



**inbo**



Instituut voor  
Natuur- en Bosonderzoek

## Bestrijding van de bruine rat in Vlaanderen – resistentie tegen rodenticiden

*Kristof Baert, Jan Stuyck, Peter Breyne, Ivy Jansen en  
Sebastien Pieters*

**Auteurs:**

Kristof Baert, Jan Stuyck, Peter Breyne, Ivy Jansen en Sebastien Pieters  
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](http://www.inbo.be)

**e-mail:**

[kristof.baert@inbo.be](mailto:kristof.baert@inbo.be)

**Wijze van citeren:**

Baert K, Stuyck J, Breyne P, Jansen I & Pieters S (2012). Bestrijding van de bruine rat in Vlaanderen – resistentie tegen rodenticiden. Rapporten van het Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek 2012 (35). Instituut voor Natuur- en Bosonderzoek, Brussel.

**D/2011/3241/358**

**INBO.R.2012.35**

**ISSN: 1782-9054**

**Verantwoordelijke uitgever:**

Jurgen Tack

**Druk:**

Managementondersteunende Diensten van de Vlaamse overheid

**Foto cover:**

Kristof Baert

**Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van:**

Vlaamse Milieu Maatschappij



# **Bestrijding van de bruine rat in Vlaanderen – resistentie tegen rodenticiden**

**Kristof Baert, Jan Stuyck, Peter Breyne, Ivy Jansen &  
Sebastien Pieters**

## Dankwoord

Wij zouden hierbij graag de mensen van de Afdeling Operationeel Waterbeheer van de Vlaamse Milieu Maatschappij (VMM) willen bedanken voor de goede samenwerking gedurende de voorbije jaren. Zonder hen was het onmogelijk geweest om het resistentieonderzoek tot een goed einde te brengen. In de eerste plaats de rattenvangers die ons steeds hebben voorzien van bruine ratten. Daarnaast natuurlijk ook hun collega's van de centrale diensten, die instonden voor de aansturing en de werking van de rattenbestrijding, in het bijzonder Paul Thomas en Marc Van der Weeën die steeds zijn blijven geloven in het nut en belang van ons onderzoek.

Ook het genetisch labo van het INBO heeft voortreffelijk werk geleverd. Zij lieten ons toe om het onderzoek naar een hoger niveau te tillen door gebruik te maken van laatste genetische analysetechnieken. Sabrina, David, Nancy, Leen en An: bedankt!

Verder konden wij voor de nodige hulp en bijsturing steeds rekenen op onze collega's binnen faunabeheer. Zonder de spiegel die ze ons voorhielden zou het traject ongetwijfeld bochtiger verlopen zijn. Met bijzondere dank aan Filip Berlengee en Erik Verschaffel voor hun werk in het labo, Jan Gouwy om ons te depanneren met de GIS-kaartjes en Frank Huysentruyt om het rapport na te lezen.

Tot slot nog een knipoog naar de ratten zelf. Levende wezens hebben velen van ons altijd al geïntrigeerd en we kunnen alleen maar vaststellen dat onze fascinatie voor "all creatures great and small" is toegenomen door het bestuderen van de bruine rat. In wezen verschillen ratten niet zoveel van andere in het wild levende dieren. Hun grootste nadeel echter is dat zij graag in de buurt van de mens vertoeven. Wij geloven dan ook dat een goed uitgevoerde bestrijding het beste antwoord is op de conflicten die ontstaan omdat we van hetzelfde bord eten.

## Overzicht

In 2002 werd het onderzoek rond resistentie tegen rodenticiden op basis van anticoagulantia of antistollingsmiddelen in Vlaanderen opgestart. Een literatuurstudie werd al gauw gevolgd door twee periodes waarin ratten afkomstig van verschillende plaatsen in Vlaanderen getest werden op hun resistentie status. Dit rapport behelst dan ook een theoretisch gedeelte maar geeft daarnaast ook vanaf hoofdstuk 5 de resultaten van ons eigen onderzoek weer.

Voor het eigen onderzoek gebeurde het onderscheid tussen gevoelige en resistente ratten in eerste instantie met behulp van bloedstollingstesten. Hierbij kregen de uit het wild afkomstige ratten een kleine hoeveelheid vergif toegediend waarna hun bloedstolling gecontroleerd werd. Bij gevoelige dieren is de bloedstolling dan toegenomen door de werking van het vergif, iets wat bij resistente ratten niet of nauwelijks het geval is. In onze proefopzet werden de actieve bestanddelen warfarine, bromadiolone en difenacoum getest. Warfarine is het allereerste anticoagulans dat als rattenvergif gebruikt werd maar is hier nagenoeg van de markt verdwenen. Uit onze resultaten bleek het echter wel een goede scherprechter te zijn voor het onderscheid tussen gevoelige en resistente dieren. Bromadiolone en difenacoum zijn daarentegen wel courant gebruikte rodenticiden en de resultaten van onze testen zijn dan ook praktisch waardevol.

In een later stadium werd ons onderzoek aangevuld met genetische analyses, mede geïnspireerd door de evoluties op internationaal niveau. Hierbij werd gezocht naar puntmutaties in het VKORC1 gen. Dit gen codeert voor het enzym vitamine K epoxide reductase (VKOR) wat instaat voor de recyclage van vitamine K in het lichaam en dus ook de bloedstolling. Drie verschillende mutaties verspreid over Vlaanderen werden teruggevonden: Y139F, L120Q en Y139C.

Uit vergelijking van de genetische analyses met de stollingstesten is gebleken dat beide testen een gelijkaardig resultaat gaven. Door de resultaten van beide te combineren konden we aan de drie mutaties verschillende eigenschappen toewijzen.

Los van de stollingstesten en de genetische testen hebben we op een bepaald moment ook gebruik gemaakt van lokaastesten waarbij de ratten op een dieet staan van enkel maar giftig lokaas. Dit leverde ons enkele waardevolle inzichten.

Gebaseerd op het afgelopen onderzoek werd er een screening voor de toekomst uitgewerkt. Hierdoor zal het mogelijk zijn om na te gaan hoe resistentie in Vlaanderen evolueert. Tot slot worden in het laatste hoofdstuk de resultaten op een rijtje gezet met daaraan gekoppeld enkele belangrijke conclusies.

# Inhoudsopgave

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Dankwoord .....</b>                                                      | <b>4</b>  |
| <b>Overzicht .....</b>                                                      | <b>5</b>  |
| <b>Inhoudsopgave .....</b>                                                  | <b>6</b>  |
| <b>Lijst van figuren .....</b>                                              | <b>8</b>  |
| <b>Lijst van tabellen .....</b>                                             | <b>10</b> |
| <b>1 Inleiding .....</b>                                                    | <b>11</b> |
| <b>2 Antistollingsmiddelen of anticoagulantia .....</b>                     | <b>13</b> |
| 2.1 Werkingsmechanisme van anticoagulantia .....                            | 13        |
| 2.2 Actieve stoffen gebruikt in diverse lokazen .....                       | 15        |
| 2.2.1 Eerste generatie: Hydroxycoumarines .....                             | 15        |
| 2.2.1.1 Warfarine .....                                                     | 15        |
| 2.2.1.2 Coumatetralyl .....                                                 | 16        |
| 2.2.2 Eerste generatie: Indaan-dionen .....                                 | 16        |
| 2.2.2.1 Chloorfacinon .....                                                 | 16        |
| 2.2.3 Tweede generatie: Hydroxycoumarines .....                             | 16        |
| 2.2.3.1 Difenacoum .....                                                    | 16        |
| 2.2.3.2 Bromadiolone .....                                                  | 17        |
| 2.2.3.3 Brodifacoum .....                                                   | 17        |
| 2.2.3.4 Flocoumafen .....                                                   | 17        |
| 2.2.4 Difethialon .....                                                     | 18        |
| <b>3 Resistentie en enkele begrippen .....</b>                              | <b>19</b> |
| 3.1 Definities .....                                                        | 19        |
| 3.2 Erfelijkheid en resistentie .....                                       | 19        |
| 3.3 Vitamine K behoefte .....                                               | 19        |
| 3.4 Graad van resistentie, kruisresistentie en resistentie-hiërarchie ..... | 20        |
| 3.5 Mechanisme van resistentie .....                                        | 21        |
| 3.5.1 Farmacodynamische resistentie .....                                   | 21        |
| 3.5.1.1 Het Welsh-type .....                                                | 21        |
| 3.5.1.2 Het Scottish-type .....                                             | 22        |
| 3.5.2 Farmacokinetische resistentie .....                                   | 22        |
| 3.5.3 Voedingsgebonden resistentie .....                                    | 23        |
| 3.5.5 Gedragsgebonden resistentie .....                                     | 23        |
| 3.5.6 Schijnbare resistentie .....                                          | 24        |
| <b>4 Technieken om resistentie op te sporen .....</b>                       | <b>25</b> |
| 4.1 Opnametest .....                                                        | 25        |
| 4.2 Bloedstollingstest .....                                                | 25        |
| 4.3 In vitro VKOR-activiteit .....                                          | 27        |
| 4.4 Genetische analyse .....                                                | 27        |
| <b>5 Bloedstollingstesten .....</b>                                         | <b>29</b> |
| 5.1 Materiaal en Methode .....                                              | 29        |
| 5.1.1 Warfarine-resistentie .....                                           | 29        |
| 5.1.2 Bromadiolone-resistentie .....                                        | 31        |
| 5.1.3 Difenacoum-resistentie .....                                          | 31        |
| 5.2 Resultaten .....                                                        | 31        |
| 5.2.1 Periode 2003-2005 .....                                               | 31        |

|           |                                                                                 |           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.2     | Periode 2006-2010 .....                                                         | 33        |
| <b>6</b>  | <b>Genetisch onderzoek .....</b>                                                | <b>36</b> |
| 6.1       | Inleiding.....                                                                  | 36        |
| 6.2       | Toelichting bij de gebruikte genetische technieken.....                         | 37        |
| 6.2.1     | PCR in combinatie met gel-elektroforese .....                                   | 37        |
| 6.2.2     | Mutatiedetectie via TGCE of Temperature gradiënt capillaire electroforese ..... | 39        |
| 6.2.3     | Sequentieanalyse .....                                                          | 40        |
| 6.3       | Resultaten .....                                                                | 40        |
| <b>7</b>  | <b>Genetica versus Bloedstollingstesten .....</b>                               | <b>43</b> |
| 7.1       | Vergelijking van beide diagnostische testen .....                               | 43        |
| 7.2       | Nood aan een nieuwe afkapwaarde voor de BCR test?.....                          | 44        |
| 7.3       | Uitzonderingen bevestigen de regel .....                                        | 44        |
| 7.4       | Verschillen tussen de mutaties in VKORC1 .....                                  | 45        |
| 7.4.1     | Mutatie 1: Y139F.....                                                           | 45        |
| 7.4.2     | Mutatie 2: L120Q .....                                                          | 46        |
| 7.4.3     | Mutatie 3: L120C.....                                                           | 47        |
| <b>8</b>  | <b>Lokaastesten .....</b>                                                       | <b>48</b> |
| 8.1       | Inleiding.....                                                                  | 48        |
| 8.2       | Werkwijze .....                                                                 | 48        |
| 8.3       | Resultaten .....                                                                | 48        |
| 8.4       | Vervolg lokaastesten.....                                                       | 49        |
| 8.5       | Besluit .....                                                                   | 50        |
| <b>9</b>  | <b>Toekomstige screening .....</b>                                              | <b>51</b> |
| 9.1       | Verkennde analyse periode 2003-2005 .....                                       | 51        |
| 9.2       | Verkennde analyse periode 2006-2010 .....                                       | 52        |
| 9.3       | Logistische regressie en bijkomende analyses .....                              | 54        |
| 9.4       | Steekproefgrootte bepalingen uitgaande voorgaande analyse .....                 | 55        |
| 9.4.1     | Niet geclusterde gegevens.....                                                  | 55        |
| 9.4.1.1   | Groep 1: geen of nagenoeg geen kans op resistentie .....                        | 56        |
| 9.4.1.2   | Groep 2: 40 tot 50% kans op resistentie .....                                   | 56        |
| 9.4.1.3   | Groep 3: ongeveer 30% of 60% kans op resistentie .....                          | 57        |
| 9.4.1.4   | Groep 4: ongeveer 80 % kans op resistentie.....                                 | 57        |
| 9.5       | Steekproefgrootte uitgaande van praktische overwegingen.....                    | 59        |
| <b>10</b> | <b>Slotwoord .....</b>                                                          | <b>60</b> |
|           | <b>Referenties .....</b>                                                        | <b>65</b> |

## Lijst van figuren

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figuur 1: Bloedstollingscascade. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 13 |
| Figuur 2: Vitamine-K-cyclus (naar Thijssen 1995). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 14 |
| Figuur 3: Model voor het vitamine K-epoxide-reductase (VKOR) en de interactie met coumarines. E-SH: actief enzym of reductans, E-SS: inactief enzym of oxidans, K: vitamine K, KO: vitamine-K-epoxide, R: endogene dithiolreductor, C: anticoagulans. Reactiestappen 1: substraatconversie, 2: re-activatie van het enzym (reductie), 3: interactie E-ss en C, 4: re-activatie van het enzym-coumarine-complex (naar Thijssen 1995). ....                                                                                                 | 15 |
| Figuur 4: Structuurformule van warfarine. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 15 |
| Figuur 5: Structuurformule chloorfacinon. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 16 |
| Figuur 6: Structuurformule van bromadiolone.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 17 |
| Figuur 7: Structuurformule van brodifacoum. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 17 |
| Figuur 8: Structuurformule van flocoumafen. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 18 |
| Figuur 9: Structuurformule difethialon. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 18 |
| Figuur 10: Voorbeeld van PCA-calibratiecurve voor vrouwelijke ratten. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 30 |
| Figuur 11: Voorbeeld van een PCA-calibratiecurve voor mannelijke ratten.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 30 |
| Figuur 12: Overzicht van de verspreiding van resistente ratten in Vlaanderen voor de periode van 2003 tot 2005. De bromadiolone resistente ratten waren ook resistent tegen warfarine. De 6 difenacoum resistente ratten waren ook resistent aan warfarine en bromadiolone. Per locatie kunnen meerdere dieren gevangen zijn. In het Demerbekken (rode cirkel) zien we minder bromadiolone resistentie dan warfarine resistentie. ....                                                                                                    | 32 |
| Figuur 13: Samenvoeging van de kaarten in vorige figuur. Hierbij valt het op dat Vlaanderen in 4 zones opgedeeld kan worden. Een centrale zone met nagenoeg enkel gevoelige dieren (groen), 2 zones gekenmerkt door de aanwezigheid van bromadiolone resistente ratten (blauw) en één zone met warfarine resistente ratten (oranje). Difenacoum resistentie (rode stippen) is aanwezig maar eerder zelden. Elk punt staat voor een locatie waarvan minstens één rat werd getest en krijgt de kleur van hoogste vorm van resistentie. .... | 32 |
| Figuur 14: In 2006 werden nog eens 144 ratten getest uit de centrale bekkens om na te gaan of inderdaad geen resistentie voorkwam. Op een rat na in het Denderbekken waren ze allemaal gevoelig.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 33 |
| Figuur 15: Tijdens 2007 werden 63 ratten getest afkomstig van het Leiebekken. Driekwart van de dieren bleek op zijn minst warfarine resistent. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 33 |
| Figuur 16: In de periode van 2008-2009 werden 290 ratten uit het oosten van Vlaanderen getest. Resistentie blijft gebonden aan de twee bekkens Demer en Maas Limburg. In het Netebekken slechts beperkte sporen van resistentie.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 34 |
| Figuur 17: In 2010 werden 351 ratten getest uit vier bekkens in het westen van Vlaanderen: IJzer, Brugse Polders, Leie en Boven Schelde. Het hoogste percentage resistente ratten (80%) vonden we terug in het bekken van de Boven Schelde.....                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 35 |
| Figuur 18: Topologie van vitamine K epoxide reductase (VKOR), een transmembraan proteïne in het endoplasmatisch reticulum van de hepatocyten en van belang in de vitamine K cyclus (naar Tie 2005). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 36 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figuur 19: Verspreiding van de verschillende mutaties in VKORC1 die aanleiding geven tot resistentie binnen Europa (naar Pelz et al. 2005).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 37 |
| Figuur 20: Gelelektroforese na een ARMS-PCR op DNA van 16 ratten. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 38 |
| Figuur 21: Principe van "Temperature gradiënt capillaire electroforese" of TGCE. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 39 |
| Figuur 22 Resultaat van een TGCE elektroforese, de grote piek komt overeen met de homoduplexen, de kleine met de heteroduplexen. Boven: mengeling homozygoot wild type (WW) en homozygoot mutant (MM) rat 684. Midden: homozygoot mutant (MM) rat 684. Onder: heterozygoot mutant (WM) rat 741. ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 40 |
| Figuur 23: Voorbeeld van een DNA sequentie analyse van VKORC1. De bovenste 2 stroken DNA behoren tot het wild type zoals teruggevonden bij gevoelige ratten. In blauw en respectievelijk rood is codon 120 CTG en codon 139 TAT aangeduid. Linksonder is DNA van een homozygoot resistente rat drager van mutatie 1 of TAT-139-TTT zichtbaar, hierbij is de groene piek of DNA-base (A) vervangen door een rode (T). Midden onder en rechtsonder is DNA van een respectievelijk homo- en heterozygoot resistente rat drager van mutatie 2 of CTG-120-CAG afgebeeld. Bij M2M2 is de rode piek (T) vervangen door een groene (A). Bij M2W zijn beide pieken zichtbaar. .... | 41 |
| Figuur 24: Verspreiding van de drie verschillende mutaties in VKORC1 in Vlaanderen.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 42 |
| Figuur 25: Geografisch gezien kan resistentie tegen verschillende producten gekoppeld worden aan het voorkomen van ratten met puntmutaties in VKORC1.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 46 |
| Figuur 26: Beginopstelling van een opnametest met lokaas op basis van bromadiolone (bromabo blok). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 48 |
| Figuur 27: Een opnametest met bromabo blok (bromadiolone) toont aan dat niet alle homozygoot resistente ratten (M1M1) ongevoelig zijn voor het vergif. Drie weken na de test overleefde net geen 20% deze test. Een belangrijk resultaat van deze testen is dat resistente ratten toch lokaasschuwhheid kunnen ontwikkelen na opname van lokaas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 49 |
| Figuur 28: Aantal geteste ratten per locatie 2003-2005. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 52 |
| Figuur 29: Proportie resistente ratten per locatie 2003-2005.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 52 |
| Figuur 30: Aantal geteste ratten per locatie 2006-2010. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 53 |
| Figuur 31: Proportie resistente ratten 2006-2010.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 54 |
| Figuur 32: Voorbeeld van een variogram van de random effecten op schaal van 15 km, periode 2006-2010. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 55 |
| Figuur 33: Overzicht van welke producten aangewezen zijn om resistente ratten te bestrijden.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 64 |

