

Jaarverslag 2010: Resistentie tegen rodenticiden



Kristof Baert – Jan Stuyck – Sebastien Pieters

INBO.R.2011.16
D/2011/3241/168

Samenvatting

In 2010 werd in opdracht van Operationeel Waterbeheer van de Vlaamse Milieu Maatschappij een tweede screening naar resistentie tegen rattenvergif op basis van antistollingsmiddelen zoals warfarine, bromadiolone en difenacoum afgewerkt. In totaal werden 351 ratten getest met bloedstollingstesten (BCR). Resistente ratten en een deel van de gevoelige ratten werden ook onderzocht op de aanwezigheid van puntmutaties in het VKORC1-gen. De ratten kwamen van de volgende rivierbekkens: Ijzer, Brugse Polder, Gentse kanalen en Bovenschelde. Eerder onderzoek van 2003 tot 2005 toonde aan dat in deze regio voornamelijk bromadiolone resistentie voorkwam en dat deze vorm van resistentie mogelijk gekoppeld is aan de puntmutatie TAT-139-TTT of Y139F (M1), tot nu toe de meest voorkomende mutatie in Vlaanderen.

Verder werd er in navolging van de feedingstesten in 2008 nog een vergelijkende test gedaan tussen hetero- en homozygote resistente ratten, dragers van mutatie M1.

Voor meer informatie rond resistentie in het algemeen verwijzen we naar de vorige jaarverslagen.

Inhoud

Samenvatting.....	4
1 Bloedstollingstesten	6
2 Genetische testen.....	8
3 Nieuwe mutatie	11
4 Feedingstesten	12
5 Conclusie.....	13
6 Plannen voor de toekomst	14

1 Bloedstollingstesten

Er werden 351 ratten afkomstig van de rivierbekkens Ijzer, Brugse Polder, Gentse kanalen en Bovenschelde getest met een BCR test voor warfarine (cfr tabel 1). Van deze ratten bleken er 165 gevoelig en 186 resistent te zijn. Warfarine gevoelige ratten werden niet verder getest gezien deze ook gevoelig zijn voor bromadiolone en difenacoum. Het merendeel (n=168) van de warfarine resistente ratten werd vervolgens met difenacoum getest. Deze manier van werken week af van onze werkwijze in het verleden. Toen werden warfarine resistente ratten eerst getest met bromadiolone en pas 6 weken later met difenacoum. Om eventuele invloeden van een eerdere bromadiolone toediening uit te sluiten werd er geopteerd om deze stap over te slaan. Bovendien bleek eerder dat warfarine resistente ratten in die regio bijna allemaal ook bromadiolone resistent waren. De ratten eerst testen met bromadiolone zou mogelijk de difenacoum testen hypothekeren zonder daarom veel extra informatie rond bromadiolone resistentie op te leveren. In 2010 waren van de 168 warfarine resistente ratten, 12 ratten difenacoum resistent.

tabel 1: Warfarine resistentie op basis van BCR resultaten vergeleken voor de periode 2003-2005 en 2010. Fisher exact werd gebruikt om na te gaan of er significant verschil was tussen beide periodes. $P < 0,05$ is significant.

