia literatura científica, marcos reglamentarios y

Peso (g) - [cebadera+cebo] versus control

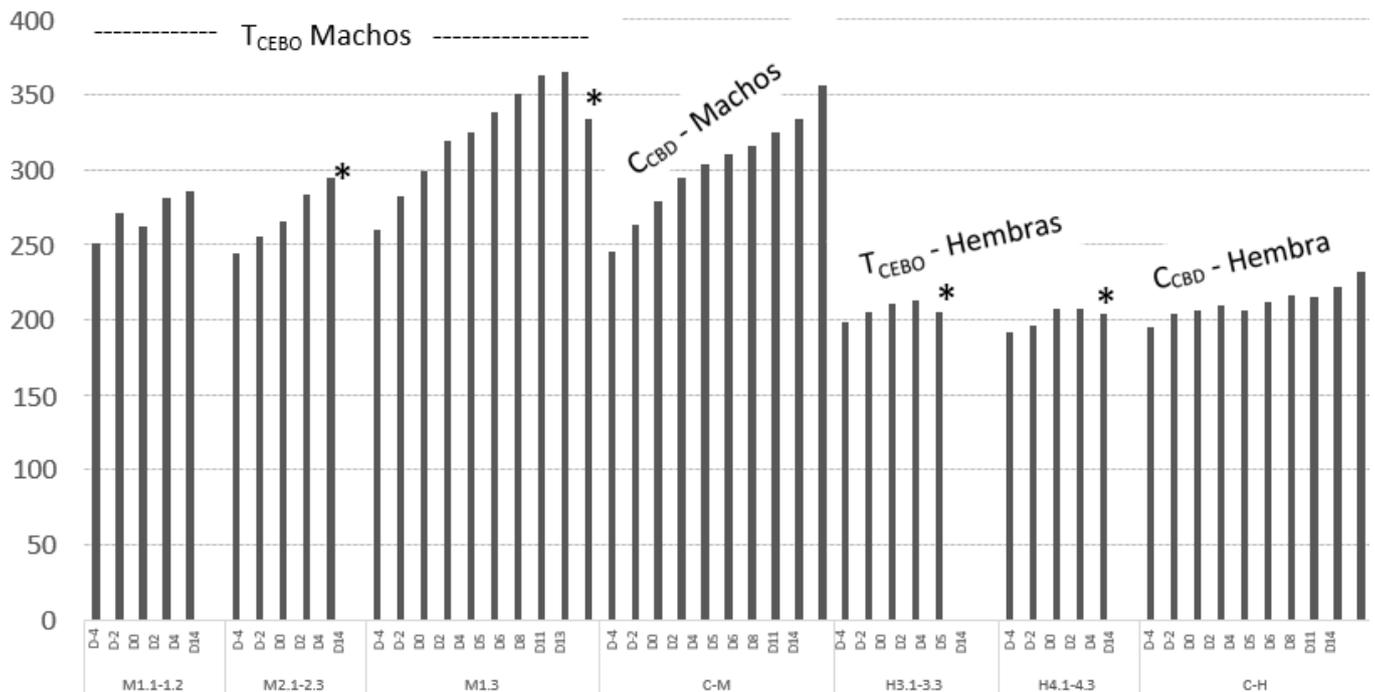


Figura 5. Ganancia de peso durante las 2 semanas de monitoreo (cebadera con cebo). El eje Y muestra el peso corporal de las ratas expresado en g. Los asteriscos marcan el tiempo en el cual se observó la toxicidad severa o muerte, días D4-D5 (96-120 h) en la mayoría de los casos. En el caso de un macho (animal M.1.3.), la 1ª semana de exposición a cebo no se observó un consumo considerable, pero un pequeño consumo adicional registrado al reemplazar el sobre por cebo fresco en la 2ª semana se acompañó por la manifestación de signos de toxicidad y muerte en el día D13.

M1.1. y M1.2. Promedio de dos machos del subgrupo 1

M1.3. Un macho del subgrupo 1 que tuvo un comportamiento diferencial al resto de machos

M2.1. M2.2 y M2.3. Promedio de tres machos del subgrupo 2

H3.1. H3.2 y H3.3. Promedio de tres hembras del subgrupo 3

H4.1. H4.2 y H4.3. Promedio de tres hembras del subgrupo 4

C-M y C-H, grupo de animales controles machos y hembras, respectivamente.