## Lijst van tabellen

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabel 1: Enkele kenmerken van de bruine rat in vergelijking met die van de zwarte rat.....                                                                                                                                                                                                                  | 11 |
| Tabel 2: Structuurformule van coumatetralyl.....                                                                                                                                                                                                                                                            | 16 |
| Tabel 3: Structuurformule difenacoum.....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 17 |
| Tabel 4: Acute orale LD <sub>50</sub> voor tweede generatie coumarine derivaten (naar Buckle 1996).....                                                                                                                                                                                                     | 18 |
| Tabel 5: Resistentiegraad op het niveau van LD <sub>50</sub> bij laboratoriumratten homozygoot voor<br>Rw, afkomstig van 3 verschillende stammen (naar Greaves, 1996).....                                                                                                                                  | 20 |
| Tabel 6: Overzicht van de bestaande bloedstollingstesten (naar Prescott 2007).....                                                                                                                                                                                                                          | 26 |
| Tabel 7: Testdosis gebruikt in de gestandaardiseerde bloedstollingstest (SBCR). Het dubbele<br>van ED <sub>50</sub> wordt als basis gebruikt. Andere meervouden fungeren als een<br>indicator voor de resistentiegraad (naar Prescott, 2007).....                                                           | 27 |
| Tabel 8: Aandeel resistente ratten per rivierbekken in Vlaanderen gedurende twee<br>openvolgende periodes. W-res= warfarine resistent, %res=<br>percentage warfarine resistentie.....                                                                                                                       | 34 |
| Tabel 9: Overzicht van de verschillende mutaties in VKORC1 bij ratten, muizen en de mens.<br>Voor elke mutatie is weergegeven op welke plaats ze zich bevindt, welke DNA-base<br>gewijzigd is en welk aminozuur hierdoor gewijzigd is in het enzym VKOR (naar<br>Pelz et al. 2005).....                     | 38 |
| Tabel 10: In bekkens met een hoger percentage resistente ratten (%res) zien we ook de<br>proportie homozygote ratten toenemen (2010). ....                                                                                                                                                                  | 41 |
| Tabel 11: De relatie tussen warfarine resistentie gebaseerd op bloedstollingstesten en de aan-<br>en afwezigheid van mutatie in VKORC1. ....                                                                                                                                                                | 43 |
| Tabel 12: Sensitiviteit en specificiteit in functie van de PCA ter bepaling van de cut off, w/m:<br>aantal wild type/mutanten dieren die afnemen/toenemen vanaf PCA 17, TP: echt<br>positieven, FP: vals positieven, TN: echt negatieven, FN: vals negatieven, se:<br>sensitiviteit, sp: specificiteit..... | 44 |
| Tabel 13: Overzicht van het aantal gevoelige en resistente ratten volgens de BCR resultaten<br>voor warfarine, bromadiolone en difenacoum, opgedeeld per mutatie en homo-<br>en heterozygoten. ....                                                                                                         | 46 |
| Tabel 14: Verdeling van de resistente ratten per bekken 2003-2005. ....                                                                                                                                                                                                                                     | 51 |
| Tabel 15: Aantal locaties met hetzelfde aantal ratten en het aantal gemengde locaties met<br>zowel gevoelige als resistente ratten.....                                                                                                                                                                     | 51 |
| Tabel 16: Gevoelige en resistente ratten in de verschillende bekkens 2006-2010.....                                                                                                                                                                                                                         | 53 |
| Tabel 17: Aantal locaties met hetzelfde aantal ratten en het aantal gemengde locaties met<br>zowel gevoelige als resistente ratten 2006-2010. ....                                                                                                                                                          | 54 |
| Tabel 18: Benodigde steekproefgrootte per screening om een stijging van p1 naar p2 te<br>detecteren, bij gegeven $\alpha$ en $1-\beta$ .....                                                                                                                                                                | 56 |
| Tabel 19: Overzicht van de te detecteren toename of afname (delta) in functie van de<br>jaarlijkse steekproefgrootte (35, 100, 300), $\alpha$ en power.....                                                                                                                                                 | 58 |

# 1 Inleiding

In 2002 werd op vraag van de Afdeling Operationeel Waterbeheer (AOW) van de Vlaamse Milieu Maatschappij (toen nog de Vlaamse administratie Afdeling Water) het onderzoek rond de resistentie tegen rodenticiden opgestart. AOW is binnen de Vlaamse overheid verantwoordelijk voor de bestrijding van de bruine rat, muskusrat en beverrat langsheen waterlopen en sinds kort ook voor de bestrijding van de bruine rat langs gewestwegen en autostradeparkings.

De bruine rat is een commensaal knaagdier en houdt zich vooral op in de buurt van de mens. Het is ergens in de 18<sup>e</sup> eeuw dat deze soort zich hier in onze contreien vestigt (Ervynck et al. 1991). Oorspronkelijk leefde de bruine rat in Azië, meer bepaald in de Mongoolse steppe, en is ze vermoedelijk via toenemend handsverkeer tussen Europa en Azië hier terecht gekomen. Door hun gedrag en het feit dat ze verkiezen in de nabijheid van de mens te leven, vormen ze voor ons mensen een bron van heel wat ergernis. Dit gaat van overdracht van ziekten naar mensen maar ook naar huisdieren, het bevuilen of verorberen van voedselvoorraden tot knaag- en graafschade (Meehan 1984, Gratz 2006, Heyman et al. 2009).

| <b>bruine rat</b> ( <i>Rattus norvegicus</i> )                                      | <b>zwarte rat</b> ( <i>Rattus rattus</i> )                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| kop-romp 160-270 mm                                                                 | kop-romp 160-235 mm                                                                  |
| buik : wit met grijze ondervacht                                                    | buik : uniform (wit, vaalgeel, grijs)                                                |
| staart 125-230 mm                                                                   | staart 186-250 mm                                                                    |
| staart $\leq$ kop-romp                                                              | staart $>$ kop-romp                                                                  |
| gewicht 140-500 g                                                                   | gewicht 135-250 g                                                                    |
| maximaal 550 g                                                                      | maximaal 300 g                                                                       |
| oren dik, klein en weinig behaard                                                   | oren dun en groot, nagenoeg kaal                                                     |
| uitwerpselen spoelvormig (20 mm)                                                    | uitwerpselen worstvormig (15 mm)                                                     |
|  |  |

Tabel 1: Enkele kenmerken van de bruine rat in vergelijking met die van de zwarte rat.

De bestrijding van de bruine rat gebeurt dan ook al langer dan vandaag en is voornamelijk gebaseerd op het gebruik van mechanische vangmiddelen en giftig lokaas. Sinds het einde van de jaren 1940 is de bestrijding steeds meer geëvolueerd naar het gebruik van rodenticiden gebaseerd op anticoagulantia of antistollingsmiddelen. Toen kwam voor het eerst warfarine als actieve stof van een rodenticide op de markt (Frantz & Padula 1998). Warfarine is een synthetisch coumarine derivaat afgeleid van dicoumarol dat in de jaren

1920 ontdekt werd na uitbraken van een lethale haemorrhagische ziekte bij runderen. De bron van deze ziekte was een intoxicatie met beschimmeld hooi van akkerhoningklaver waarbij schimmels het in de klaver van nature aanwezige coumarol omgezet hadden tot dicoumarol (Thijssen 1995, Last 2002).

Daarnaast wordt warfarine nog steeds gebruikt als belangrijkste bloedverdunner in de humane geneeskunde. Aangewezen bij verhoogd risico op trombosevorming zoals na een operatie of bijvoorbeeld bij hart- en bloedvaatziekten.

Warfarine veroorzaakt fatale bloedingen bij ratten na meervoudige opnames. Een groot voordeel van het gebruik van warfarine als rodenticide is dat er door de trage werking van het vergif algemeen aangenomen wordt dat ratten geen verband leggen tussen opname van het lokaas en de uiteindelijke vergiftigingsverschijnselen (Buckle 1996). Een ander belangrijk voordeel is dat een accidentele opname behandeld kan worden met een antidoot, vitamine K1. Het succes had tot gevolg dat de rattenbestrijding evolueerde tot een bestrijding met enkel en alleen giftige lokazen. Al vlug werden doeltreffende preventieve maatregelen uit het oog verloren (Frantz & Padula 1998).

Het duurde echter niet lang voordat de eerste tekenen van resistentie opdoken. In 1958 vond men voor het eerst warfarine-resistente ratten terug in Schotland (Boyle 1960). In de jaren '60 volgden Wales en Zuid-Engeland (Kerins et al. 2001) en in 1962 vond men ook resistente ratten in Denemarken (Lodal 2001). Begin jaren '70 viel Duitsland te beurt (Pelz et al. 1995) en in 1971 zijn de eerste warfarine-resistente ratten teruggevonden in North Carolina (USA) (Frantz & Padula 1998). Verder werd resistentie waargenomen in Nederland, Frankrijk, Japan, Brazilië (Greaves 1996) en Portugal (MacNicoll & Gill 1987).

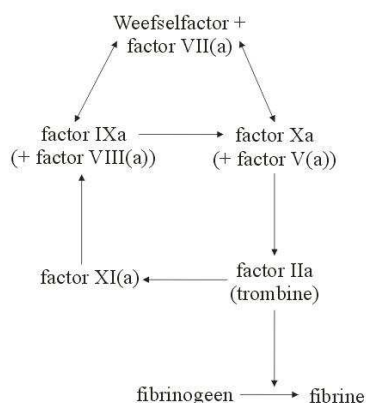
Door de aanwezigheid van warfarine resistente ratten ging de industrie op zoek naar beter werkende anticoagulantia en ontwikkelde men coumachlor, coumatetralyl, difacinon en chloorfacinon, ook gekend als eerste generatie anticoagulantia. Ook tegen deze producten ontstond resistentie waardoor een tweede generatie anticoagulantia ontstond zoals difenacoum, bromadiolone, brodifacoum, difethialone en flocoumafen. Deze anticoaglantia hebben een verhoogde lipofiliteit en dus een langere halfwaardetijd. Dit resulteert in een langere werking waardoor ook warfarine resistente ratten bestreden kunnen worden (Atterby et al. 2001), echter met het nadeel dat ze door deze verlengde werking een reëel gevaar voor primaire intoxicatie van niet doelsoorten en secundaire intoxicatie van predatoren vormen (Brakes & Smith 2005, Hoare & Hare 2006, Elmeros 2011). Ook tegen deze laatste anticoagulantia bleef resistentie niet uit (Greaves 1996). Zo zien we bijvoorbeeld dat er in Engeland reeds ratten resistent zijn aan zowel difenacoum als bromadiolone en zelfs aan brodifacoum (Gill et al. 1992, Kerins et al. 2001). Nochtans behoort bromadifacoum samen difethialone en flocoumafen tot de krachtigste tweede generatie anticoagulantia.

## 2 Antistollingsmiddelen of anticoagulantia

### 2.1 Werkingsmechanisme van anticoagulantia

Anticoagulantia zijn vitamine-K-antagonisten en binden met het enzym vitamine K epoxidereductase (VKOR) en verhinderen hierdoor de bloedstolling. De bloedstolling is een complex gebeuren, waarbij verschillende stollingsfactoren elkaar activeren. Stollingsfactoren zijn eiwitsplitsende enzymen (serineproteases), die eiwitten op zeer specifieke plaatsen doorknippen (limited proteolysis). Het gevormde enzym is dus een actief fragment. Als bijproduct worden er ook een of meer inactieve peptiden gevormd. De cascade (zie figuur 1) start wanneer tromboplastine (weefselfactor) zich bindt met factor VIIa, waarvan reeds kleine hoeveelheden in het bloed aanwezig zijn. Factor VII activeert dan zichzelf (positieve feedback). Het activeert tevens factor X tot Xa, waarbij factor V een co-factor is en ook factor IX tot IXa, waarbij factor VIII dan een co-factor is. Het complex XaV(a) activeert factor II (protrombine) tot IIa (trombine). Trombine activeert factor XI tot XIa, dat op zich weer factor IXa kan aanmaken en activeert ook factor VIII tot VIIIa en factor V tot Va, wat de werking van de desbetreffende complexen sterk doet toenemen.

Trombine zet uiteindelijk fibrinogeen om in fibrine door het fibrinogeen op te splitsen, waardoor er een fibrine-monomeer ontstaat. Deze polymeriseert dan spontaan tot een fibrinedraad. Deze draden vormen een netwerk van fibrine door het toedoen van factor XIIIa, eveneens geactiveerd door trombine (von dem Borne 1996, Bouma 2000).

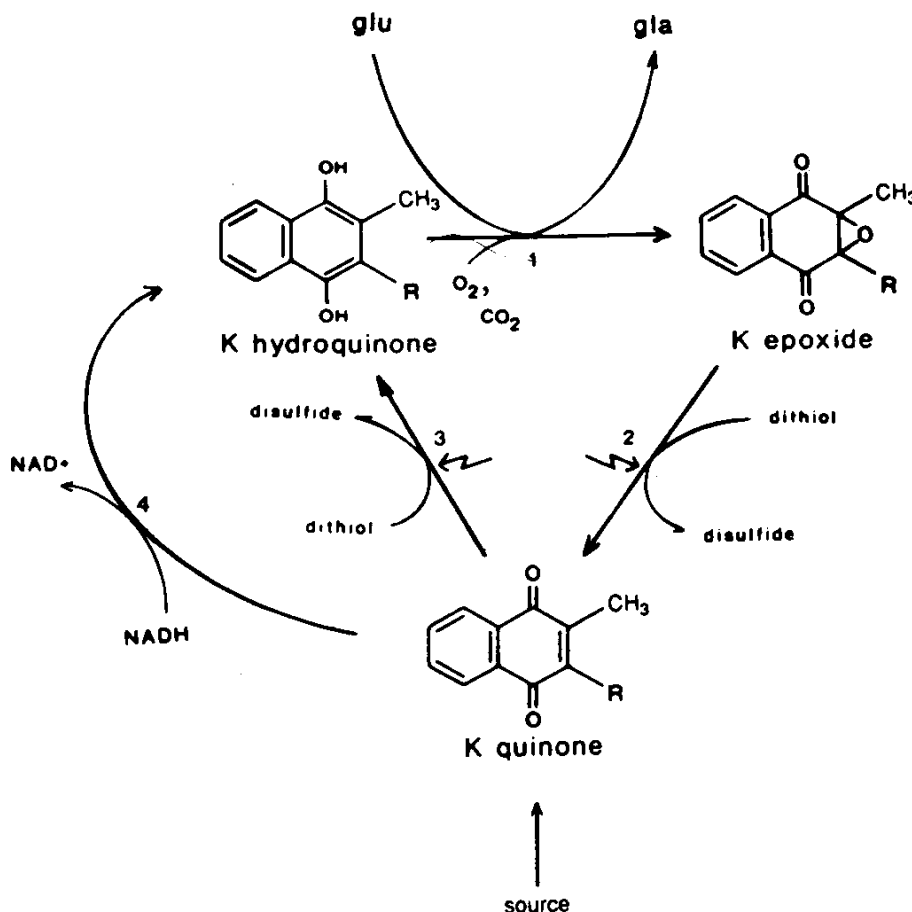


Figuur 1: Bloedstollingscascade.

Voor de activatie van een viertal stollingsfactoren (factor II, VII, IX en X) is vitamine K als co-factor nodig. Elk precursoreiwit van zo'n stollingsfactor bezit een aantal (10-12) glutamaatresiduen die bij activatie tot gamma-carboxyglutaminezuur gecarboxyleerd worden, waardoor het eiwit veel gemakkelijker bindt met  $\text{Ca}^{2+}$ . Hierdoor kan bv. protrombine zich verankeren met de negatief geladen fosfolipiden van de bloedplaatjes en komt het zo in contact met de factoren Xa en Va, waardoor het geactiveerd wordt tot trombine (Oldenburg et al. 2008).

Tijdens de carboxylering wordt vitamine K hydroquinone ( $\text{KH}_2$ ) geoxideerd tot vitamine K epoxide ( $\text{KO}$ ), dat op zijn beurt door VKOR over vitamine K quinone ( $\text{K}$ ) tot vitamine K hydroquinone gereduceerd wordt. Dit recyclagemechanisme laat toe dat elke vitamine K molecule 1000 tot 10.000 maal gebruikt wordt. De cyclus van vitamine K lokaliseert zich voornamelijk ter hoogte van het ruw endoplasmatisch reticulum in de hepatocyten.

Meer specifiek verhinderen anticoagulantia de dithiol co-factorafhankelijke reductasereacties (zie reactie 2 en 3, figuur 2). Ze verstoren bijgevolg de vitamine K cyclus, wat resulteert in de vorming van niet-functioneel of onvoldoende gecarboxyleerd protrombine en andere stollingsfactoren en in een accumulatie van vitamine-K-2,3-epoxide in de lever en het plasma. Aangezien circulerende bloedstollingsfactoren slechts traag afgebroken worden, duurt het even alvorens de bloedstollingsactiviteit onder de kritieke ondergrens duikt die noodzakelijk is voor het behoud van de hemostase (Kerins & MacNicol 1999).

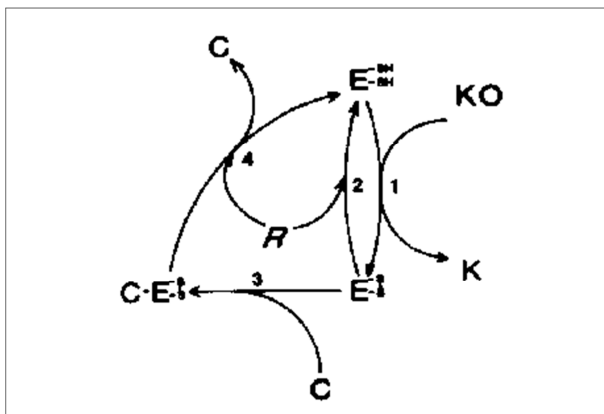


Figuur 2: Vitamine-K-cyclus (naar Thijssen 1995).

Naast de voorgaande reactie die gebruik maakt van het VKOR, komt er nog een alternatieve route voor die gebruik maakt van NAD(P)H-afhankelijk vitamine K reductase en die ongevoelig is voor inwerking van anticoagulantia (zie reactie 4, figuur 2). Deze reactieweg beschikt echter over een lage affiniteit voor vitamine-K-quinone, zodat men zeer hoge vitamine-K-spiegels nodig heeft om de reacties die instaan voor de carboxylering te voorzien van de nodige vitamine-K-hydroquinone. Dit reductase is bijgevolg enkel belangrijk wanneer farmacologische doses van vitamine K gebruikt worden, zoals bijvoorbeeld bij antidotering.

Het moleculaire mechanisme van de interactie tussen VKOR en het anticoagulans is grotendeels ongekend. Het zuivere enzym werd pas 34 jaar na zijn ontdekking in 2006 voor het eerst geïsoleerd (Chu et al. 2006). VKOR zou een redox-actieve dithiolfunctie bevatten, die in de reductie van het substraat betrokken is (zie figuur 3). De 4-hydroxycoumarines binden quasi irreversibel aan het geoxideerde enzym. De endogene dithiolreductor reageert slechts zeer langzaam met het enzym-inhibitor-complex om het actief enzym en het

anticoagulans opnieuw vrij te stellen. Het vrijgestelde coumarine zal vervolgens opnieuw binden aan het gereoxideerde enzym, wat de persistentie van coumarine in de microsomen van de lever aanzienlijk verlengt. De levermicrosomen zouden ook selectieve, verzadigbare bindingsplaatsen bezitten voor de 4-hydroxycoumarines en er is substantieel bewijs dat deze bindingsplaats vergelijkbaar of misschien zelfs identiek is aan VKOR (Thijssen 1995).