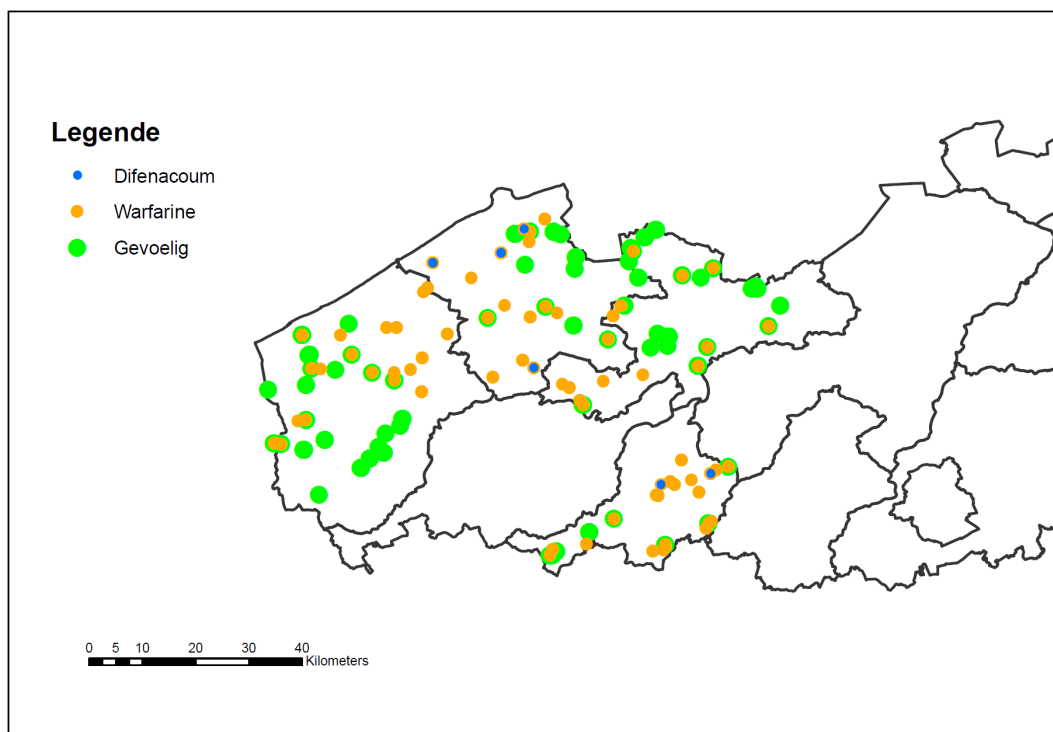
Bekken	2003-2005			2010			p
	Gevoelig	Resistent	%	Gevoelig	Resistent	%	
Bovenschelde	0	2	100	13	51	80	1
Brugse Polder	20	13	39	34	58	63	0,02431
Gentse Kanalen	30	4	12	47	37	44	0,00065
Ijzer	30	18	38	71	40	36	0,85960
Totaal	80	37	32	165	186	53	0,00007

Vergelijken we de resultaten van deze vier bekkens van 2010 met deze van de periode 2003-2005 (cfr tabel 1) dan zien we dat warfarine resistentie in totaal is toegenomen van 32% naar 53%. Dit verschil is significant ($p = 0,00007$) en is te wijten aan een significante toename in de Brugse Polder en de Gentse Kanalen, respectievelijk van 39% tot 63% en van 12% naar 44%. In het Ijzer bekken zitten we met een status quo en zijn 36% van de ratten warfarine resistent. Het bekken van de Bovenschelde spant de kroon met 80% van de ratten die warfarine resistent zijn. Vergelijken naar toe- of afname met de periode 2003-2005 is weinig zinvol gezien de zeer beperkte steekproef toen.

Ook al hebben we de dieren het voorbije jaar niet met bromadiolone getest om eerder aangehaalde redenen. We kunnen op basis van resultaten in het verleden met een grote waarschijnlijkheid stellen dat ook bromadiolone resistentie in deze bekkens is toegenomen.

Wat de resultaten van de difenacoum testen betreft zien we dat in totaal 12 van de 168 warfarine resistente ratten (5%) difenacoum resistent zijn wat niet significant verschilt met de 2 van de 37 ratten (7%) in de periode 2003-2005. Globaal kunnen we dus stellen dat er geen toe- of afname is van difenacoum resistentie en dat deze vorm van resistentie nog steeds erg beperkt is. Opvallend misschien is dat 10 van de 12 difenacoum resistente ratten afkomstig zijn van de Brugse Polder.