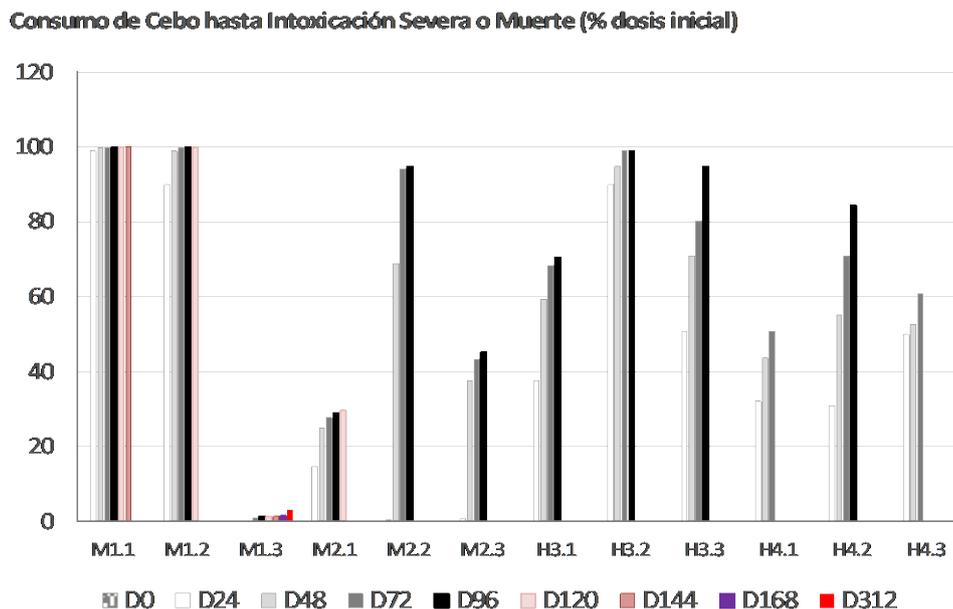


Figura 6. Consumo de cebo durante el periodo del estudio (total, 14 días = 336 h). D0 a D312 indica la cantidad de horas de tiempo acumulado de presencia del cebo en la cebadera. En la mayoría de los casos el consumo de cebo fue registrado hasta 72-120 h dado que sólo en un animal la supervivencia se extendió hasta 144 h (animal M1.1). El animal M1.3 tuvo rechazo marcado del primer sobre de cebo, y al sustituirlo por un segundo sobre a los 7 días, hizo un consumo menor y fue encontrado muerto en el 13° día (D312h).

- M1.1 y M1.2. 2 machos del subgrupo 1
- M1.3. 1 macho del subgrupo 1 que tuvo un comportamiento diferencial al resto de machos
- M2.1, M2.2 y M2.3. 3 machos del subgrupo 2
- H3.1, H3.2 y H3.3. 3 hembras del subgrupo 3
- H4.1, H4.2 y H4.3. 3 hembras del subgrupo 4

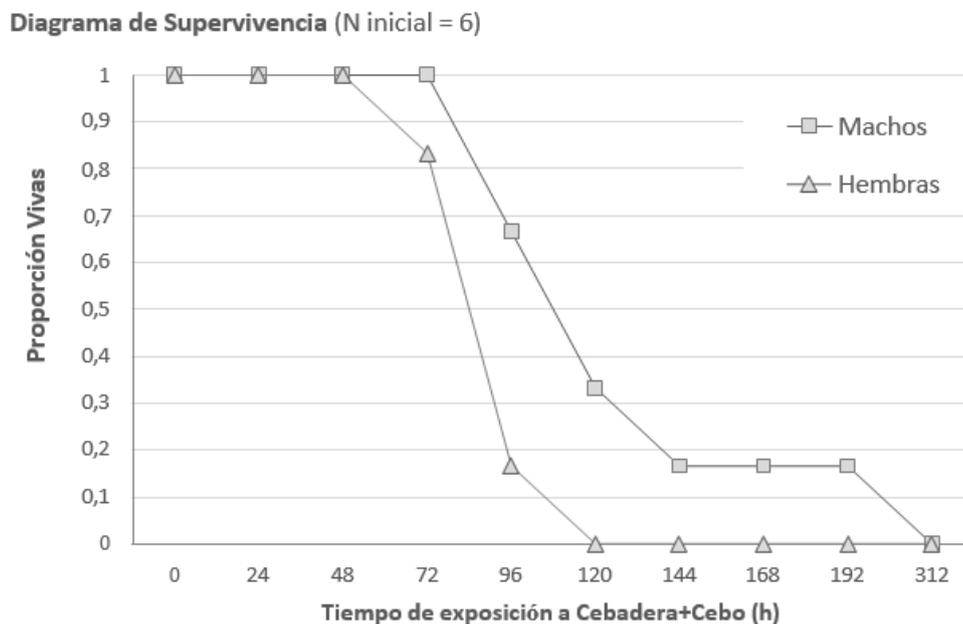


Figura 7. Diagrama de supervivencia. La mortalidad (o la manifestación de signos de toxicidad severa que cumplieran los criterios de exclusión y sacrificio ético del animal) se presentó principalmente en el período de 96-120 h. La mortalidad fue de casi 92% en el 6° día del ensayo y de 100% en el 13°. Se verificó supervivencia del 100% en ambos grupos de animales controles (CABS y CCBD).