Figuur 3: Model voor het vitamine K-epoxide-reductase (VKOR) en de interactie met coumarines. E-SH: actief enzym of reductans, E-SS: inactief enzym of oxidans, K: vitamine K, KO: vitamine-K-epoxide, R: endogene dithiolreductor, C: anticoagulans. Reactiestappen 1: substraatconversie, 2: re-activatie van het enzym (reductie), 3: interactie E-ss en C, 4: re-activatie van het enzym-coumarine-complex (naar Thijssen 1995).

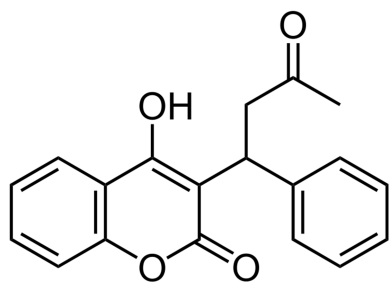
## 2.2 Actieve stoffen gebruikt in diverse lokazen

Enkel de actieve stoffen van rodenticiden die opgenomen zijn in de lijst van de toegelaten biociden van de FOD Volksgezondheid, Veiligheid van de voedselketen en Leefmilieu worden hier kort besproken.

### 2.2.1 Eerste generatie: Hydroxycoumarines

#### 2.2.1.1 Warfarine

Warfarine, 4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)coumarine [81-81-2],  $C_{19}H_{16}O_4$ , was het eerste en meest verspreide rodenticide. Het product kwam eind jaren '40 op de markt en kende een immens succes.



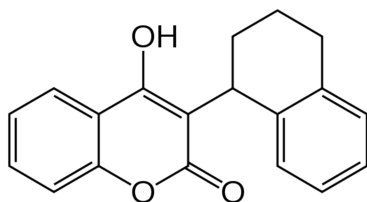
Figuur 4: Structuurformule van warfarine.

De acute orale LD<sub>50</sub> (=dosis waarbij de helft van de geteste dieren sterft) van warfarine bij de bruine rat varieert nogal in de literatuur van 1,5 tot 323 mg/kg (Buckle 1996) maar volgens de meest betrouwbare resultaten ligt deze tussen 10 en 20 mg/kg (Meehan 1984).

Oorspronkelijk bleek de bruine rat zeer gevoelig voor dit product, al gauw was er echter sprake van warfarine resistentie ontwikkeling.

#### 2.2.1.2 Coumatetralyl

Coumatetralyl, 4-hydroxy-3-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthyl)coumarine [5836-29-3],  $C_{19}H_{16}O_3$ , werd in 1956 op de markt gebracht en is momenteel een van de meest verspreide eerste generatie anticoagulantia. De acute orale  $LD_{50}$  bij de bruine rat wordt geschat op 16,6 mg/kg, terwijl de chronische  $LD_{50}$  ligt bij een dagelijkse dosis van 0,3 mg/kg gedurende 5 dagen.

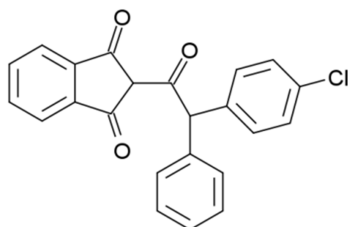


Tabel 2: Structuurformule van coumatetralyl.

### 2.2.2 Eerste generatie: Indaan-dionen

#### 2.2.2.1 Chloorfacinon

Chloorfacinon, 2-[2-(4-chlorophenyl)-2-phenylacetyl]indaan-1,3-dion [3691-35-8],  $C_{23}H_{15}ClO_3$ , werd in 1961 gelanceerd en wordt nu wereldwijd gebruikt. De acute orale  $LD_{50}$  bij de bruine rat bedraagt 20,5 mg/kg. Meehan (1984) constateerde dat chloorfacinon iets beter werkte dan warfarine. Chloorfacinon zou niet louter een anti-bloedstollende werking hebben, aangezien het in staat zou zijn om de oxidatieve fosforylatie te ontkoppelen bij een nog niet nader bepaalde dosis. Deze stof werd in Vlaanderen veel gebruikt voor de bestrijding van muskusratten.



Figuur 5: Structuurformule chloorfacinon.

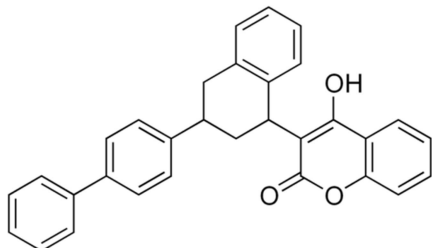
### 2.2.3 Tweede generatie: Hydroxycoumarines

Deze stoffen zijn gekenmerkt door een langere halfwaardetijd en dus een langere werking na opname.

#### 2.2.3.1 Difenacoum

Difenacoum, 3-(3-biphenyl-4-yl-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthyl)-4-hydroxycoumarine [56073-07-5],  $C_{31}H_{24}O$ , bleek volgens de eerste resultaten zeer efficiënt te zijn bij warfarine gevoelige en resistente ratten uit Wales. Het kwam dan ook als eerste van de tweede generatie anticoagulantia op de markt in 1976.

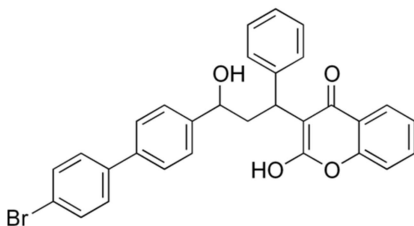
Difenacoum bleek minder toxisch te zijn voor 'non-target'-dieren dan voor 'target'-dieren (acute orale LD<sub>50</sub>: voor varkens >50 mg/kg, voor honden 50 mg/kg, voor katten 100mg/kg en voor kippen 50 mg/kg). De smakelijkheid van dit product zou niet al te hoog zijn. Reeds in 1978 werd in Hampshire difenacoum resistentie ontdekt.



Tabel 3: Structuurformule difenacoum.

#### 2.2.3.2 Bromadiolone

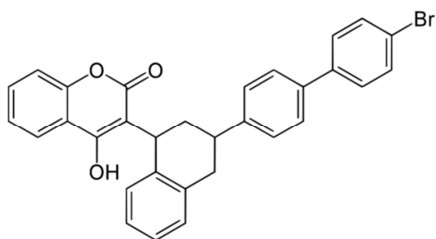
Bromadiolone, 3-[3-(4'-bromobiphenyl-4-yl)-3-hydroxy-1-phenylpropyl]-4-hydroxycoumarine [28772-56-7], C<sub>30</sub>H<sub>23</sub>BrO<sub>4</sub>, kwam in 1976 op de markt. Dit product zou zeer smakelijk zijn voor ratten. Resistentie tegenover bromadiolone werd reeds op verschillende plaatsen vastgesteld in Denemarken (Lund 1984, Lodal 2001), Duitsland (Pelz 2001) en Zuid-Engeland (Kerins et al. 2001).



Figuur 6: Structuurformule van bromadiolone.

#### 2.2.3.3 Brodifacoum

Brodifacoum, 3-[3-(4'-bromobiphenyl-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthyl]-4-hydroxy-coumarine [56073-10-0], C<sub>31</sub>H<sub>23</sub>BrO<sub>3</sub>, is het krachtigste van de tweede generatie anticoagulantia (zie tabel 4) en kwam in 1979 op de markt. Reeds na 24 uur blootstelling aan lokaas met brodifacoum sterven zowel warfarine resistente als gevoelige ratten.

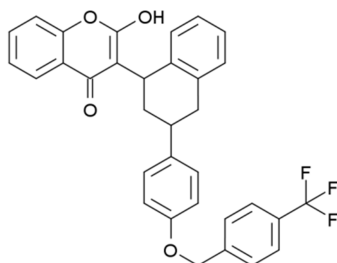


Figuur 7: Structuurformule van brodifacoum.

#### 2.2.3.4 Flocoumafen

Flocoumafen, 4-hydroxy-3-[1,2,3,4-tetrahydro-3-[4-(4-trifluoromethylbenzyloxy)phenyl]-1-naphthyl]coumarine [90035-08-8], C<sub>33</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, werd in 1984 geïntroduceerd en is bijzonder krachtig. Het product is minder toxisch voor 'non-target'-vogels dan voor knaagdieren, maar

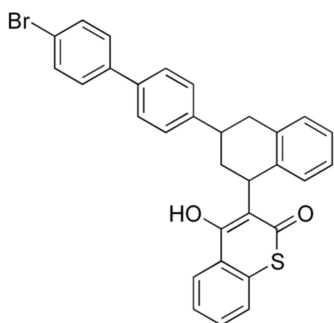
blijkt wel gevaarlijk te zijn voor honden (LD<sub>50</sub> van 0,075 à 0,25 mg/kg). Flocoumafen blijkt zeer effectief te zijn bij populaties die reeds resistentie vertonen ten opzichte van andere anticoagulantia (Buckle 1996).



Figuur 8: Structuurformule van flocoumafen.

## 2.2.4 Difethialon

Difethialon, 3-[(1RS,3RS,1RS,3SR)-3-(4'-bromobiphenyl-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthyl]-4-hydroxy-1-benzothi-in-2-one [104653-34-1], C<sub>31</sub>H<sub>23</sub>BrO<sub>2</sub>S, is het meest recent geïntroduceerde anticoagulans (Lechevin 1988).



Figuur 9: Structuurformule difethialon.

Brodifacoum, flocoumafen en difethialon zijn ook gekend als 'single bait' lokaas, omdat ze ook na een eenmalige opname effectief kunnen zijn. Voor het gebruik van deze stoffen als lokaas gelden daardoor vaak extra wettelijke restricties.

| Actieve stof | bruine rat | huismuis | zwarte rat |
|--------------|------------|----------|------------|
| difenacoum   | 1,8        | 0,8      |            |
| bromdiolone  | 1,1-1,8    | 1,75     |            |
| brodifacoum  | 0,22-0,27  | 0,4      | 0,65-0,73  |
| flocoumafen  | 0,25-0,56  | 0,79-2,4 | 1,0-1,8    |
| difethialon  | 0,56       | 1,29     |            |

Tabel 4: Acute orale LD<sub>50</sub> voor tweede generatie coumarine derivaten (naar Buckle 1996).

## 3 Resistentie en enkele begrippen

### 3.1 Definities

We spreken van resistentie wanneer een anticoagulans een groot deel van zijn werkzaamheid verliest onder veldcondities, niettegenstaande correct gebruik van het anticoagulans. Het verlies aan werking is te wijten aan de aanwezigheid van een populatie ratten met een erfelijke en vergelijkbare verminderde gevoeligheid aan het anticoagulans (Greaves 1996). In een handleiding over de evaluatie van gewasbeschermingsmiddelen van de 'European and Mediterranean Plant Protection Organization' (OEPP/EPPO 1995) vonden we volgende definitie "Individuele in een resistente populatie overleven een dosis van een rodenticide, die ratten van een gevoelige populatie zou doden, daarenboven moet deze eigenschap erfelijk zijn". Beide definities hechten belang aan de erfelijke factor van resistentie maar deze van Greaves legt toch meer de nadruk op het praktische effect voor de bestrijding terwijl deze van EPPO ook beperkte vormen van resistentie kan omvatten.

### 3.2 Erfelijkheid en resistentie

Studies van Greaves & Ayres in 1967 (Greaves 1996) deden vermoeden dat warfarine resistentie bij de bruine rat monogeen, dominant en autosomaal overerft. Het resistentie-gen 'Rw' ligt op chromosoom 1 en is gelinkt aan de merkgenen fuzzy (fz), albinisme (c) en pink-eyed dilution (p). Ondanks het feit dat de genetische gegevens wezen in de richting van een 'single-locus'-controle van overerving, suggereren fenotypische verschillen tussen verscheidene geografische kweeklijnen dat meerdere resistentie-allelen in een populatie aanwezig kunnen zijn. Pelz *et al.* (2005) toonden aan dat voor de bruine rat 7 verschillende puntmutaties in het VKORC1 gen bijdragen tot resistentie.

Genotypische complexiteit die een of meer loci bevat, kan uiteindelijk leiden tot een complexe fenotypische resistentieweergave. Zo vonden ze bijvoorbeeld bij het Hampshire-type dominante warfarine resistentie, maar recessieve of onvolledig recessieve difenacoum-resistentie (Greaves 1996).

Wanneer rattenvangers in een bestrijdingssituatie te maken krijgen met een bepaalde vorm van resistentie, dan zullen ze doordat de resistente ratten in het voordeel zijn ongewild selecteren op resistentie. Onder omstandigheden zonder bestrijding bleken sommige resistente dieren echter in het nadeel door hun verhoogde vitamine K behoefte of schuchterheid. De relatieve fitness van homozygoot resistente, heterozygoot resistente en gevoelige ratten in afwezigheid van anticoagulantia is geschat op respectievelijk 0,46, 0,77 en 1 (Greaves 1996). Dit zou tot gevolg hebben dat resistente ratten indien ze niet bestreden worden op termijn uit de populatie verdwijnen.

### 3.3 Vitamine K behoefte

Vitamine K is niet alleen van belang voor de activatie van stollingsfactoren maar ook voor verschillende eiwitten die men in been-, nier- en andere weefsels terugvindt. Dit heeft tot gevolg dat bij resistente ratten door de verhoogde vitamine K behoefte ook de groei beïnvloed wordt. Dit resulteert dan in een gewijzigde hiërarchie in de populatie, al is het niet duidelijk of dit nu een voor- of een nadeel is (Smith *et al.* 1991, 1993).

De verhoogde vitamine-K-behoefte, wat als een pleiotroop effect van het resistentie-gen beschouwd kan worden, is voor het eerst vastgesteld door Hermodson *et al.* (1969). Zij vonden dat heterozygoot resistente ratten (Welsh-type) ongeveer een twee- tot drievoudige vitamine K behoefte hadden ten opzichte van gevoelige ratten. Voor homozygoot resistente ratten bleek dit zelfs een twintigvoudige behoefte. Let wel op dat het hier niet ging om een

dagelijkse behoefte, maar om de dosis nodig om te herstellen van een ernstige hypoprothrombinemie. Zo ook toonde Greaves & Ayres (1973) aan dat de dagelijkse behoefte inderdaad duidelijk hoger lag voor homozygoot resistente ratten, maar dat er zo goed als geen verschil is in behoefte tussen heterozygoot resistente en gevoelige ratten. Dit werd nogmaals bevestigd in een recente Duitse studie waarbij slechts 20% van heterozygoot resistente ratten een verhoogde vitamine K behoefte had. In diezelfde studie bleek resistentie ook een negatieve invloed te hebben op de nestgrootte (Jacob et al. 2011). Dit betekent dat in geval van bestrijding, het de heterozygoot resistente ratten zijn die de beste overlevingskansen hebben. In een regio met aanhoudende bestrijding waar het percentage resistentie gedurende 9 jaar rond de 40 % schommelde, werd de relatieve fitness van homozygoot resistente, heterozygoot resistente en gevoelige ratten geschat op respectievelijk 0,37, 1,00 en 0,68 (Greaves 1996).

### 3.4 Graad van resistentie, kruisresistentie en resistentiehiërarchie

Het is aannemelijk dat een 1000-voudig verlies van toxiciteit een groter praktisch nadeel vormt dan een 5-voudig verlies. Vandaar dat het belangrijk kan zijn om de graad van resistentie te bepalen na het vaststellen van resistentie. De graad van resistentie wordt bepaald door de respons op een bepaald anticoagulans te vergelijken tussen gevoelige en resistente dieren. Dit kan op basis van de verhouding LD<sub>50</sub> voor beide groepen of op basis van een veelvoud van de testdosis gebruikt in de stollingstesten (zie verder).

Resistentiegraad = LD<sub>50</sub> resistente ratten / LD<sub>50</sub> gevoelige ratten

Wanneer ratten resistent zijn aan twee verschillende anticoagulantia zonder dat ze met een van beide in contact gekomen zijn, dan spreken we over kruisresistentie. De graad van kruisresistentie bekomt men door de resistentiegraden van beide stoffen te vergelijken. Uit studies uit het verleden over kruisresistentie, blijkt dat dieren die resistent zijn aan warfarine een gelijkaardige graad van resistentie vertonen aan de andere anticoagulantia van de eerste generatie. Maar vaak een lagere en soms een onbelangrijke graad van resistentie bezitten tegen de anticoagulantia van de tweede generatie (Greaves 1996).

| Anticoagulans | Geslacht | Resistentiegraad |          |           |
|---------------|----------|------------------|----------|-----------|
|               |          | Welsh            | Scottish | Hampshire |
| Warfarine     | M        | 97,1             | 51,5     | -         |
|               | V        | 2296,3           | 115,9    | -         |
| Coumatetralyl | M        | 33,7             | 34,0     | -         |
|               | V        | 168,5            | 56,2     | -         |
| Difenacoum    | M        | 1,3              | 3,4      | 3,9       |
|               | V        | 1,1              | 2,7      | 4,1       |
| Bromadiolone  | M        | 2,7              | 2,3      | 1,5       |
|               | V        | 6,9              | 2,5      | 2,9       |
| Brodifacoum   | M        | 1,0              | 2,5      | 2,0       |
|               | V        | 1,1              | 2,7      | 2,0       |

Tabel 5: Resistentiegraad op het niveau van LD<sub>50</sub> bij laboratoriumratten homozygoot voor Rw, afkomstig van 3 verschillende stammen (naar Greaves, 1996).

Afhankelijk van de resistentiegraad of de mate waarin ratten resistent zijn aan verschillende anticoagulantia kan je deze ordenen volgens een bepaalde hiërarchie ook gekend als de resistentiehiërarchie. Pelz et al. (1995) rangschikken de anticoagulantia als volgt: warfarine/chloorfacinon < bromadiolone/coumatetralyl < difenacoum < brodifacoum/flocoumafen/difethialone.

Een belangrijk aspect hierbij is het onderscheid tussen praktische en technische resistentie waarbij praktische resistentie eerder met de definitie van Greaves overeenkomt en technische resistentie met deze van de EPPO (zie 3.1 Definities). Als we spreken van praktische resistentie, dan impliceert dit dat de dieren een hoge tot zeer hoge resistentiegraad hebben en dus in veldomstandigheden niet bestreden kunnen worden met het desbetreffende anticoagulans. Dit zien we vooral bij eerste generatie anticoagulantia zoals warfarine. Bij technische resistentie zien we veel lagere resistentiegraden. Een technisch resistente rat zal dus een klein veelvoud van een normale letale dosis moeten opnemen om verdelgd te worden. Onder praktijkomstandigheden hoeft technische resistentie voor de bestrijding geen probleem te zijn op voorwaarde dat het lokaas goed door de ratten wordt opgenomen.