Figuur 1: Verspreiding van resistentie op basis van bloedstollingstesten in 2010 voor de rivierbekkens IJzer, Brugse Polder, Gentse kanalen en Bovenschelde. De groene punten staan voor gevoelige ratten, de oranje voor warfarine resistente ratten en de blauwe voor difenacoum resistente ratten. Per locatie kunnen meerdere dieren getest zijn.



2 Genetische testen

Resistentie tegen rodenticiden wordt op zijn minst mede veroorzaakt door de aanwezigheid van een puntmutatie in het VKORC1-gen. Dit gen speelt een belangrijke rol in de vitamine K huishouding en de aanmaak van stollingsfactoren in het lichaam. Het enzym, vitamine K epoxide reductase (VKOR), waarvoor het gen codeert is het target van het rattenvergift. Als ratten drager zijn van een dergelijke mutatie dan bindt na opname van giftig lokaas het rodenticide minder goed met hun VKOR. Hierdoor wordt de werking van het enzym nagenoeg niet gehinderd en zijn de ratten in zekere mate resistent aan het vergif. Met de genetische testen willen we nagaan welke mutaties in Vlaanderen bijdragen tot resistentie.

Tabel 2: Vergelijking van de resultaten van de bloedstollingstesten en de genetische testen. De gevoelige ratten zijn allemaal wildtype (WW), de resistente ratten nagenoeg allemaal drager van een mutatie (M1W of M1M1) in het VKORC1gen. 'Warf. resistent (D)' zijn warfarine resistente ratten die ook met difenacoum getest zijn.

BCR\GEN	WW	M1W	M1M1	totaal
Gevoelig	102	0	0	102
Warf. resistent	9	4	5	18
Warf. resistent (D)	2	92	62	156
Dif. resistent	0	1	11	12
Eindtotaal	113	97	78	288

Uit eerdere testen is gebleken dat er een zeer goede overeenkomst was tussen de resultaten van de bloedstollingstesten en de genetische testen. Ook nu blijkt dit het geval te zijn (cfr Tabel 2&3). Van de 351 ratten werden er 288 genetisch getest. Dit waren alle resistente ratten en de gevoelige ratten met een PCA van 12 en meer. Met uitzondering van de ratten van de Gentse Kanalen waarvan alle ratten genetisch getest werden. De grens die we handhaven bij de stollingstesten tussen resistente en gevoelige ratten is een PCA van 17. Zo worden alle gevoelige ratten in de buurt van deze afkapwaarde ook gescreend op aanwezigheid van een mutatie. Bij een nog lagere PCA dan 12 is de kans zeer klein dat we nog mutaties in VKORC1 terugvinden.

Tabel 3: 2X2 tabel relatie warfarine resistentie en aanwezigheid van mutatie of niet