experiencia práctica regulatoria para evaluar cada aspecto de las formulaciones de los cebos rodenticidas en cualquiera de sus formas (gránulos, bloques, ceras y pastas, etc.). Sin embargo, no parece haber referencias técnicas-científicas en literatura abierta que permitan identificar y evaluar los aspectos principales a considerar al momento de determinar sistemáticamente la eficacia y seguridad de dispositivos de mayor complejidad, como son las cajas-cebaderas (bait stations en Inglés) que se fabrican en distintos tamaños, con distintos materiales y con distintas formas, que se utilizan con distintas

configuraciones para la carga del cebo y que pueden combinarse con distintos tipos de cebo.

En este trabajo ejemplificamos una derivación de la guía 1.213 (OPP, USEPA), propuesta para establecer la aptitud de un sistema de este tipo para el control de ratas y ratones, al mismo tiempo que brindando información preliminar sobre aspectos relativos a la seguridad para los animales no considerados plagas (por ejemplo, perros y gatos domésticos) y humanos que pudieran ingerir el ingrediente rodenticida en escenarios de exposición accidental (por ejemplo, infantes).

Las observaciones que se realizaron indicaron que el sistema cebadera-cebo examinado mostró resultados aceptables en cuanto a provocar en los animales actividad exploratoria tanto hacia el interior de la caja (independientemente que esté o no presente el cebo) como hacia el cebo. Ningún animal de los grupos controles presentó comportamientos anómalos o signos clínicos de toxicidad. En las jaulas con animales tratados, se evidenciaron roturas en los sobres durante la primera semana de exposición en el 91,7% de los casos; además, en el mismo período se verificó el consumo de niveles farmacológicamente activos del formulado rodenticida en todos esos animales. De este modo, incluyendo una jaula en la cual se tuvo que recargar la cebadera con un sobre de cebo fresco a los 7 días, la atractabilidad alcanzó el 100% de los animales tratados. Teniendo en cuenta los registros, el 100% de los animales tratados consumió niveles toxicológicamente significativos del cebo, incluyendo un 91,7% de animales (11 de 12 totales) que ingirieron $\geq 30\%$ de la dosis inicial ofrecida. Por otra parte, aún en presencia de suficiente ración de alimento regular dispuesto en los comederos de las jaulas (del mismo modo que en la colonia proveedora de los animales), la relación $[\text{cebo}/(\text{cebo } 424 + \text{alimento})]$ fue $\geq 50\%$. Finalmente, la letalidad fue de 100%, 91,7% durante la primera semana de exposición.

El sistema examinado cebadera-cebo presentó propiedades sugestivas de alta seguridad. En general, el cebo quedó primariamente retenido dentro de la cebadera, y no aparentó desprender residuos; en ningún caso se visualizaron manchas coloreadas en la cebadera, en la viruta (lecho) o en las paredes de las jaulas. Se puede interpretar que el cierre, si bien era simple (media vuelta de llave), fue aceptablemente efectivo para evitar el contacto de personas con el interior. Finalmente, en ningún caso se encontró alguna cebadera abierta dentro del período de monitoreo, aún cuando hubo 12 animales tratados con cebo y para cada uno se inspeccionó (esto es, se abrió y cerró) la cebadera entre 6 y 10 veces. En ningún caso falló el sistema de bisagra ni la llave. De cualquier modo, las recomendaciones en el manipuleo de cualquier sustancia o formulación peligrosa indican la eliminación de todo riesgo mediante el uso de guantes descartables de látex u otro material adecuado. Rodenticidas como BFC (DL50oral, rata = 0,4 mg/kg; ECHA, 2016) son peligrosos en humanos. Se estima que el rango NOAEL/LOAEL para efectos críticos en rata incluyendo trastornos de coagulación se encuentra en el rango $10^{-3}/10^{-2}$ mg/kg/día; ECHA (2016) estima que si un infante de 10 kg de peso corporal ingiere 10 mg de cebo 0,005% p/p la dosis interna alcanzada sería $\sim 0,05$ μg BFC/kg, implicando que aún la ingesta accidental de 2% del contenido del producto rodenticida examinado (~ 1 g) podría generar en un infante una dosis peligrosa de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En consecuencia, toda dispersión de cebo fuera de las cebaderas debe ser monitoreada cuidadosamente. Se recomienda que en cada instancia de monitoreo de las jaulas el experimentador registre tanto el consumo como la dispersión, y que dicha información sea incluida en el reporte final del ensayo a los fines de informar a la autoridad interviniente sobre potenciales problemas de seguridad en el diseño de los sistemas.