### 3.5 Mechanisme van resistentie

Thijssen (1995) deelt de soorten resistentie op in 3 groepen, afhankelijk van het systeem waarop de resistentie gebaseerd is:

- farmacodynamische resistentie,
- farmacokinetische resistentie,
- voedingsafhankelijke resistentie.

Brunton *et al.* (1993) en Greaves (1996) voegen er nog 'gedragsgebonden resistentie' aan toe, een groep die samen met voedingsgebonden resistentie misschien de overgang vormt tussen werkelijke resistentie en schijnbare resistentie.

#### 3.5.1 Farmacodynamische resistentie

Deze vorm van resistentie wordt uitgelegd aan de hand van de volgende vier genotypes: het Welsh-type, het Scottish-type, het Hampshire-type en het Chicago-type. Deze 4 types kan men opsplitsen in 2 groepen met een duidelijk verschillende biochemie, waarbij het Hampshire-type, resistent tegen difenacoum en warfarine, hetzelfde systeem volgt als het Welsh-type en het Chicago-type overeenkomt met het Scottish-type (Thijssen 1995, Greaves 1996). Met de meer recentere ontwikkelingen in het onderzoek rond het VKORC1 gen is de opdeling van deze genotypes misschien minder relevant. De terminologie is echter nog wel van belang in de oudere literatuur en wordt daarom hier toch meegegeven. Mutaties in het VKORC1 gen die aanleiding geven tot resistentie vallen echter ook onder farmacodynamische resistentie en kunnen bovendien gekoppeld worden aan deze types (zie verder).

##### 3.5.1.1 Het Welsh-type

De eerste inzichten in het mechanisme achter warfarine resistentie komen van studies met ratten gevangen in Wales. Hermodson *et al.* (1969) vonden dat resistente ratten een verhoogde vitamine K behoefte hebben, wat tot dan het enige significant metabool verschil was tussen normale en warfarine resistente ratten, buiten hun gekende reactie op de anticoagulantia. Hun vermoeden was dat de verhoogde vitamine K behoefte een verklaring kon geven voor de warfarine resistentie, waarbij vitamine K reageert met een eiwit dat noodzakelijk is voor het produceren van de vitamine K afhankelijke stollingsfactoren en in competitie treedt met warfarine voor dezelfde bindingsplaats op het eiwit. Deze bindingsplaats is bij resistente ratten lichtjes gewijzigd, waardoor de affiniteit voor vitamine K licht verminderd is en deze voor warfarine sterk afgenomen is.

Thijssen (1995) rapporteerde dat resistente ratten na toediening van warfarine vitamine K epoxide opstapelden. Deze studie gaf niet alleen een idee aan over hoe resistentie werkte, maar leverde ook het concept van de vitamine K recyclage. Ondertussen hebben verschillende studies aangetoond dat het Welsh-type een VKOR heeft dat veel minder gevoelig is voor de warfarine inhibitie dan dat van normale ratten. Dit geldt ook voor het

vitamine K reductase, dat al dan niet hetzelfde enzym is. Het enzym van het Welsh-type is wel nog gevoelig aan difenacoum en potentere anticoagulantia, waardoor ze een goed alternatief vormen voor de bestrijding van dit type ratten (Thijssen 1995).

Een typisch verschijnsel is dat het enzym in de levers van het Welsh-type het 3(2)-hydroxy-2,3-dihydrovitamine K als intermediair stadium vormt tijdens de reacties. Verder hebben deze ratten een verminderde enzymactiviteit ten opzichte van de gevoelige dieren (ongeveer 25-50 %), wat de hogere vitamine-K-behoefte kan verklaren (Thijssen 1989).

#### 3.5.1.2 *Het Scottish-type*

Na onderzoek bleken de warfarine resistente ratten die in Glasgow (Schotland) aangetroffen werden, van een ander fenotype te zijn dan het Welsh-type. Deze populatie bezat immers een lagere resistentiegraad ten opzichte van warfarine en had geen verhoogde vitamine K behoeften. Deze vorm van warfarine-resistentie kreeg de naam Scottish-type. In vitro studies toonden aan dat het VKOR bij deze dieren even gevoelig is voor warfarine als bij warfarine-gevoelige dieren. In tegenstelling tot het normale enzym bleek de interactie tussen het enzym van resistente dieren en warfarine reversibel te zijn, zodat het enzym-coumarine-complex ook gevoelig blijft voor reactivatie door de dithiolreductor (zie stap 4, figuur 2), waardoor er een voldoende hoeveelheid vrij en actief enzym aanwezig is om aan de behoeftes te voldoen. Een complex van het Scottish-type enzym met difenacoum is echter niet gevoelig voor reactivatie door de dithiolreductor, zodat ook dit rodenticide met succes kan aangewend worden bij deze vorm van warfarine-resistentie.

Een ander genotype van warfarine-resistentie werd aangetoond bij warfarine-resistente ratten uit Chicago. Alle biochemische parameters van dit *Chicago-type* van VKOR, evenals de farmacokinetische interacties met warfarine, komen volledig overeen met het Scottish-type (Thijssen 1995).

### 3.5.2 Farmacokinetische resistentie

De farmacokinetische eigenschappen van een anticoagulans zijn natuurlijk van groot belang voor de werking van het rodenticide. Gewoon al het verschil in werking tussen de eerste en tweede generatie is hier een mooi voorbeeld van. Zo zien we in een studie bij konijnen dat de halfwaardetijd van difenacoum en brodifacoum langer is dan deze van warfarine, maar wel telkens om een andere reden. Zo ziet men dat difenacoum duidelijk een groter distributievolume heeft dan warfarine, maar een gelijke plasma clearance. Brodifacoum daarentegen heeft een even groot distributievolume, maar een sterk verminderde plasma clearance (Breckenridge *et al.* 1985).

Interacties met andere in het lichaam aanwezige chemische componenten kunnen leiden tot een potentialisatie bv. chloramphenicol (Yacobi *et al.* 1984) of inhibitie bv. phenobarbital, (Bachmann & Sullivan 1983) van de werking van het anticoagulans. Zo zullen bijvoorbeeld stoffen die het cytochroom P450 onderdrukken, het effect van brodifacoum versterken. Mogelijk speelt dit ook een rol bij de resistentie van het Hampshire-type tegen difenacoum (Thijssen 1995).

Atterby *et al.* (2001) vinden in hun studie met difenacoum-resistente en gevoelige ratten dat er na toediening van een eenmalige dosis (5 mg/kg) difenacoum een klein verschil is in de plasmaconcentratie van beide types, doch dit kan volgens hen onmogelijk het verschil in resistentie bepalen (factor 12 en 18, respectievelijk voor mannelijke en vrouwelijke ratten, op het niveau van LD<sub>50</sub>). Opvolging van de eliminatie van radioactief gemerkt difenacoum over 60 uur toont aan dat er geen significant kwantitatief of kwalitatief verschil is tussen gevoelige en resistente ratten. In een studie van Hermodson *et al.* (1969) waarbij radioactief warfarine intra-peritoneaal werd toegediend en urine en faeces gedurende 1 week verzameld

werden. Zag men dat na 1 week tijd de extracten van de uitwerpselen van de resistente ratten 53 % van de radioactiviteit bevatten tegenover 50 % bij de gevoelige ratten. Verder stelden ze vast aan de hand van chromatografie, dat de urine van ratten van beide groepen warfarine en 6 warfarine metabolieten in ongeveer dezelfde relatieve hoeveelheid bevat.

Markussen (2008) daarentegen toont aan dat de expressie van cytochroom P450 enzymen verschilt bij Deense gevoelige en resistente ratten. Een vergelijkbaar mechanisme geeft bij bepaalde patiënten in de humane geneeskunde aanleiding tot verminderde/verhoogde medicatie bij de behandeling met warfarine (Yin & Miyata 2007).

Daarnaast beschrijft Wallin (2001) dat een verhoogde enzym activiteit in het endoplasmatisch reticulum van calumenin aanleiding geeft tot warfarine resistentie. Opmerkelijk daarbij is wel dat de door hem gebruikte ratten afkomstig zou zijn van een Britse stam die drager zijn van een mutatie in VKORC1 (Heiberg 2009).

### 3.5.3 Voedingsgebonden resistentie

Warfarine resistentie is mogelijk het gevolg van een verhoogde vitamine K beschikbaarheid in het voedsel. Vitamine K wordt vooral teruggevonden in groene (blad)groenten. In planten is dat dan onder vorm van vitamine K1 of phylloquinone (Damon et al. 2005). Daarnaast hebben we ook nog de menaquinones of vitamine K2 die vooral door darmbacteriën worden aangemaakt (Hill 1997). Naast resorptie in de darm vormt ook coprofagie een goede bron van vitamine K. Wanneer dieren nu in de mogelijkheid verkeren om grote hoeveelheden vitamine K via het voeder op te nemen, zouden zij schijnbaar minder gevoelig zijn voor warfarine (Thijssen 1995). Greaves stelde in 1996 echter dat de hoeveelheid vitamine K in het voedsel echter nooit voldoende hoog kan zijn om als antidoot te werken. Door MacNicoll & Gill werd in 1993 wel aangetoond dat resistente ratten een verhoogde overlevingskans hebben wanneer ze de beschikking hebben over vitamine K3 of menadionnatriumbisulfiet (=synthetisch vitamine K). Menadion wordt frequent aan dierenvoeders toegevoegd in een dosering van ongeveer 5 mg/kg (0-12 mg/kg). Bij een lagere dosis van 1 à 2 mg/kg, verdween dit voordeel en zagen ze geen effect meer op de overlevingskansen.

Een ander voorbeeld van deze vorm van resistentie is het feit dat sommige dieren in staat zijn om voldoende vitamine K te synthetiseren via het NAD(P)H-afhankelijke vitamine K reductase door een mutatie van dit enzym met een verhoogde affiniteit als gevolg.

### 3.5.5 Gedragsgebonden resistentie

Gedragsgebonden resistentie beschrijft de afkeer die ratten vertonen om lokaas te eten waar ze gemakkelijk toegang tot hebben. Verscheidene gedragingen zoals neofobie (=vrees voor alles wat nieuws is) of geconditioneerde en niet-geconditioneerde aversie tegen bepaald lokaas kunnen hiervan aan de basis liggen en er zo verantwoordelijk voor zijn dat de ratten geen lethale dosis vergif opnemen. Het gebruik van de term 'resistentie' is in dit geval eerder metaforisch. Het is immers normaal dat dieren die geen of onvoldoende vergif opnemen niet sterven. We moeten er wel rekening mee houden dat dergelijk ontwijkend gedrag, wat erfelijk kan zijn, de werking van het rodenticide ondermijnt en mogelijk het effect van fysiologische resistentie versterkt (Greaves 1996).

Een gelijkaardig fenomeen stellen Brunton et al. (1993) vast in Hampshire, waar ze resistente ratten op een boerderij probeerden te bestrijden met cholecalciferol, een rodenticide waartegen geen resistentie is. De ratten werden telemetrisch opgevolgd voor en tijdens de proefopstelling en niettegenstaande ze frequent de lokaasplaatsen bezochten, overleefde op zijn minst 20 tot 50 % van de populatie de bestrijdingscampagne. Naast neofobie en associatieve conditionering verdachten ze de ratten ervan in staat zijn om vergif te detecteren en te herkennen.

### 3.5.6 Schijnbare resistentie

Als de bestrijding niet goed lukt wordt er nogal eens vlug aan resistentie gedacht, nochtans zijn er genoeg andere redenen die de falende bestrijding kunnen verklaren. Je zou ze ook kunnen samenvatten onder de term schijnbare resistentie:

- dispersie, eventueel na te gaan aan de hand van telemetrie (Cowan & Townsend 1996),
- alternatieve voedselbron die beter wordt opgenomen dan het aangeboden lokaas,
- verkeerd inschatten van de aanwezige populatie,
- onvoldoende lokaas in hoeveelheid of frequentie van aanbieden,
- ...

## 4 Technieken om resistentie op te sporen

Bij het vermoeden van resistentie bestaan er verschillende technieken om na te gaan of het daadwerkelijk over resistentie gaat. Identificatie van resistentie via deze technieken, onder laboratoriumcondities, hebben niet steeds tot gevolg dat de bestrijdingsmaatregelen zullen falen. In sommige gevallen zal de graad van resistentie laag genoeg zijn, zodat een juist gebruik van het rodenticide toch kan leiden tot een succesvolle controle. Bijkomend onderzoek is nodig voor het bepalen van de resistentiegraad, de erfelijkheid van de resistentie en de invloed van de resistentiestatus op de efficiëntie van de bestrijdingsmethode (EPPO 1995).

De eenvoudigste techniek bestaat eruit om aan de hand van een visuele controle na te gaan of het lokaas gedurende langere tijd dan normaal wordt opgenomen. Gezien de talrijke oorzaken van schijnbare resistentie is dit zeker niet geheel betrouwbaar. Enkele technieken zoals een telling van de populatie voor en na het aanbieden van lokaas, het wegen van het lokaas, de ratten merken met een zender of het lokaas chemisch merken om te zien wat er gebeurt met de ratten die het rodenticide opnemen, kunnen daarbij helpen om in te schatten of er al dan niet sprake is van resistentie (Greaves 1996). Betere technieken onder labocondities zijn de bloedstollingstesten, lokaastesten, genetische testen of een analyse in vitro van het VKOR.

### 4.1 Opnametest

Hierbij worden de ratten gedurende 6 dagen gevoederd met giftig lokaas. Nadien worden de dieren gedurende 21 dagen geobserveerd. Ratten die dit alles overleven en gedurende dag 5 en 6 minstens de helft aten van dag 1 en 2 worden als resistent beschouwd. De gestorven dieren worden gecontroleerd op inwendige bloedingen. De dosis is afhankelijk van het anticoagulans en wordt bepaald door een aantal testen, waarbij men nagaat bij welke dosis 99 % van de testgroep sterft (=LD<sub>99</sub>). Enkele voorbeelden van gepubliceerde LD<sub>99</sub> voor de bruine rat zijn (Greaves 1996, EPPO 1995):

- warfarine: 50 mg/kg
- difenacoum: 50 mg/kg
- brodifacoum: 5 mg/kg

Het voordeel van de test is zijn eenvoudige uitvoering. Enkele nadelen van deze test zijn:

- de onnauwkeurigheid, waardoor subtiele verschillen in resistentie onopgemerkt blijven,
- het aantal vals positieven en negatieven,
- de ratten kunnen maar met 1 anticoagulans getest worden.

### 4.2 Bloedstollingstest

Sinds het vaststellen van resistentie tegen anticoagulantia, heeft men getracht een snelle en betrouwbare test op punt te stellen. De ontdekking dat de enzymatische reductie van vitamine K epoxide minder gevoelig is aan warfarine bij de resistente dan bij de gevoelige ratten, heeft er toe geleid dat er verbeterde methoden zijn ontwikkeld om warfarine resistentie te identificeren. In 1979 stelden Martin et al. voor het eerst een bloedstollingstest (BCR) op punt. Het zijn MacNicoll & Gill die deze test in 1993a licht wijzigen. In hetzelfde jaar ontwikkelden Gill et al. een bloedstollingstest voor difenacoum (1993) en een jaar later een test voor bromadiolone (1994). Verder bestaan er ook gelijkaardige testen voor difacinon en chloorfacinon (Prescott & Buckle 2000), coumatetralyl (Pelz 2001) en brodifacoum (Gill & MacNicoll 1991). Een overzicht van deze testen is opgesomd in tabel 6.

In 2007 beschrijft Prescott de gestandaardiseerde bloedstollingstest (SBCR) die voorgaande testen zou kunnen vervangen.

| Active ingredient | Sex    | Discriminating dose (mg . kg <sup>-1</sup> ) | Type of vitamin K used | Dose of vitamin K (mg . kg <sup>-1</sup> ) | Route administered | Time to PCA | Threshold PCA | Reference                  |
|-------------------|--------|----------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------|--------------------|-------------|---------------|----------------------------|
| Warfarin          | Both   | 5.0                                          | Epoxide                | 1.0                                        | Intraperitoneal    | 24 h        | 17%           | Martin et al. (1979)       |
| Sodium warfarin   | Both   | 5.4                                          | K <sub>3</sub>         | 1.0                                        | Gavage             | 24 h        | 17%           | MacNicol and Gill (1973)   |
| Difenacoum        | Both   | 5.0                                          | K <sub>3</sub>         | 2.0                                        | Gavage             | 96 h        | 10%           | Gill et al. (1993)         |
| Bromadiolone      | Male   | 1.0                                          | K <sub>3</sub>         | 10.0                                       | Gavage             | 96 h        | 10%           | Gill et al. (1994)         |
| Bromadiolone      | Female | 2.4                                          | K <sub>3</sub>         | 10.0                                       | Gavage             | 96 h        | 10%           | Gill et al. (1994)         |
| Diphacinone       | Male   | 1.26                                         | K <sub>3</sub>         | 1.0                                        | Gavage             | 24 h        | 17%           | Prescott and Buckle (2000) |
| Diphacinone       | Female | 1.60                                         | K <sub>3</sub>         | 1.0                                        | Gavage             | 24 h        | 17%           | Prescott and Buckle (2000) |
| Chlorophacinone   | Male   | 0.86                                         | K <sub>3</sub>         | 1.0                                        | Gavage             | 24 h        | 17%           | Prescott and Buckle (2000) |
| Chlorophacinone   | Female | 1.03                                         | K <sub>3</sub>         | 1.0                                        | Gavage             | 24 h        | 17%           | Prescott and Buckle (2000) |

Tabel 6: Overzicht van de bestaande bloedstollingstesten (naar Prescott 2007).

Het algemene principe is voor al deze testen hetzelfde. Er wordt een bepaalde hoeveelheid anticoagulans, eventueel samen vitamine K3 of vitamine-K-epoxide toegediend aan een te testen rat. Na een tussentijd van 24 of 96 uur voor respectievelijk de eerste en tweede generatie anticoagulantia neemt men onder anesthesie (bv. isofluraan) een bloedstaal, vanuit de staartvene of de retro-orbitale plexus. Het bloedstaal mengt men met een tiende natriumcitraat (3,13 %), een anticoagulans dat de calciumionen bindt en daardoor de stolling verhindert. Nadien bepaalt men van het bloedstaal de protrombinetijd (PT) en zet deze PT om via een kalibratiecurve tot een PCA-waarde (percentage stollings activiteit). Indien de bekomen PCA lager is dan de afkapwaarde, dit is het geval bij een langere stollingstijd, dan hebben we te maken met een gevoelige rat. Ligt de waarde boven de afkapwaarde, dan beschouwt men de rat als resistent.

De grote verschillen tussen BCR en SBCR zijn dat men bij de SBCR de PT steeds bepaalt na 24 uur waardoor vooral op farmacodynamische processen gefocust wordt en dat de testdosis bepaalt werd uitgaande van een groep gevoelige ratten. Bovendien maakt de SBCR gebruik van de INR (international normalized ratio) in plaats van PCA, waardoor resultaten tussen verschillende labo's vergeleken kunnen worden. De testdosis voor de SBCR is gebaseerd op ED<sub>99</sub> of de effectieve dosis waarbij 99% van de ratten reageert en de afkapwaarde van INR 5 overschrijdt. Praktisch wordt het dubbelde van de ED<sub>50</sub> als test/startdosis genomen. Andere meervouden kunnen gebruikt worden voor de bepaling van de resistentiegraad (zie tabel 7).