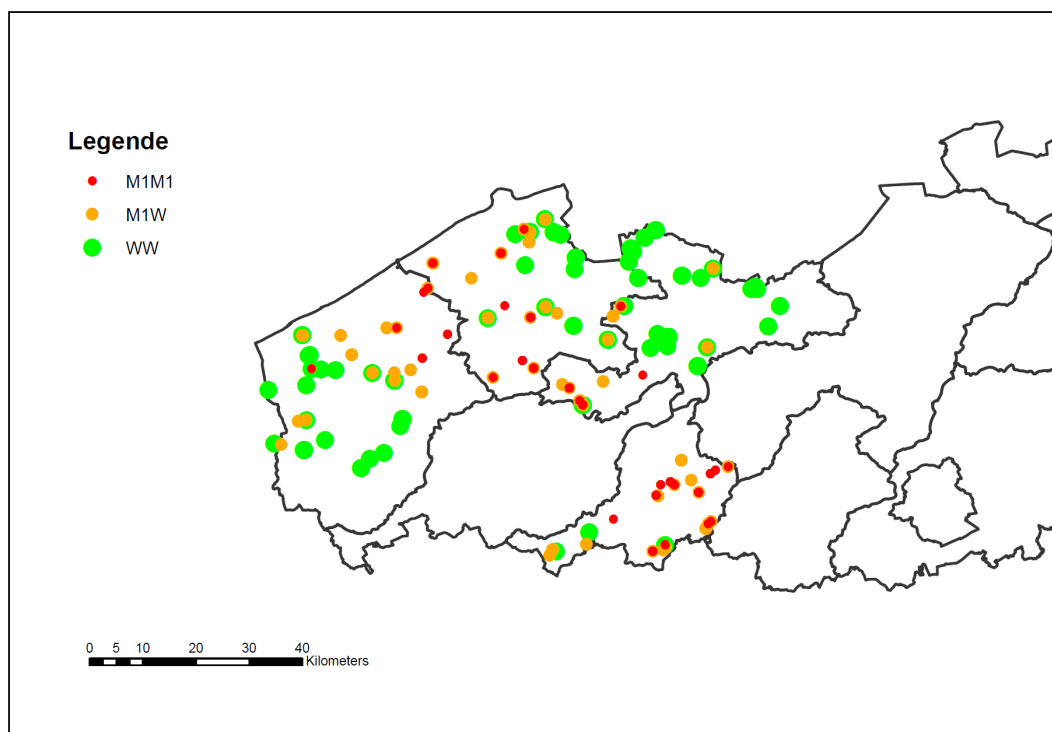
	M-	M+	
BCR-	102	0	102
BCR+	11	175	186
	113	175	288

Een eerste vaststelling is dat we in de vier bekkens enkel mutatie M1 of TAT-139-TTT of Y139F terugvonden. Daarnaast bleek geen enkele BCR gevoelige rat drager van een mutatie in VKORC1. Daarentegen hadden 11 ratten (homozygoot wildtype, WW), die volgens de BCR test positief waren, geen mutatie in VKORC1. Tien van deze ratten hadden een PCA tussen de 17 en 22% en kunnen we als grensgevallen beschouwen. Voor rat 1662 gaat dit echter niet op, zij had een PCA>50 wat volgens de BCR test duidelijk resistent is. Of dit nu

daadwerkelijk een resistente rat is zonder mutatie in VKORC1, valt niet met zekerheid te zeggen. Mogelijk ligt de mutatie buiten exon 3 het deel van het gen dat wij tot hier toe onderzochten. Anderzijds is het mogelijk dat er ergens een fout is gebeurd in het proces van staalname tot het uitvoeren van de genetische test. Dit zal nog verder onderzocht worden.

Als we de resultaten van de stollings- en genetische testen beschouwen als de resultaten van twee onafhankelijke diagnostische testen dan zien we een hoge graad van overeenkomst 0,962 en een kappa van 0,918. Dit betekent dat de resultaten van beide testen vergelijkbaar zijn. Als we echter de BCR test als een diagnostische test beschouwen voor de detectie van een mutatie in het VKORC1-gen, dan zien we dat voor deze steekproef de BCR test een specificiteit heeft van 90,27% en een sensitiviteit van 100%. Een eerdere vergelijking van beide testen gaf nagenoeg dezelfde graad van overeenkomst, specificiteit en sensitiviteit. Uitgaande op deze analyse en de gegevens van de BCR testen, zouden we om beide testen meer op elkaar af te stellen de cut off van PCA 17 kunnen wijzigen. Of dit wenselijk is en welke PCA dit dan wel moet worden zal in een later stadium uitgewerkt worden.

Figuur 2: Van 288 ratten getest in 2010 werd het genetisch profiel bepaald. De groene punten staan voor gevoelige ratten (WW). De oranje en rode punten staan voor respectievelijk heterozygote (M1W) en homozygote (M1M1) resistente ratten drager van de puntmutatie TAT-139-TTT of Y139F. Van de Gentse kanalen werden alle ratten genetisch getest, van de overige drie bekkens enkel de ratten met een PCA>12%



We zagen dat in de twee bekkens (Bovenschedde, Brugse Polder) met het hoogste percentage resistente ratten er ook de grootste proportie homozygoot resistente ratten voorkwam (cfr. Tabel 4). Dit bevestigt dat in die bekkens inderdaad het genetische kenmerk 'resistentie' meer aanwezig is.