Si bien no fue estudiado, se puede asumir que roedores de menor tamaño como los ratones o ratas adolescentes pueden tener aún más facilitado el ingreso a la cebadera, y disponer de un espacio más confortable para hacer su nido, lo cual puede a su vez favorecer el descubrimiento, exploración, atractabilidad y consumo del cebo. Para alcanzar una eficacia máxima, parece ser necesario inspeccionar la cebadera entre 5 y 7 días después del agregado del cebo fresco. De no encontrar consumo considerable en alguna cebadera (se puede establecer como referencia que el consumo sea claramente mayor a DL50 del cebo), se recomienda reemplazar el cebo por otro nuevo y volver a inspeccionar la cebadera 5-7 días después.

La abertura de agujeros pequeños en dos de las esquinas del sobre no pareció afectar el grado de empaquetado del contenido del mismo ni la dispersión de los gránulos por fuera de las cebaderas. Por el contrario, se estima que puede haber optimizado la atractabilidad del cebo, al activar las capacidades altamente desarrolladas del sistema olfatorio de los roedores pequeños (rata; ratón). La evaluación de la eficacia de

sobres sellados de cebo en cebaderas puede realizarse alternativamente pinchando el sobre con un elemento punzante agudo en unos pocos sitios, pero manteniendo el sobre sin fracturas al momento de cerrar la cebadera. En el caso de la rata, se anticipa que animales adultos machos pueden ingresar, explorar y salir de la cebadera mientras se encuentran en la adultez temprana (< 10 semanas de edad); en el caso de las hembras, aún animales adultos de edad avanzada pueden recorrer el interior del dispositivo sin dificultad. Se anticipa que existirá un compromiso entre el tamaño de una cebadera para permitir el ingreso de cualquier roedor silvestre independientemente de su edad y sexo, y la probabilidad de dispersión del contenido de los cebos por fuera de las cebaderas. Finalmente, se propone que las mismas observaciones realizadas en este estudio pueden ser aplicadas al realizar evaluaciones de eficacia en otros diseños de cebadera y otras presentaciones comerciales de cebos desarrolladas para ser aplicadas mediante cebaderas.

Conclusiones

Siguiendo la adaptación de la guía OPP-USEPA 1.213 establecida para evaluar la eficacia del dispositivo cebadera-cebo examinado, al finalizar el período de monitoreo (14 días) la aceptación, palatabilidad y eficacia rodenticida del sistema fue satisfactoria desde todos los criterios establecidos. Se propone que el protocolo descrito puede aplicarse al análisis comprensivo de los distintos aspectos que influyen los resultados obtenidos con otros modelos o sistemas cebadera-cebo análogos al examinado en este trabajo. Además, se enfatiza que es innecesario un número alto de ratas por grupo experimental, en acuerdo con los principios de las 3Rs de uso ético de animales de laboratorio: sólo se requirieron 12 animales expuestos al cebo y aún podrían utilizarse menos (4-5 de cada sexo). Eventualmente podría evaluarse sólo un sexo si existe información toxicológica completa y concordante sobre el compuesto rodenticida (y sobre los otros ingredientes tóxicos de la formulación, si los hubiera). Si bien habría que esperar la práctica regulatoria para afirmarlo en forma más conclusiva, la información que se puede obtener brinda una consideración objetiva y aceptable de la eficacia, permitiendo evaluar la aptitud y explorar la seguridad de sistemas cebadera-cebo que soliciten registro ante autoridades regulatorias.

Agradecimientos

Se agradece al Laboratorio BINKA S.A. por la provisión de la muestra de brodifacoum (Ultra Plus®) utilizada en este trabajo.