Bloedstollingstesten hebben het voordeel tegenover lokaastesten dat ze sneller resultaat geven en dat ze nauwkeuriger zijn. Bovendien geven ze een idee van de resistentiegraad en blijven de dieren leven zodat verder onderzoek mogelijk blijft.

|                 |        | ED <sub>50</sub>       | test dose = multiple of the ED <sub>50</sub> |      |      |      |
|-----------------|--------|------------------------|----------------------------------------------|------|------|------|
| Anticoagulant   | Sex    | (mg.kg <sup>-1</sup> ) | x 2                                          | x 4  | x 8  | x 16 |
| warfarin        | male   | 1.51                   | 3.02                                         | 6.0  | 12.1 | 24.2 |
| warfarin        | female | 2.13                   | 4.26                                         | 8.5  | 17.0 | 34.1 |
| diphacinone     | male   | 0.86                   | 1.72                                         | 3.4  | 6.9  | 13.8 |
| diphacinone     | female | 1.12                   | 2.24                                         | 4.5  | 9.0  | 17.9 |
| chlorophacinone | male   | 0.54                   | 1.08                                         | 2.2  | 4.3  | 8.6  |
| chlorophacinone | female | 0.67                   | 1.34                                         | 2.7  | 5.4  | 10.7 |
| coumatetralyl   | male   | 0.36                   | 0.72                                         | 1.4  | 2.9  | 5.8  |
| coumatetralyl   | female | 0.44                   | 0.88                                         | 1.8  | 3.5  | 7.0  |
| bromadiolone    | male   | 0.47                   | 0.94                                         | 1.9  | 3.8  | 7.5  |
| bromadiolone    | female | 0.61                   | 1.22                                         | 2.4  | 4.9  | 9.8  |
| difenacoum      | male   | 0.65                   | 1.30                                         | 2.6  | 5.2  | 10.4 |
| difenacoum      | female | 0.79                   | 1.58                                         | 3.2  | 6.3  | 12.6 |
| difethialone    | male   | 0.43                   | 0.86                                         | 1.72 | 3.44 | 6.88 |
| difethialone    | female | 0.49                   | 0.98                                         | 1.96 | 3.92 | 7.84 |
| flocoumafen     | male   | 0.29                   | 0.58                                         | 1.16 | 2.32 | 4.64 |
| flocoumafen     | female | 0.34                   | 0.68                                         | 1.36 | 2.72 | 5.44 |
| brodifacoum     | male   | 0.22                   | 0.44                                         | 0.9  | 1.8  | 3.5  |
| brodifacoum     | female | 0.23                   | 0.46                                         | 0.9  | 1.8  | 3.7  |

Tabel 7: Testdosis gebruikt in de gestandaardiseerde bloedstollingstest (SBCR). Het dubbele van ED<sub>50</sub> wordt als basis gebruikt. Andere meervouden fungeren als een indicator voor de resistentiegraad (naar Prescott, 2007).

### 4.3 In vitro VKOR-activiteit

In deze test gaat men de microsomale VKOR activiteit van de lever meten met behulp van HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Thijssen et al. 1989). Na een incubatietijd van vier weken worden wilde ratten geëuthanaseerd met CO<sub>2</sub> en worden de levers ingevroren. Tenslotte wordt de graad van gevoeligheid van VKOR aan de verschillende anticoagulantia bepaald. Afhankelijk van het verkregen percentage VKOR inhibitie kan men nagaan over welk genotype het gaat. Zo is bij een gevoelige rat de VKOR-activiteit gehinibeeerd tot bijna 0 % in aanwezigheid van de verschillende anticoagulantia, zo ook bij het Scottish-type, doch door een 'wash-out' test, gebaseerd op de reversibele binding tussen warfarine en VKOR, kan ook dit type onderscheiden worden. Bij het Welsh-type is er bijna geen inactivatie van VKOR door warfarine en bijna volledige inactivatie door difenacoum en brodifacoum en bij het Hampshire-type is de inactivatie verschillend per anticoagulans. Een ander voordeel naast de genotypische bepaling is dat de test niet op levende dieren moet gebeuren. Gezien de nieuwere genetische inzichten is deze techniek niet meer relevant en wordt dan ook niet courant gebruikt.

### 4.4 Genetische analyse

Door de identificatie van het VKORC1 gen (Rost et al. 2004, Li et al. 2004), is men nu ook in staat via DNA analyse bij resistente ratten mutaties in het gen aan te tonen (Pelz et al. 2005). Het gen is verantwoordelijk voor de aanmaak van VKOR, dat door de mutatie licht gewijzigd is bij resistente ratten, en dus zo aan de basis van resistentie ligt.

De voordelen van deze genetische test zijn dat je hem ook kan uitvoeren op weefselstalen afkomstig van dode ratten en zelfs op uitwerpselen (Pelz et al. 2007). Verder kent de test een hoge sensitiviteit. Een nadeel is echter dat het resultaat niets zegt over de eventuele resistentie tegen tweede generatie anticoagulantia, laat staan over de resistentiegraad. Tevens worden niet gekende vormen van resistentie gemist, iets wat niet gebeurt als je via een BCR test een fenotypisch kenmerk zoals de bloedstolling controleert.

## 5 Bloedstollingstesten

### 5.1 Materiaal en Methode

De ratten werden individueel gehuisvest in macrolon type III kooien (oppervlakte: 800 cm<sup>2</sup>, hoogte: 18 cm). Elke kooi was voorzien van een dikke laag houtkrullen en een PVC-buis (11 cm diameter, 20 cm lang) die dienst deed als rustplaats. Volledige klimaatregeling in het dierenverblijf was mogelijk door de aanwezigheid van een verwarmings-, ventilatie- en koelinstallatie. De temperatuur in het verblijf bedroeg ongeveer 20 °C en er heerste een lichtregime van 12 uur licht en 12 uur donker. De ratten kregen in het begin van de proef crispy-rat voederkorrels (1,5 mg vit K3 per kg) van Versele Laga, dit werd later vervangen door een onderhoudskorrel voor ratten en muizen van Carfil Quality (60 mg vit K3 per kg). Daarnaast kregen ze water *ad libitum*.

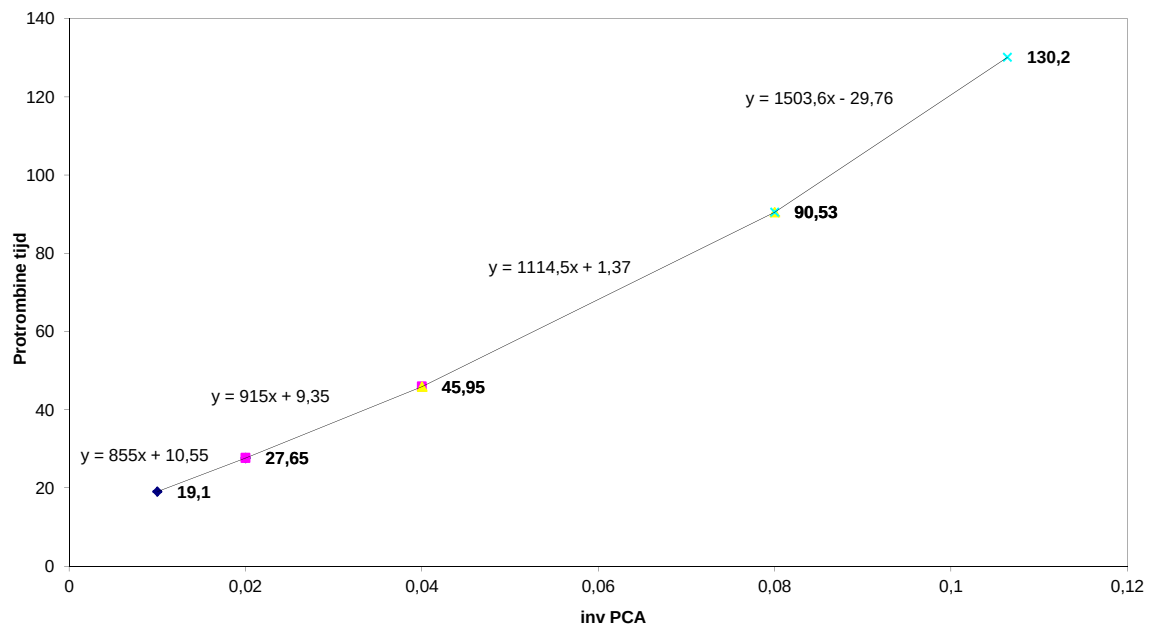
Gevangen ratten werden pas 3 weken later aan de eerste bloedstollingstest onderworpen, dit om zieke, geïntoxiceerde en drachtige dieren uit te sluiten. De bloedafname gebeurde via de retro-orbitale plexus en de toediening van het anticoagulans via de mond gebeurde met behulp van een traancanule die dienst deed als slokdarmsonde. Beide handelingen vonden plaats onder anesthesie met isofluraan. Het bloed werd opgevangen in een micro-cuvette 1 ml van Sarstedt gevuld met 0,1 ml natriumcitraat (0,106 mol/l). De PT werd bepaald met CoaDATA 501S, een volbloed stollingsmeter van Helena Biosciences Europe. Deze werkte via een optische detectie van het gevormde fibrinestolsel en bij een temperatuur van 37,4 °C. De cuvetten die gebruikt werden, waren voorzien van een magnetisch roerstaafje, waardoor een goede vermenging van de reagentia verzekerd werd zodat er bij vorming van een stolsel een vlugge detectie kon plaatsvinden. De cuvetten werden gevuld met 75 µl tromboplastine, 75 µl calciumchloride en minstens 1 minuut voorverwarmd. Nadien werd er 25 µl bloed aan toegevoegd. Drie anticoagulantia werden getest: warfarine, bromadiolone en difenacoum.

Bij aanvang van de stollingstesten stelden we eerst een PCA-calibratiecurve (percentage stollingsactiviteit) op (zie figuur 10 & 11). Dit deden we zowel per geslacht als bij elk nieuw lot tromboplastine. Hiervoor maten we de PT van een verdunningsreeks van bloed, afkomstig van een groep gevoelige ratten. Een verdunning van het bloed met fysiologische zoutoplossing (0,9 % natriumchloride) had immers hetzelfde effect als een behandeling met cumarinederivaten, namelijk een vermindering van het aantal stollingsfactoren. De gebruikte verdunningen waren 100, 50, 25, 12,5 en 9,375 %. Voor het opmaken van de PCA-calibratiecurve zette we de inverse waarden van de verdunning respectievelijk 0,01, 0,02, 0,04, 0,08 en 0,11 uit op de x-as en de gemeten stollingstijd op de y-as. Tussen de gevonden waarden werd dan een functievergelijking opgesteld, waarmee we voor de volgende testen de PCA in functie van de geregistreerde PT konden bepalen.

#### 5.1.1 Warfarine-resistentie

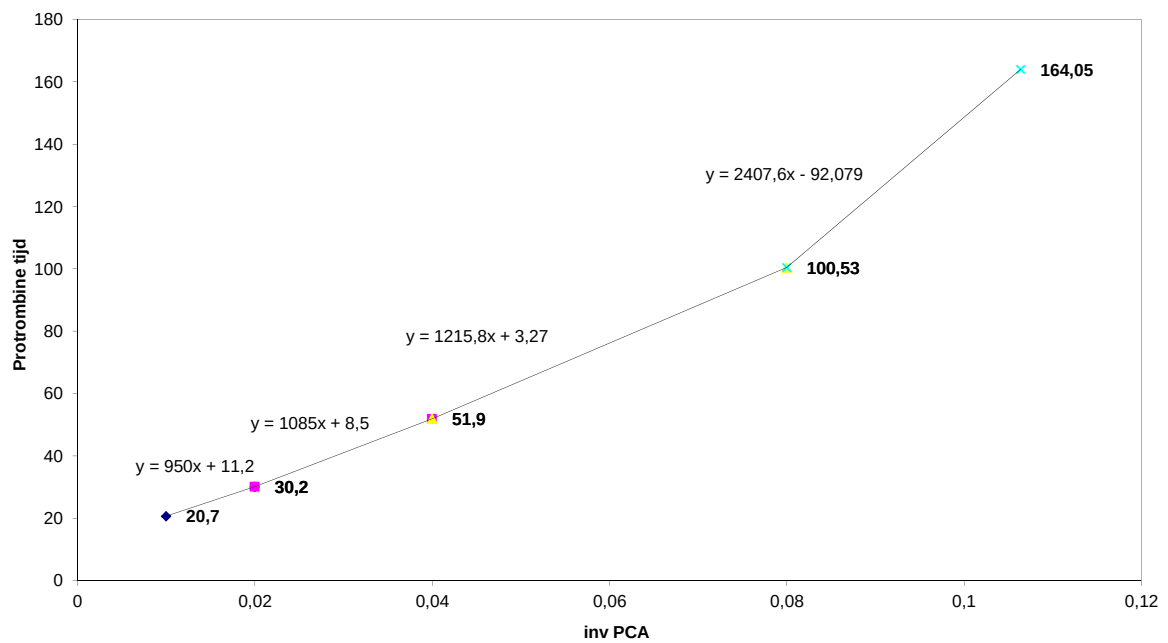
Niettegenstaande warfarine in België niet meer in omgang was als rattenvergift, gebruikten we het nog wel in onze testen om een eerste onderscheid te maken tussen gevoelige en resistente ratten. We verdoofden de ratten met isofluraan, wogen ze, namen bloed en dienden ze natriumwarfarine (Sigma) toe (dosis: 5 mg/kg, 0,25 % oplossing). Van het bloedstaal bepaalden we de PT en PCA. Deze eerste PT-bepaling diende om na te gaan of de rat haar bloed normaal stold. Na verloop van tijd werd deze eerste PT bepaling niet meer toegepast omdat het merendeel van de ratten bij aanvang een normale PT vertoonde.

**CALIBRATIECURVE (V) Lotnr : 10169537 / ISI 1,02**



Figuur 10: Voorbeeld van PCA-calibratiecurve voor vrouwelijke ratten.

**CALIBRATIECURVE (M) Lotnr : 10169537 / ISI 1,02**



Figuur 11: Voorbeeld van een PCA-calibratiecurve voor mannelijke ratten.

24 uren later werd er dan terug een bloedstaal afgenomen en bepaalden we de PT en PCA ervan. Met een PCA groter dan de afkapwaarde van 17 % was de bloedstolling onvoldoende geremd en hadden we met een warfarine resistente rat te maken. Als de PCA lager was dan bleek de rat gevoelig. Warfarine gevoelige ratten zouden door de resistentiehiërarchie ook niet resistent zijn aan bromadiolone en difenacoum. Daarom werden deze na afloop van de test geëuthanaseerd met CO<sub>2</sub>. De warfarine resistente ratten werden ten vroegste een week later getest met bromadiolone.

### 5.1.2 Bromadiolone-resistentie

Mannelijke en vrouwelijke warfarine-resistente ratten kregen respectievelijk 1 mg/kg (0,05 %) en 2,4 mg/kg (0,12 %) bromadiolone toegediend. De oplossing werd telkens vers aangemaakt uit een industriële stockoplossing (0,25 %), verkregen bij Edialux. Vanaf 2007 werd er zowel aan vrouwelijke als mannelijke ratten 5mg/kg (0,25% oplossing) gegeven. Vier dagen later werd er dan bloed afgenomen voor de bepaling van de PT en PCA. Ratten met een PCA meer dan 10%, werden dan als bromadiolone resistent beschouwd. Ratten met een PCA minder dan 10% waren dan bromadiolone gevoelig. Zowel bromadiolone gevoelige als bromadiolone resistente ratten werden ten vroegste 6 weken later met difenacoum getest.

### 5.1.3 Difenacoum-resistentie

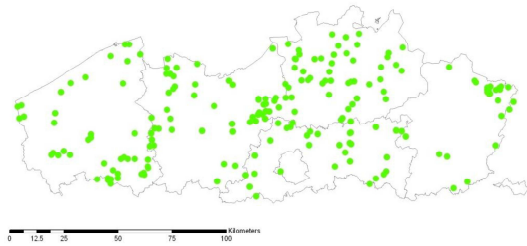
Net zoals bij de warfarine-resistentie test gebruikten we slechts 1 dosis voor beide geslachten, namelijk 5 mg/kg, toegediend via een 0,25 % oplossing. Deze oplossing werd vers aangemaakt uit een industriële stockoplossing van 2,5 % verkregen bij Edialux. Vier dagen of 96 uur later volgde dan een bloedafname met daarop volgend een PT en PCA bepaling. Een afkapwaarde van PCA 10% maakte ook hier het verschil tussen difenacoum gevoelige en difenacoum resistente ratten. Na deze laatste test werden de ratten geëuthanaseerd met CO<sub>2</sub>.

## 5.2 Resultaten

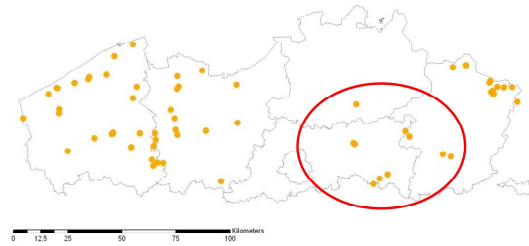
### 5.2.1 Periode 2003-2005

De resultaten van de ratten getest van 2003 tot 2005 werden samengevat in tabel 8. Tijdens deze periode werden 691 ratten getest voor warfarine resistentie. Hiervan bleken 550 dieren gevoelig voor warfarine en 141 warfarine resistent. Niet al de resistente ratten werden getest met bromadiolone aangezien er tussentijds 19 ratten stierven. Van de 122 warfarine resistente ratten bleken er 88 tevens resistent aan bromadiolone en stierven er 28 voor ze ook met difenacoum getest werden. Van de 94 warfarine resistente ratten bleken er zes naast bromadiolone ook nog difenacoum resistent. Geen enkele rat was resistent voor difenacoum en gevoelig aan bromadiolone. Voor de verspreiding van resistentie per bekken verwijzen we naar figuur 12 en 13.