Nagenoeg alle difenacoum resistente ratten waren homozygoot M1M1 (11 op 12). Andersom was dit niet waar, slechts 11 van de 78 homozygote ratten (M1M1) bleken difenacoum resistent.

Tabel 4: Genetische resultaten per bekken

Bekken	M1M1	M1W	WW	niet getest	Totaal
Bovenschedde	31	20	3	10	64
Brugse Polder	25	29	27	11	92
Gentse kanalen	11	22	51	0	84
Ijzer	11	26	32	42	111
Totaal	78	97	113	63	351

3 Nieuwe mutatie

Verdere genetische analyse van stalen van Maas Limburg 2009 heeft ons geleerd dat er in Vlaanderen naast mutatie 1 of M1 of TAT-139-TTT of Y139F en mutatie 2 of M2 of CTG-120-CAG of L120Q nog een derde mutatie in het VKORC1-gen voorkomt. In rat 1327 en een deel van haar nakomelingen afkomstig van Maaseik werd de mutatie TAT-139-TGT of Y139C teruggevonden. Mutatie 3 of M3 bevindt zich eveneens op exon 3, ter hoogte van codon 139 en zorgt ervoor dat het aminozuur tyrosine vervangen wordt door cysteïne. Deze mutatie komt wijdverspreid voor in Duitsland en Denemarken. De ratten in beide landen die drager zijn van deze mutatie staan gekend voor hun resistentie tegen bromadiolone, ook bij ons waren de ratten met deze mutatie volgens de BCR testen bromadiolone resistent. Het is niet verwonderlijk dat deze mutatie voor de eerste maal opduikt in de buurt van de Duitse grens.

4 Feedingstesten

Een andere test die we eerder al gebruikten in het resistentie onderzoek is de feedingstest. Deze test geeft een goede inschatting van de graad van praktische resistentie. De test verloopt als volgt. De ratten worden gedurende 6 dagen enkel gevoederd met giftig lokaas en dagelijks wordt de lokaasopname opgevolgd. De dieren die nadien de test nog 3 weken overleefden en gedurende dag 5 en 6 van de feedingstest minstens 50 % aten van de hoeveelheid lokaas van de eerste twee dagen, worden als praktisch resistent beschouwd. Misschien even recapituleren. In 2008 hebben we voor het eerst een aantal feedingstesten uitgevoerd, 108 ratten werden getest met bromabo blok (0,005% bromadiolone) en 25 met difabo blok (0,005% difenacoum). Met uitzondering van twee ratten uit het veld, waren alle ratten afkomstig van onze kweekkolonie met homozygote resistente ratten (M1M1). Dieren van deze stam waren volgens BCR testen bromadiolone resistent.

Na afloop overleefden minder dan 20% van de ratten de test. Voor bromadiolone zien we dat 19 ratten van de 108 de test overleefden. Hiervan hadden 9 ratten (8%) voldoende lokaas opgenomen gedurende de laatste 2 dagen om ze als praktisch resistent te beschouwen. Voor difenacoum overleefden vier van de 25 ratten de test. De opname door de overlevenden was echter onvoldoende zodat ze niet als praktisch resistent bestempeld konden worden.