Referencias

1. AIFS-Australia. Rat poison found in Aussie pork food. Brisbane: Australian Institute of Food Safety; 2015 [fecha de acceso, 16 de Diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.foodsafety.com.au/news/rat-poison-found-in-aussie-pork-meat>
2. BPCA. Rat behavior in rodent control. Derby: British Pest Control Association. UK; 2019 [fecha de actualización, Marzo de 2019; fecha de acceso, 16 de Diciembre de 2022]. Disponible en: <https://bpca.org.uk/News-and-Blog/rat-behaviour-in-rodent-control>
3. D'Silva C, Krishna B. Rodenticide Poisoning. Indian J. Crit. Care Med. 2019; 23(4), S272– S277. Disponible en: <https://www.ijccm.org/doi/pdf/10.5005/jp-journals-10071-23318>.
4. ECHA. Denatonium benzoate - Toxicological summary. European Chemical Agency, Information on Registered Substances; 2022 [fecha de acceso, 16 de Diciembre de 2022]. Disponible en: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/16728/7/4/1>
5. EC. Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products in the market. Brodifacoum - Product type-14 [rodenticide]. Standing Committee on Biocidal Products. European Community (anexo I, Italia); 2009 [fecha de actualización, 16 de Diciembre de

- 2010; fecha de acceso, 28 de Diciembre de 2022].
6. ECHA. Evaluation of active substances: Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products – Brodifacoum, Product-type 14 (Rodenticide). European Chemical Agency; 2016 [fecha de actualización, Septiembre de 2016; fecha de acceso, 18 de Diciembre de 2022].
 7. Feinstein DL, Akpa BS, Ayee MA, Boullerne AI, Braun D, Brodsky SV, Gidalevitz D, Hauck Z, Kalinin S, Kowal K, Kuzmenko I, Lis K, Marangoni N, Martynowycz MW, Rubinstein I, van Breemen R, Ware K, Weinberg G. The emerging threat of superwarfarins: history, detection, mechanisms, and countermeasures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2016; 1374 (1), 111-22.
 8. Frankova M, Aulicky R, Stejska V. Efficacy of eight anticoagulant food baits in house mouse (*Mus musculus*): comparison of choice and no-choice laboratory testing approaches. *Agronomy* 2022; 12, 1828. <https://doi.org/10.3390/agronomy12081828>.
 9. Froberg-Fejko K. Give a rat a bone: satisfying rodents' need to gnaw. *Lab. Anim.* 2014; 43, 378–379. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/labani.611>.
 10. GBC-Canada. Managing rat and mouse pests. Gobierno de British Columbia, Canadá; 2022 [fecha de acceso, 16 de Diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www2.gov.bc.ca/gov/content/environment/pesticides-pest-management/managing-pests/animals/rodents>.
 11. Hubrecht RC, Carter E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals (Basel)* 2019; 9(10), 754. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2615/9/10/754>.
 12. Humane Society. What to do about rats. Washington, DC: The Humane Society of the United States; 2022 [fecha de acceso, 16 de Diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.humanesociety.org/resources/what-do-about-rats>.
 13. Isackson B, Irizarry L. Rodenticide Toxicity. Series StatPearls Publishing, National Library of Medicine, USA; 2022 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554428/>.
 14. Kaudeinen DE, Rampaud M. A review of brodifacoum efficacy in the U.S. and worldwide. *Proceedings of the 12th Vertebrate Pest Conference* 12; 1986. Disponible en: <https://escholarship.org/uc/item/8v9385dd>.
 15. Murphy MJ, Lugo AM. Superwarfarins, Capítulo 18. En: R.C. Gupta, editor. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Segunda edición. Academic Press/Elsevier; 2015. 223-238.
 16. Petrie GF. Rats and Plague, from a 1911 issue of *Scientific American*. Supplement to the February 2011 "50, 100 and 150 Years Ago"; 2011. Disponible en: <https://www.scientificamerican.com/article/rats-and-plague-50-100-150-years-ago/>.
 17. Piret J, Boivin G. Pandemics Throughout History. *Front. Microbiol. [Infectious Agents and Disease]*. 2021; 11, 63176 Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.631736>.
 18. Strubbe JH, Woods SC. The timing of meals. *Psychol. Rev.* 2004; 111(1), 128-141. Disponible en: <https://doi.org/10.1037/0033-295X.111.1.128>.
 19. USEPA. Restrictions on rodenticide products. US Environmental Protection Agency, USA; 2022a [fecha de actualización, 21 de Noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.epa.gov/rodenticides/restrictions-rodenticide-products>.
 20. USEPA. Rodenticide study protocols – Laboratory test method 1.213 (versión revisada, 12 de Febrero de 1990). Washington DC: United States Environmental Protection Agency; 2022b [fecha de actualización del sitio, 11 de Abril 2022]. Disponible en: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/rodenticide-study-protocols>.
 21. WHO. Anticoagulant rodenticides. *Environmental Health Criteria* 175. Geneva: International Programme on Chemical Safety (INCHEM), World Health Organization; 1995 [fecha de acceso, 21 de Noviembre de 2022]. Disponible en: <https://incchem.org/documents/ehc/ehc/ehc175.htm>.