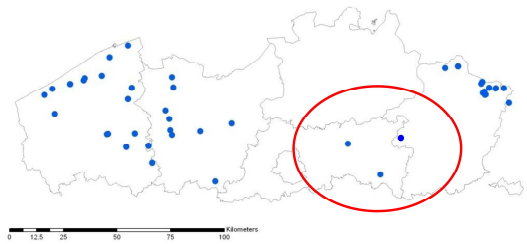
**gevoelig: n=550**



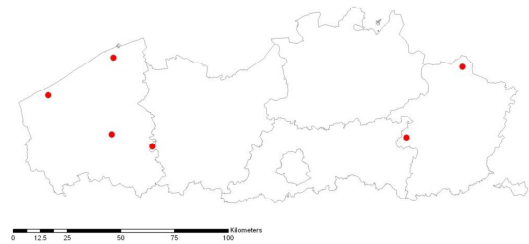
**warfarine: n=53**



**bromadiolone: n=82**

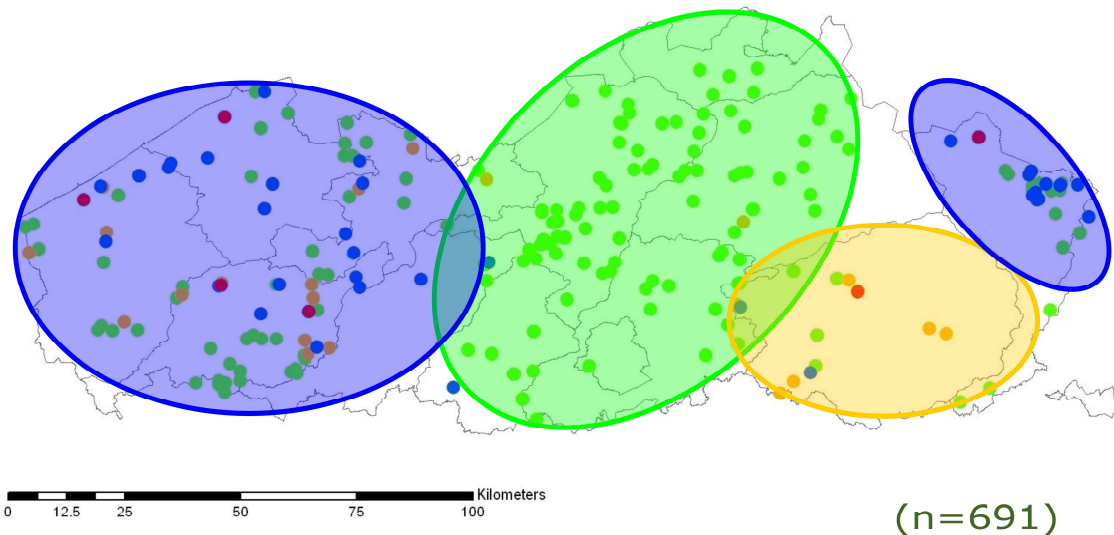


**difenacoum: n=6**



Figuur 12: Overzicht van de verspreiding van resistente ratten in Vlaanderen voor de periode van 2003 tot 2005. De bromadiolone resistente ratten waren ook resistent tegen warfarine. De 6 difenacoum resistente ratten waren ook resistent aan warfarine en bromadiolone. Per locatie kunnen meerdere dieren gevangen zijn. In het Demerbekken (rode cirkel) zien we minder bromadiolone resistentie dan warfarine resistentie.

**gevoelig   warfarine   bromadiolone   difenacoum**

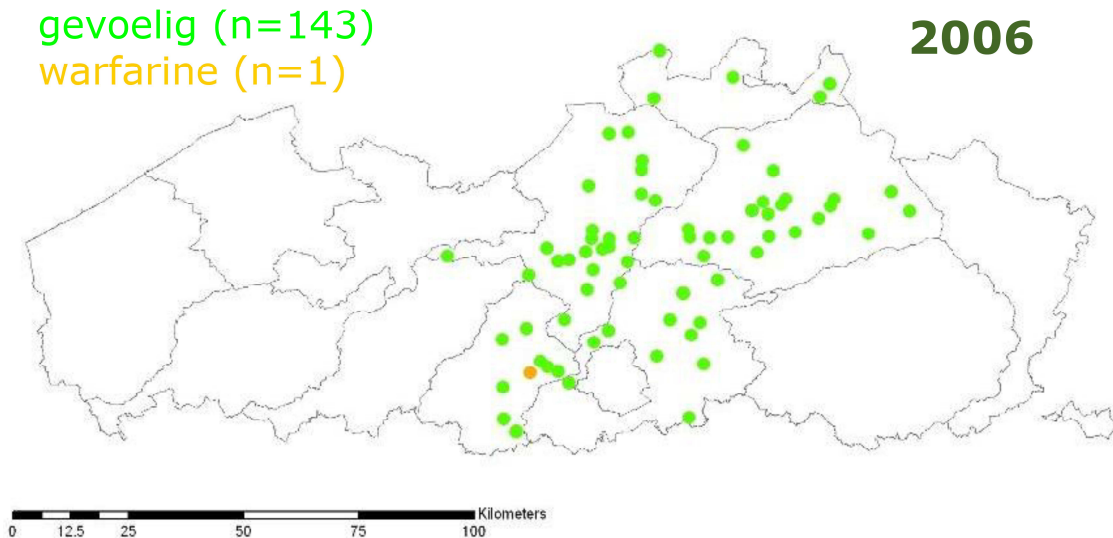


**(n=691)**

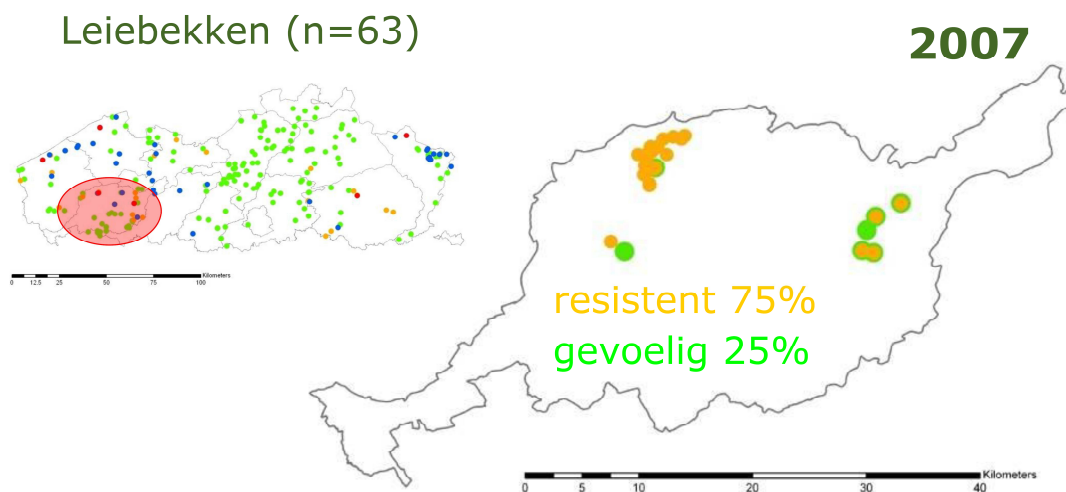
Figuur 13: Samenvoeging van de kaarten in vorige figuur. Hierbij valt het op dat Vlaanderen in 4 zones opgedeeld kan worden. Een centrale zone met nagenoeg enkel gevoelige dieren (groen), 2 zones gekenmerkt door de aanwezigheid van bromadiolone resistente ratten (blauw) en één zone met warfarine resistente ratten (oranje). Difenacoum resistentie (rode stippen) is aanwezig maar eerder zelden. Elk punt staat voor een locatie waarvan minstens één rat werd getest en krijgt de kleur van hoogste vorm van resistentie.

### 5.2.2 Periode 2006-2010

Tijdens de tweede screening van 2006 tot 2010 werden in totaal 845 ratten getest met warfarine, 286 ratten bleken warfarine resistent. Van deze warfarine resistente ratten werden er 82 ratten met bromadiolone en 209 ratten met difenacoum getest. Hiervan waren er respectievelijk 55 bromadiolone resistent en 16 difenacoum resistent. Slechts 29 dieren werden met beide producten getest.



Figuur 14: In 2006 werden nog eens 144 ratten getest uit de centrale bekkens om na te gaan of inderdaad geen resistentie voorkwam. Op een rat na in het Denderbekken waren ze allemaal gevoelig.



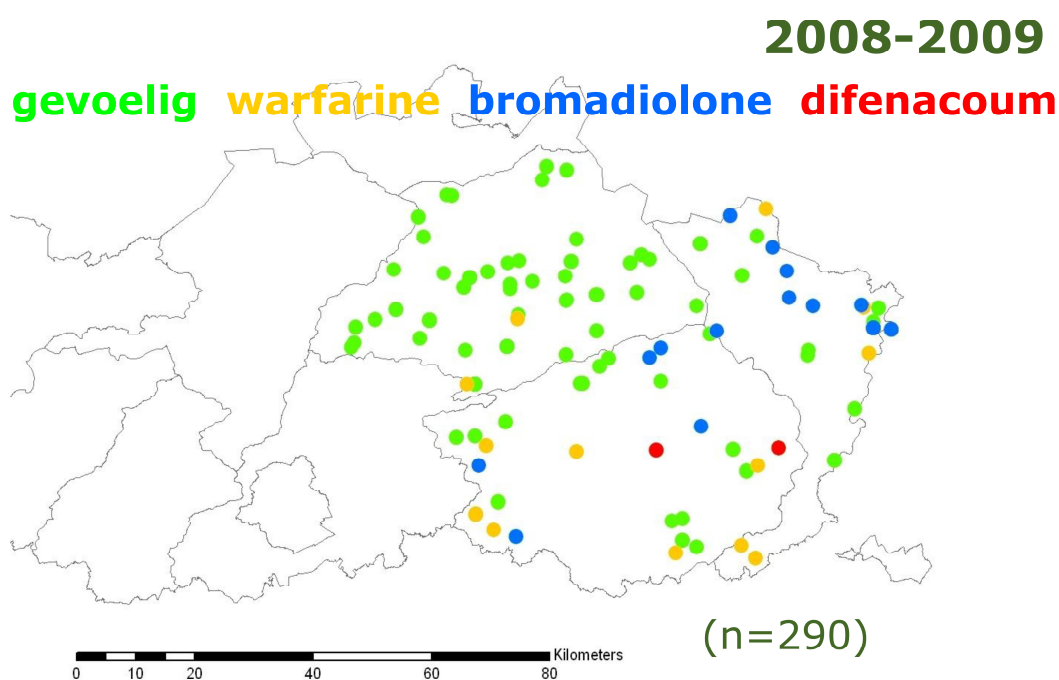
Figuur 15: Tijdens 2007 werden 63 ratten getest afkomstig van het Leiebekken. Driekwart van de dieren bleek op zijn minst warfarine resistent.

Tijdens de tweede periode wijzigden we de werkwijze in vergelijking met die van de eerste periode. Toen werden warfarine resistente ratten eerst getest met bromadiolone en pas 6 weken later met difenacoum. Om eventuele invloeden van een eerdere bromadiolone toediening op de difenacoum test uit te sluiten werd er tijdens de tweede screening beslist de bromadiolone test niet langer uit te voeren. Dit kon immers tot een onderschatting van

difenacoum resistentie leiden. Bovendien bleek uit het genetisch onderzoek (zie verder) dat warfarine resistente ratten in bepaalde regio's bijna allemaal ook bromadiolone resistent waren. De ratten eerst testen met bromadiolone zou daarom dus mogelijk de difenacoum testen hypothekeren zonder veel extra informatie rond bromadiolone resistentie op te leveren.

|                 | 2003-2005 |       |       | 2006-2010 |       |       |
|-----------------|-----------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| Bekken          | gevoelig  | W-res | % res | gevoelig  | W-res | % res |
| Beneden Schelde | 145       | 6     | 4     | 42        | 0     | 0     |
| Boven Schelde   | 0         | 2     | 100   | 13        | 51    | 80    |
| Brugse Polders  | 20        | 13    | 39    | 34        | 58    | 63    |
| Demer           | 61        | 26    | 30    | 67        | 21    | 24    |
| Dender          | 81        | 1     | 1     | 17        | 1     | 6     |
| Dijle           | 38        | 0     | 0     | 36        | 0     | 0     |
| Gentse Kanalen  | 30        | 4     | 12    | 47        | 37    | 44    |
| Ijzer           | 30        | 18    | 38    | 71        | 40    | 36    |
| Leie            | 47        | 32    | 41    | 18        | 45    | 71    |
| Maas Antwerpen  | 7         | 0     | 0     | 11        | 0     | 0     |
| Maas Limburg    | 42        | 39    | 48    | 50        | 30    | 38    |
| Nete            | 49        | 0     | 0     | 153       | 3     | 2     |
| Eindtotaal      | 550       | 141   | 20    | 559       | 286   | 34    |

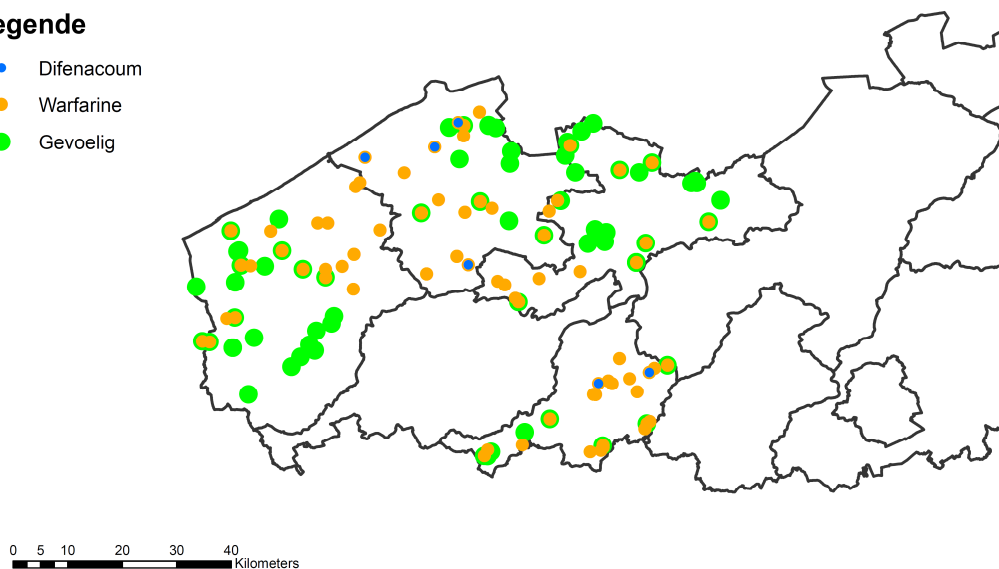
Tabel 8: Aandeel resistente ratten per rivierbekken in Vlaanderen gedurende twee opeenvolgende periodes.  
W-res= warfarine resistent, %res= percentage warfarine resistentie.



Figuur 16: In de periode van 2008-2009 werden 290 ratten uit het oosten van Vlaanderen getest. Resistentie blijft gebonden aan de twee bekken Demer en Maas Limburg. In het Netebekken slechts beperkte sporen van resistentie.

### Legende

- Difenacoum
- Warfarine
- Gevoelig



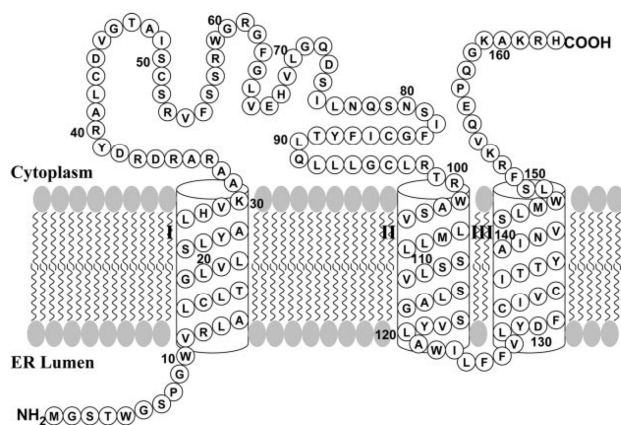
Figuur 17: In 2010 werden 351 ratten getest uit vier bekken in het westen van Vlaanderen: IJzer, Brugse Polders, Leie en Boven Schelde. Het hoogste percentage resistente ratten (80%) vonden we terug in het bekken van de Boven Schelde.

## 6 Genetisch onderzoek

### 6.1 Inleiding

Genetische studies in het verleden toonden reeds aan dat warfarine resistentie een genetisch kenmerk is. Het resistentie gen of *Rw* ligt op het rat chromosoom 1, is dominant en gelinkt met de merker genen fuzzy (*fz*), pink eye dilution (*p*) en albinisme (*c*) (Greaves & Ayres, 1985). Verschillende genotypes werden gelinkt aan verschillende locaties en hadden elk hun eigen eigenschappen (zie hoofdstuk 3).

Met de bijna gelijktijdige identificatie in 2004 van het gen *VKORC1* of vitamine K epoxide reductase complex subunit 1 dat codeert voor VKOR (zie figuur 18) door Rost et al. en Li et al. kwam het genetisch onderzoek rond resistentie in een ware stroomversnelling. VKOR is immers het target enzym waar anticoagulantia zich aan binden. Een structuurwijziging in VKOR veroorzaakt door een puntmutatie in *VKORC1* maakt deze binding onmogelijk of op zijn minst reversibel waardoor de inwerking op de bloedstolling wegvalt of tegengegaan wordt.



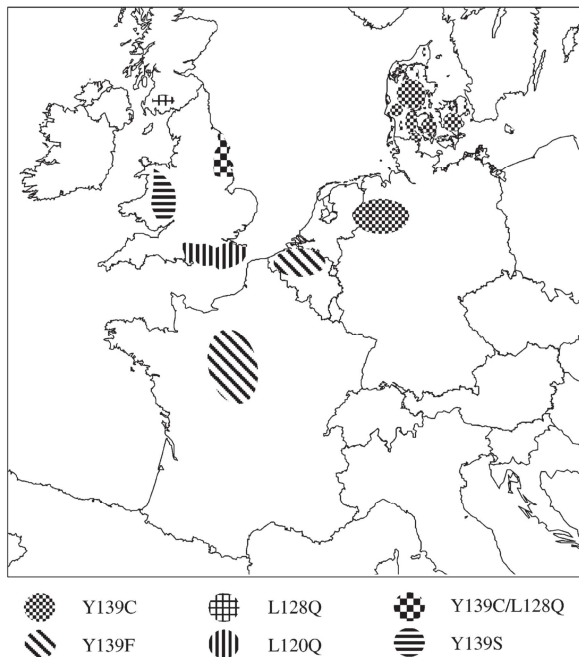
Figuur 18: Topologie van vitamine K epoxide reductase (VKOR), een transmembraan proteïne in het endoplasmatisch reticulum van de hepatocyten en van belang in de vitamine K cyclus (naar Tie 2005).

In 2004 participeerden wij in een studie samen met wetenschappers uit Duitsland, Denemarken, Verenigd Koninkrijk en Frankrijk om na te gaan in welke mate resistentie bij ratten in die verschillende landen verklaard kon worden door mutaties in *VKORC1*. In totaal werden er toen bij de bruine rat 7 verschillende puntmutaties (zie tabel 9) teruggevonden verspreid over die verschillende landen (zie figuur 19).

Bij een puntmutatie wordt een van de vier DNA basen (adenine(A), guanine(G), cytosine (C) en thymine (T)) vervangen door een andere wat dan kan leiden tot een wijziging van aminozuursamenstelling van VKOR en dus ook tot een andere werking van het enzym.