Om na te gaan in welke mate deze eigenschap wordt doorgegeven van generatie op generatie werden praktisch resistente ratten onderling en met labo ratten gekruist. De nakomelingen werden op hun beurt aan een feedingstest met bromadiolone onderworpen. Het aantal geteste dieren was beperkt waardoor deze opzet als een pilootstudie beschouwd moet worden. Concreet werden er 15 heterozygote resistente ratten afkomstig van 2 nesten (KB27(v) en KB28(v) x mannelijke labo rat) getest. Van de 5 overlevende ratten waren er 4 (3v/1m) of 27% praktisch resistent. Verder werden 8 homozygote resistente nakomelingen van KB28(v) en KB 66(v) met R1056(m) met dezelfde procedure getest. Er waren 4 overlevenden waarvan één rat (m) of 13% praktisch resistent was. Voor de praktisch resistente ratten zijn de verschillen tussen de groepen niet significant. Kijken we echter naar de aantallen overlevenden dan is er een significant verschil ($p < 0,05$) tussen de ratten van onze kolonie (19/108) en hun directe nakomelingen (4/8). De kruisingen met labo ratten geven geen significant verschil.

De moeilijke interpretatie van de feedingstest door de verschillende opname in tijd en hoeveelheid per rat, maakt dat een conclusie over de overerving van praktische resistentie eerder onder voorbehoud is. Wat bleek is dat praktische resistentie niet zo maar wordt doorgegeven van de ene generatie naar de andere. Naast de aanwezigheid van een mutatie in VKORC1, zijn er vermoedelijk andere mechanismen die aanleiding geven tot praktische resistentie (vb wijzigingen in het metabolisme van rodenticiden). Synergie tussen de verschillende resistentie mechanismen kunnen dan aanleiding geven tot praktische resistentie.

Zien we echter naar de kans op overleven van een feedingstest, zonder rekening te houden met de opname, dan stellen we vast dat deze significant hoger ligt bij de nakomelingen. In de praktijk kan dergelijke selectie zich ook voordoen na een bestrijdingsactie en zo toekomstige acties hypothekeken.

5 Conclusie

- We zien dat er in de periode van 2003-2005 tem 2010 een duidelijke toename is van resistentie tegen warfarine en vermoedelijk ook bromadiolone in het westen van Vlaanderen. Dit is te wijten aan een significante toename van resistentie in de Brugse Polder en de Gentse Kanalen. In het IJzer bekken is de toestand status quo en voor de Bovenshelde hadden we geen referentie van het verleden. Wel hebben we in de Bovenshelde te maken met de hoogste prevalentie van resistentie (80%). De resistentie in deze bekkens is gekoppeld aan de aanwezigheid van mutatie 1 of TAT-139-TTT in VKORC1.

- Ook tijdens de screening van 2010 gaven de stollingstesten en de genetische testen een gelijkaardig resultaat, met als duidelijke vaststelling dat de aanwezigheid van puntmutaties in VKORC1 leidt tot resistentie. Beide testen kunnen dus wel als betrouwbaar beschouwd worden en zullen deels afhankelijk van de toekomstige doelstellingen hun nut nog kunnen bewijzen.

- In het meest oostelijk gelegen gedeelte van Vlaanderen werd een nieuwe mutatie in VKORC1 vastgesteld TAT-139-TGT of Y139C. Dit is de derde mutatie in Vlaanderen die gerelateerd wordt met resistentie.

- Feedingstesten toonden aan dat praktische resistentie niet zo maar van de ene op de andere generatie wordt doorgegeven. Mogelijk spelen meerdere mechanismen een rol in de opbouw van praktische resistentie. Wel bleken de overlevingskansen op een feedingstest toe te nemen bij nakomelingen van overlevenden van een dergelijke test. In de praktijk kan dit leiden tot moeilijk te bestrijden populaties.

6 Plannen voor de toekomst

Het is de bedoeling om in de nabije toekomst al de resultaten van 2003 tem 2010 te bundelen en deze te analyseren en de gebruikte technieken te evalueren. Daarnaast zal na analyse van de vraagzijde een stappenplan uitgewerkt worden om in de toekomst de trend van resistentie bij de bruine rat in Vlaanderen verder op te volgen.