Bij de 27 genetische stalen afkomstig uit België werd er toen bij 14 een puntmutatie teruggevonden. Deze stalen waren afkomstig van ratten die ook door onze bloedstollingstesten als resistent bestempeld werden. De 13 stalen zonder mutatie kwamen van BCR gevoelige ratten. De mutatie teruggevonden in België was gekenmerkt door een wijziging in codon 139 waar adenine vervangen werd door thymine, waardoor in VKOR het aminozuur tyrosine vervangen wordt door fenylalanine. Deze puntmutatie in *VKORC1* wordt ook nog zo weergegeven: TAT139TTT, Tyr139Phe of Y139F. Verder in de tekst zullen we deze omschrijven als mutatie 1 of M1, waarbij we heterozygote en homozygote ratten

respectievelijk aanduiden als M1W en M1M1. Gezien M1 toen ook bij 6 Franse ratten teruggevonden werd, spreken we soms over de Belgisch-Franse mutatie.



Figuur 19: Verspreiding van de verschillende mutaties in VKORC1 die aanleiding geven tot resistentie binnen Europa (naar Pelz et al. 2005).

Met de isolatie van VKORC1 (Rost et al.2004, Li et al.2004) en ontdekking van deze 7 verschillende mutaties (Pelz et al.2005) werd er vanaf toen meer en meer ingezet op het genetisch resistentie onderzoek. Ook wij zouden vanaf dan zoveel mogelijk dieren controleren op aan- of afwezigheid van mutaties in VKORC1. Hierbij zouden we ons baseren op verschillende genetische technieken of een combinatie ervan.

## 6.2 Toelichting bij de gebruikte genetische technieken

### 6.2.1 PCR in combinatie met gel-elektroforese

Na DNA extractie van weefselstalen (staartpunt of oor) met Qiagen tissue kit (Qiagen) werd een deel van exon 3 van het VKORC1 gen geamplificeerd via PCR zoals beschreven in Pelz et al. (2005). Specifiek voor de mutatie die we toen vonden in België: Y139F werden de primers voor de ARMS-PCR (Ye et al. 2001) aangepast, namelijk F-primer: 5'-TGATTCTGCATTGTTT GCATCACCACGTT-3' en R-primer: 5'-CAACATCAGGCCCGCATTGATGGAAT-3'.

Naast een controleband, die voor alle stalen identiek is, werd tevens een band geamplificeerd die diagnostisch is voor het wild type of de mutatie. Waardoor een onderscheid kon worden gemaakt tussen homozygoot of heterozygoot mutant. De bekomen banden werden gescheiden en gevisualiseerd via gelelektroforese (zie figuur 20). Gevoelige ratten (rode kleur) vertoonden naast de controleband enkel de wild type band. Homozygote resistente ratten (groene kleur) hadden naast de controleband enkel de mutant tat139ttt band terwijl heterozygote resistente ratten (blauwe kleur) alle drie de banden hadden.

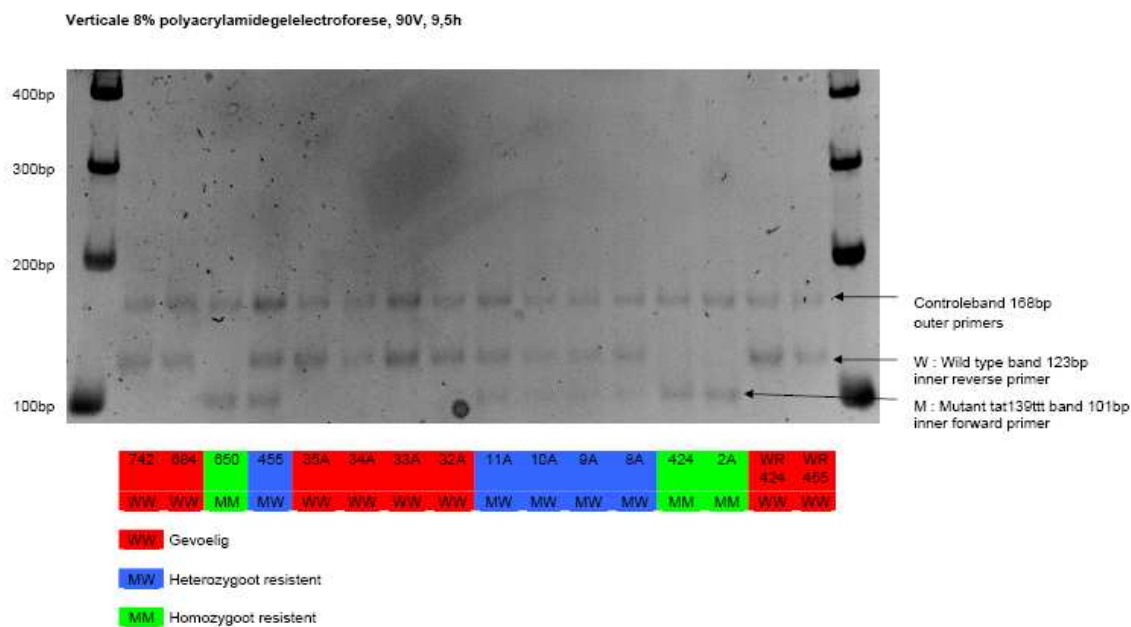
| Strain/geographic area              | No. of specimens | Codon position | Codon WT | Codon Mut | AA WT | AA Mut |
|-------------------------------------|------------------|----------------|----------|-----------|-------|--------|
| <i>R. norvegicus</i>                |                  |                |          |           |       |        |
| UK, Hampshire resistant             | 2                | 120            | CTG      | CAG       | Leu   | Gln    |
| UK, Berkshire resistant (Reading)   | 2                | 120            | CTG      | CAG       | Leu   | Gln    |
| UK, Berkshire resistant (CSL)       | 2                | 120            | CTG      | CAG       | Leu   | Gln    |
| UK, Scottish resistant (CSL)        | 2                | 128            | CTG      | CAG       | Leu   | Gln    |
| UK, Welsh resistant (CSL)           | 2                | 139            | TAT      | TCT       | Tyr   | Ser    |
| UK, Yorkshire, wild                 | 3                | 139            | TAT      | TGT       | Tyr   | Cys    |
| UK, Yorkshire, wild                 | 1 <sup>a</sup>   | 128            | CTG      | CAG       | Leu   | Gln    |
| Denmark, wild                       | 43               | 139            | TAT      | TGT       | Tyr   | Cys    |
| Belgium, wild                       | 14               | 139            | TAT      | TTT       | Tyr   | Phe    |
| France, wild                        | 6                | 139            | TAT      | TTT       | Tyr   | Phe    |
| France, wild                        | 1 <sup>b</sup>   | 35             | CGC      | CCC       | Arg   | Pro    |
| Germany, wild                       | 286              | 139            | TAT      | TGT       | Tyr   | Cys    |
| Germany, wild                       | 2                | 56             | TCC      | CCC       | Ser   | Pro    |
| <i>M. musculus/domesticus</i>       |                  |                |          |           |       |        |
| UK, CSL                             | 6                | 128            | TTA      | TCA       | Leu   | Ser    |
| UK, Reading                         | 4                | 139            | TAT      | TGT       | Tyr   | Cys    |
| <i>Homo sapiens sapiens</i>         |                  |                |          |           |       |        |
| Patient F (ROST <i>et al.</i> 2004) | 1                | 128            | CTC      | CGC       | Leu   | Arg    |

WT, wild-type sequence; Mut, mutated sequence; AA, amino acid.

<sup>a</sup> Animal was compound heterozygous for Leu128Gln and Tyr139Cys.

<sup>b</sup> Animal was compound heterozygous for Arg35Pro and Tyr139Phe.

Tabel 9: Overzicht van de verschillende mutaties in VKORC1 bij ratten, muizen en de mens. Voor elke mutatie is weergegeven op welke plaats ze zich bevindt, welke DNA-base gewijzigd is en welk aminozuur hierdoor gewijzigd is in het enzym VKOR (naar Pelz *et al.* 2005).



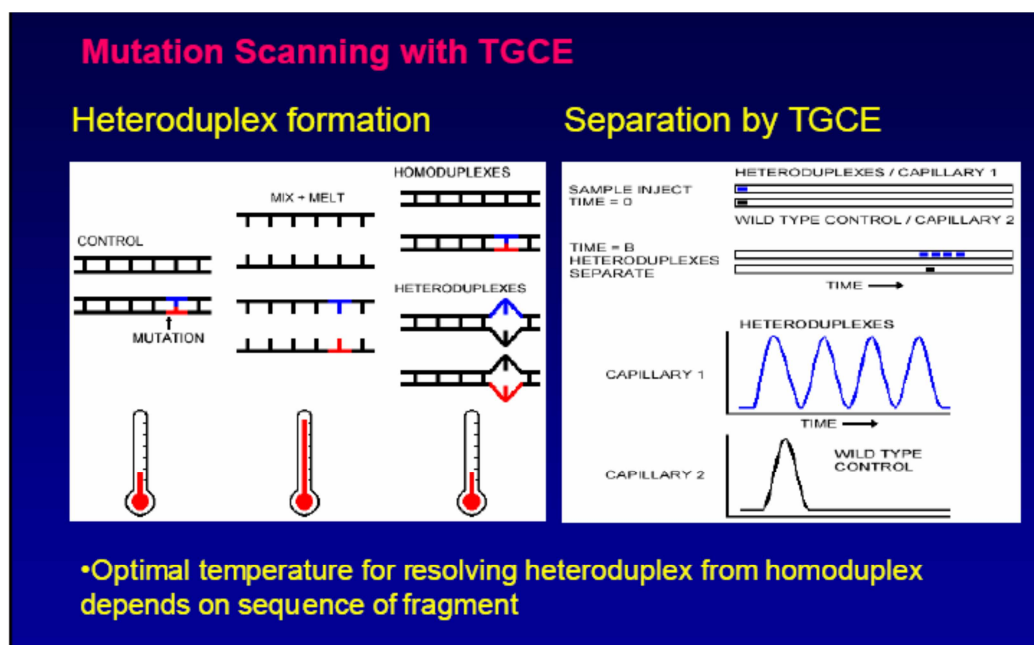
Figuur 20: Gelelektroforese na een ARMS-PCR op DNA van 16 ratten.

In een latere fase zou de gelelektroforese vervangen worden door een analyse op de SCE9610 sequencer waarbij de gekende mutaties gelabeld werden met een kleurstof en zo

gezamenlijk gescreend konden worden. Hiervoor werd ook voor mutatie 2 of L120Q (zie 6.3 resultaten) een aangepaste primer ontwikkeld F: 5'-TGGTGTCTGTCGCTGGTTCTCTGTAGCA-3' en R: 5'-ATACAGGACAAAGAACAGGATCCAGGGCA-3'

## 6.2.2 Mutatiedetectie via TGCE of Temperature gradiënt capillaire electroforese

Hiervoor werd gebruik gemaakt van een capillair electroforese toestel "Aurora" of "Spectrumedix Capillary Electrophoresis platform". De gebruikte techniek is gebaseerd op heteroduplexvorming en TGCE (Chou et al. 2005). Na amplificatie van het VKORC1 gen worden heteroduplexen gevormd door denaturatie (splitsen door opwarmen) en renaturatie (versmelten door koelen) van het DNA (zie figuur 21). Homozygoot wild type stalen hebben twee identieke kopieën van het VKORC1 gen (WW). Homozygoot mutante stalen hebben eveneens twee identieke kopieën, maar dan van het gemuteerde gen (MM) en heterozygoot mutante stalen hebben een kopie van elk gen (WM). Wanneer homozygoot wild type wordt gemengd met homozygoot mutant en we het DNA laten splitsen en terug laten versmelten, krijgen we homoduplexen (WW en MM), maar ook heteroduplexen (WM en MW).



Figuur 21: Principe van "Temperature gradiënt capillaire electroforese" of TGCE.

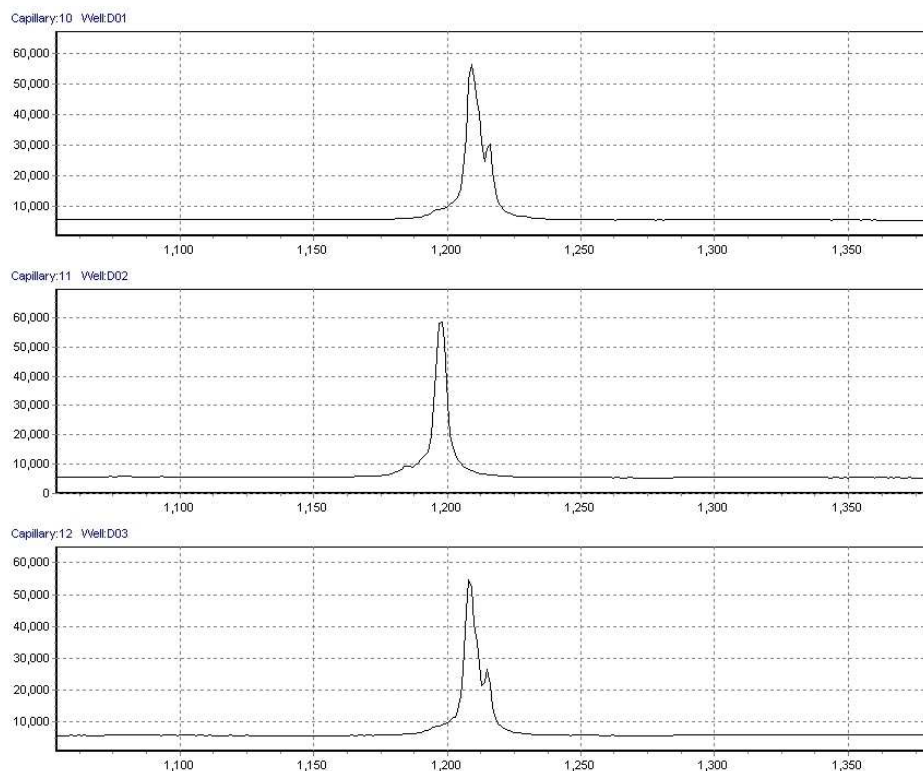
Daar heterozygote mutanten reeds een kopie van elk gen bezitten, dienen ze niet gemengd te worden met wild type. Na denaturatie en renaturatie, worden daar eveneens homoduplexen (WW en MM) en heteroduplexen (WM en MW) gevormd. In theorie kunnen via TGCE deze vier vormen onderscheiden worden (zie figuur 21), in praktijk worden enkel de heteroduplexen gescheiden van de homoduplexen. Dit manifesteert zich als twee pieken die onweerlegbaar de aanwezigheid van een mutatie aantonen (zie figuur 22).

Aangezien we in de praktijk echter niet weten of we met een heterozygoot of homozygoot mutant te maken hebben, werkten we systematisch in verschillende stappen.

- Als eerste stap maakten we heteroduplexen van niet-gemende stalen. Zo konden we de heterozygote mutanten reeds uitslecteren, aangezien deze heterozygote

mutanten 2 pieken vertoonden bij de elektroforese, dit in tegenstelling tot de homozygoten die slechts 1 piek vormden.

- Nadien werden de homozygote stalen ( wild type of mutant) met homozygoot wild type DNA gemengd. In het geval van de homozygoot wild type stalen, zou na het heteroduplex-vormingsproces, maar 1 piek te zien mogen zijn. De homozygoot mutant stalen gaven een extra piek ten gevolge van de gevormde heteroduplexen.
- In principe zijn de stalen nu geïdentificeerd maar ter controle werden de homozygote stalen ook nog eens met homozygoot mutant materiaal gemengd. Hierdoor zouden de stalen die in de vorige stap maar 1 piek gaven nu twee pieken moeten vormen en andersom.



Figuur 22 Resultaat van een TGCE elektroforese, de grote piek komt overeen met de homoduplexen, de kleine met de heteroduplexen. Boven: mengeling homozygoot wild type (WW) en homozygoot mutant (MM) rat 684. Midden: homozygoot mutant (MM) rat 684. Onder: heterozygoot mutant (WM) rat 741.

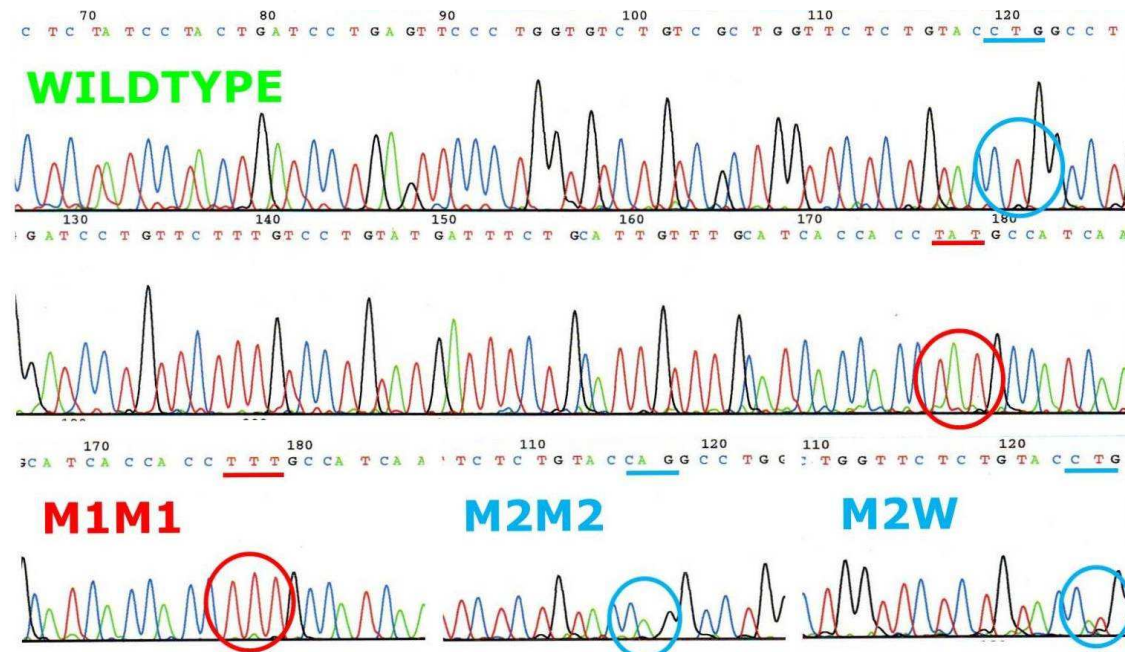
### 6.2.3 Sequentieanalyse

Bij sequentieanalyse wordt het DNA ontrafeld tot zijn elementaire bouwstenen of de DNA-basen. Op deze manier kunnen dus ook puntmutaties of wijzigingen in het patroon opgespoord worden (zie figuur 23). Bij ratten die volgens de stollingstesten resistent waren maar waar we de gekende mutaties niet terugvonden of daar waar TGCE aangaf dat het over een andere mutatie ging. Konden we aan de hand van sequentieanalyse deze mutaties in VKORC1 bepalen.

## 6.3 Resultaten

Naast mutatie 1, ontdekten we in 2006 in het Demerbekken vrij vlug een tweede puntmutatie in VKORC1. Deze tweede mutatie M2 vindt plaats in codon 120, waar het

nucleïnezuur thymine (CTG) is gemuteerd naar adenine (CAG), met als gevolg dat op die plaats in VKOR het aminozuur leucine vervangen werd door glutaminezuur of afgekort CTG-120-CAG, Leu120Gln of L120Q. Deze mutatie werd eerder teruggevonden in Groot-Brittannië meer bepaald in de Berkshire en de Hampshire stam (Pelz et al. 2005). Deze stam staat in het Verenigd Koninkrijk gekend als difenacoum resistent.



Figuur 23: Voorbeeld van een DNA sequentie analyse van VKORC1. De bovenste 2 stroken DNA behoren tot het wild type zoals teruggevonden bij gevoelige ratten. In blauw en respectievelijk rood is codon 120 CTG en codon 139 TAT aangeduid. Linksonder is DNA van een homozygoot resistente rat drager van mutatie 1 of TAT-139-TTT zichtbaar, hierbij is de groene piek of DNA-base (A) vervangen door een rode (T). Midden onder en rechtsonder is DNA van een respectievelijk homo- en heterozygoot resistente rat drager van mutatie 2 of CTG-120-CAG afgebeeld. Bij M2M2 is de rode piek (T) vervangen door een groene (A). Bij M2W zijn beide pieken zichtbaar.

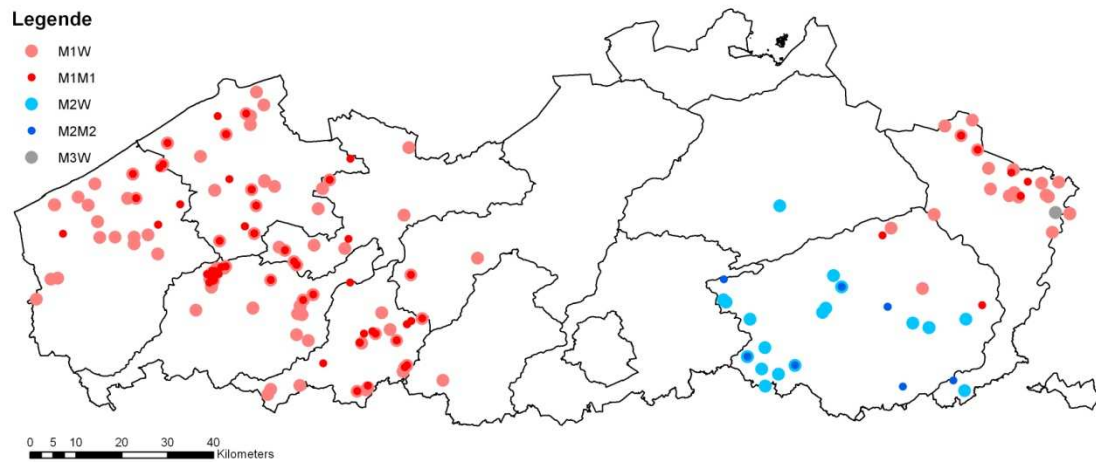
Recenter vonden we in stalen van Maas Limburg van 2009 dat er in Vlaanderen nog een derde mutatie in het VKORC1 gen voorkomt. In rat 1327 afkomstig van Maaseik en een deel van haar nakomelingen werd de mutatie TAT-139-TGT of Y139C teruggevonden.

| Bekken         | M1M1 | M1W | M1M1/M1W | %res |
|----------------|------|-----|----------|------|
| Boven Schelde  | 31   | 20  | 1,55     | 80   |
| Brugse Polders | 25   | 29  | 0,86     | 63   |
| Gentse Kanalen | 11   | 22  | 0,50     | 44   |
| Ijzer          | 11   | 26  | 0,42     | 36   |

Tabel 10: In bekkens met een hoger percentage resistente ratten (%res) zien we ook de proportie homozygote ratten toenemen (2010).

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. Op plaatsen waar resistentie het hoogst is verwachtten we ook een toename in de verhouding homozygote en heterozygote ratten. Dit werd bevestigd door de resultaten, zo zagen we bijvoorbeeld in 2010 dat in de

bekkens met het hoogste percentage resistente ratten er ook de grootste proportie homozygoot resistente ratten voorkwam (zie tabel 10).



Figuur 24: Verspreiding van de drie verschillende mutaties in VKORC1 in Vlaanderen.

## 7 Genetica versus Bloedstollingstesten

### 7.1 Vergelijking van beide diagnostische testen

Van de 1536 ratten die met BCR testen werden getest, werden er 568 genetisch onderzocht op de aanwezigheid van een mutatie in VKORC1 (zie tabel 11). In de eerste periode van 2003 tot 2005 lag de focus van de genetische testen eerder bij de BCR resistente ratten. Ten eerste waren niet van alle ratten nog stalen beschikbaar maar er was vooral interesse in welke mutaties aan de basis van resistentie zouden liggen. De kans was groter dat we die zouden terugvinden bij BCR resistente dieren.

Vanaf 2007 gebeurde er systematisch een genetische analyse van alle ratten met een PCA na de warfarine BCR test van meer dan 12%. Met uitzondering van de ratten van de Gentse Kanalen (2010). Die werden allemaal genetisch getest. Deze ruime marge met een PCA van 17%, de grenswaarde die we hanteren bij de warfarine stollingstesten, liet ons toe de dieren correct te classificeren als gevoelig of resistent. Bij een nog lagere PCA dan 12% was de kans zeer klein geworden dat we nog mutaties in VKORC1 zouden terugvinden.

|      | M-  | M+  |     |
|------|-----|-----|-----|
| BCR- | 188 | 2   | 190 |
| BCR+ | 20  | 358 | 378 |
|      | 208 | 360 | 568 |

Tabel 11: De relatie tussen warfarine resistentie gebaseerd op bloedstollingstesten en de aan- en afwezigheid van mutatie in VKORC1.

Als we de resultaten van de stollings- en genetische testen beschouwen als resultaten van twee onafhankelijke diagnostische testen voor resistentie dan kunnen we voor die resultaten kappa berekenen. Kappa staat voor de graad van overeenkomst tussen beide testen waarbij kappa varieert van 0 tot 1 (0: geen overeenkomst, 1 perfecte overeenkomst). Kappa is enkel betekenisvol als de resultaten van beide test niet significant verschillen en de prevalentie tussen 0,2 en 0,8 is. Kappa groter dan 0,8 wordt beschouwd als een bijna perfecte overeenkomst (Dohoo et al. 2003). Voor de BCR test bedroeg de prevalentie 0,67 en voor de mutatie detectie 0,63. Bovendien waren de resultaten van beide testen niet significant verschillend. Dit liet ons toe kappa te berekenen. Kappa bedroeg 0,915 (CI 95%, 0,880-0,950) wat betekende dat de resultaten van beide testen vergelijkbaar waren.

Als we echter de BCR test als een diagnostische test beschouwen voor de detectie van een mutatie in het VKORC1 gen, dan kunnen we ook de sensitiviteit, specificiteit en positief voorspellende waarde (PVW) van deze test berekenen. In dat geval beschouw je de genetische achtergrond of de aan- of afwezigheid van een mutatie in VKORC1 als de gouden standaard.

In deze context is de sensitiviteit de kans dat wanneer de rat drager is van een mutatie in het VKORC1, ze ook effectief als resistent door de BCR-test wordt aangeduid. De sensitiviteit geeft dus een indicatie over het aantal vals negatieven en bedroeg hier 99,44% (CI 95%, 98,68-100,00). De specificiteit is de kans dat een rat zonder mutatie door de BCR test als gevoelig wordt beschouwd (PCA < 17%). Het zegt m.a.w. ook iets over de vals positieven. De BCR test had op basis van onze resultaten een specificiteit van 90,39% (CI 95%, 86,38-94,39). De PVW is de kans dat wanneer je testresultaat positief (resistent of PCA) is, de rat ook werkelijk drager is van een mutatie in VKORC1. Voor onze resultaten was de PVW gelijk aan 94,71%. Andersom bestaat ook de NVW of de negatief voorspellende waarde. Deze bedroeg hier 98,95%.

We zien dat wanneer we de BCR test zouden aanwenden voor de aan- of afwezigheid van mutaties te detecteren al deze waarden (se, sp, PVW en NVW) er hoog zijn. Dit betekent dus dat de BCR test een zeer goede diagnostische test zou zijn om mutaties in VKORC1 aan te duiden. Evenwel zonder onderscheid te maken tussen de verschillende mutaties.

Daartegenover staat de BCR test in het algemeen meer informatie aanlevert over resistentie tegen 2<sup>e</sup> generatie anticoagulantia. En ook resistente ratten, waar andere mechanismen aan de basis liggen van hun resistentie, opspoort.

## 7.2 Nood aan een nieuwe afkapwaarde voor de BCR test?

Op basis van onze resultaten kunnen we de BCR test beter afstellen op de genetische testen. We gaan dan op zoek naar de cut off waarbij de som van de sensitiviteit en specificiteit maximaal is (zie tabel 12). We zien dat dit het geval is bij een PCA tussen 22,4 en 22,9%. Bij deze waarde zien we dat we aan de hand van de BCR test het grootste aantal ratten juist classificeren voor aan- of afwezigheid van een mutatie in VKORC1. Slechts 11 ratten van de 568 worden dan verkeerd ingeschat, drie vals positieven en acht vals negatieven.

| PCA       | w  | m  | TP  | FP | TN  | FN | se   | sp   | se + sp |
|-----------|----|----|-----|----|-----|----|------|------|---------|
| 17        | 0  | 0  | 358 | 20 | 188 | 2  | 99,4 | 90,4 | 189,8   |
| 18        | 6  | 1  | 357 | 14 | 194 | 3  | 99,2 | 93,3 | 192,4   |
| 19        | 9  | 2  | 356 | 11 | 197 | 4  | 98,9 | 94,7 | 193,6   |
| 20        | 12 | 3  | 355 | 8  | 200 | 5  | 98,6 | 96,2 | 194,8   |
| 21        | 15 | 4  | 354 | 5  | 203 | 6  | 98,3 | 97,6 | 195,9   |
| 22        | 16 | 6  | 352 | 4  | 204 | 8  | 97,8 | 98,1 | 195,9   |
| 22,4-22,9 | 17 | 6  | 352 | 3  | 205 | 8  | 97,8 | 98,6 | 196,3   |
| 23        | 17 | 7  | 351 | 3  | 205 | 9  | 97,5 | 98,6 | 196,1   |
| 24        | 17 | 8  | 350 | 3  | 205 | 10 | 97,2 | 98,6 | 195,8   |
| 25        | 17 | 9  | 349 | 3  | 205 | 11 | 96,9 | 98,6 | 195,5   |
| 26        | 17 | 11 | 347 | 3  | 205 | 13 | 96,4 | 98,6 | 194,9   |
| 27        | 19 | 13 | 345 | 1  | 207 | 15 | 95,8 | 99,5 | 195,4   |

Tabel 12: Sensitiviteit en specificiteit in functie van de PCA ter bepaling van de cut off, w/m: aantal wild type/mutanten dieren die afnemen/toenemen vanaf PCA 17, TP: echt positieven, FP: vals positieven, TN: echt negatieven, FN: vals negatieven, se: sensitiviteit, sp: specificiteit.

Of we deze cut off in de toekomst dan zouden hanteren is dan maar de vraag. Bij de huidige afkapwaarde van PCA 17% hadden een zeer hoge sensitiviteit wat inhoudt dat nagenoeg elke rat, drager van een mutatie, geïdentificeerd werd. Daartegenover staat dan wel een lichte overschatting van het aantal resistente dieren door het hoger aantal vals positieven. Veel zal echter afhangen van de vooropgestelde doelstellingen en de technieken die we in de toekomst zullen gebruiken.

## 7.3 Uitzonderingen bevestigen de regel

Gaan we even dieper in op de ratten waarvoor beide testen een verschillend resultaat geven dan stellen we vast dat slechts voor minder dan 4% (22/568) van de ratten zo is. Zo zijn er twee ratten die volgens de BCR test gevoelig zijn maar wel drager zijn van een mutatie. Rat 1441 (M2M2) had een PCA van 16,8 en kan dus zeker als een grensgeval beschouwd worden. Rat 1448 (M2W) had daarentegen een PCA van 12,2 en blijkt volgens de BCR test dus wel duidelijk gevoelig. De meest voor de hand liggende verklaring is dat zij in het veld reeds rodenticiden had opgenomen. Een groot deel van de ratten die in het veld reeds vergif opnamen werd door de drie weken die we respecteren vóór de testen uitgesloten van de

testen doordat ze stierven ten gevolge van de intoxicatie. Het is echter niet uitgesloten dat dergelijke ratten die wel overleefden schijnbaar in orde waren maar toch nog een gewijzigde bloedstolling hadden. Bij aanvang van ons onderzoek werd dit opgevangen door bij het begin van de BCR test ook de stollingstijd te bepalen. Gezien in de meeste gevallen de stollingstijd normaal bleek te zijn, zijn we daar voor praktische redenen vanaf gestapt. Dit met het risico dat er inderdaad mogelijk een aantal resistente dieren als gevoelig beschouwd zouden worden.

Voor de twintig ratten die geen mutatie dragen in VKORC1 (WW) maar wel als resistent werden bestempeld door de BCR test zien we dat voor het overgrote deel (19/20) de PCA varieert van 17 tot 27%. Deze ratten zouden dan beschouwd kunnen worden als vals positieven.

Anders ligt het voor rat 1662. Deze testte duidelijk positief voor de BCR test met warfarine (PCA > 50), maar genetisch bleek ze herhaaldelijk te behoren tot het wild type (WW). Hoe kunnen we dit dan verklaren?

- Het valt niet uit te sluiten dat er een mutatie aanwezig zou zijn in een ander exon van VKORC1.
- Daarnaast bestaat de mogelijkheid dat rat 1662 resistent was door een ander mechanisme dan een mutatie in VKORC1. Heiberg vindt in 2009 dertien bromadiolone resistente ratten afkomstig uit de riolen van Kopenhagen zonder mutatie in VKORC1. Haar collega's (Markussen et al. 2008) beschreven dat Deense resistente ratten een verhoogde expressie hebben van bepaalde cytochroom P450 enzymen die instaan voor de metabolisatie. Daarnaast gaf Wallin aan in 2001 dat resistentie gebaseerd kan zijn op de verhoogde aanwezigheid van het ribosomaal eiwit calumenin. Calumenin zou de bindingsplaats voor coumarines in VKOR afschermen en zo bijdragen tot resistentie.

## **7.4 Verschillen tussen de mutaties in VKORC1**

De meerwaarde van een stollingstest is dat deze ons ook leert tegen welke actieve stof een rat resistent is. Combineren we deze informatie met de genetische achtergrond dan kunnen we per mutatie een inschatting maken in welke mate ze bijdraagt tot een bepaalde vorm van resistentie.

### **7.4.1 Mutatie 1: Y139F**

Dit is niet alleen de mutatie die we het eerst hebben aangetroffen in Vlaanderen het is ook de meest voorkomende. Ratten met deze mutatie komen voor in het Westen (Ijzer, Brugse Polders, Gentse Kanalen, Leie en Boven Schelde) en het Oosten (Maas Limburg) (zie figuur 25 ). In totaal bleken 306 van de 360 (=85%) ratten met een mutatie in VKORC1 deze mutatie te dragen. Deze ratten waren allemaal warfarine resistent.

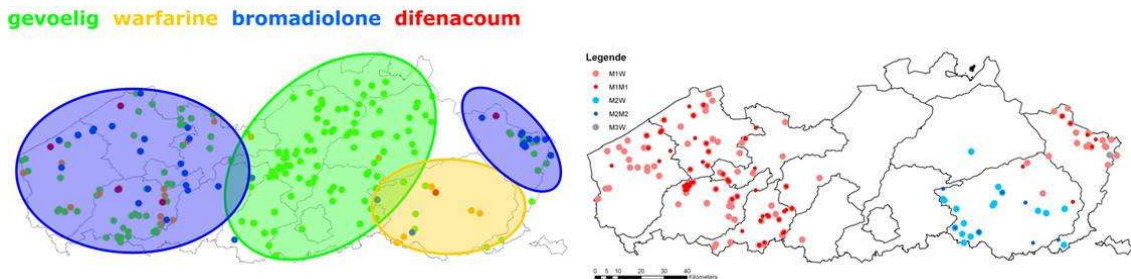
Daarvan werden er 112 getest met bromadiolone en bleken er 90% resistent aan bromadiolone. Ook hier kan een onderschatting opgetreden zijn door een eventueel eerder contact met rodenticiden in het veld.

Van de 306 warfarine resistente ratten werden er 251 getest met difenacoum, slechts 18 ratten (7%) bleken difenacoum resistent. Dat er meer ratten werden getest met difenacoum is een gevolg van het feit dat we in de tweede periode de bromadiolone testen hadden laten vallen om eerder aangehaald redenen.

Vergelijken we heterozygote met homozygote ratten dan blijken respectievelijk 87% en 97% van de ratten bromadiolone resistent. Dit is niet significant verschillend. Voor difenacoum is

het verschil echter wel significant. We vonden dat 15% van de homozygote dragers difenacoum resistent waren en slechts 2% van de heterozygote ratten.

We kunnen dus stellen dat deze mutatie aanleiding geeft tot warfarine en bromadiolone resistentie, vertaald in resistentiehiërarchie wordt dit: warfarine<bromadiolone<difenacoum.



Figuur 25: Geografisch gezien kan resistentie tegen verschillende producten gekoppeld worden aan het voorkomen van ratten met puntmutaties in VKORC1.

## 7.4.2 Mutatie 2: L120Q

Vrij kort na het ontdekken van mutatie 1, leidde onverenigbaarheden tussen bloedstollingstesten en genetische testen tot deze tweede mutatie. Deze komt voornamelijk voor in het Demerbekken. Slechts 46 van de 360 of 13% van de ratten met een mutatie in VKORC1 in Vlaanderen droegen deze mutatie.

Nagenoeg al deze ratten (44/46) bleken warfarine resistent. Tweeënveertig ratten werden ook met bromadiolone getest, daarvan bleken er 6 (of 14%) bromadiolone resistent. In tegenstelling tot de ratten met mutatie 1 lag voor deze 6 dieren het resultaat van de BCR test in de buurt van de afkapwaarde (PCA 10%) en varieerde slechts van PCA 10% tot PCA 15%. Dit betekent dat deze vorm van bromadiolone resistentie duidelijk lager ingeschat moet worden dan die van mutatie 1.

|      | W gevoelig | W resistent | B gevoelig | B resistent | D gevoelig | D resistent |
|------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| M1M1 | 0          | 117         | 1          | 31          | 83         | 15          |
| M1W  | 0          | 189         | 10         | 69          | 150        | 3           |
| M2M2 | 1          | 9           | 5          | 4           | 1          | 4           |
| M2W  | 1          | 35          | 31         | 2           | 9          | 0           |
| M3W  | 0          | 8           | 0          | 7           | 7          | 0           |

Tabel 13: Overzicht van het aantal gevoelige en resistente ratten volgens de BCR resultaten voor warfarine, bromadiolone en difenacoum, opgedeeld per mutatie en homo- en heterozygoten.

Slechts 14 ratten met deze mutatie werden getest met difenacoum. Daarvan bleken er wel 4 of 29% resistent aan difenacoum, dit verschilt echter niet significant met de 14% bromadiolone resistentie. Toch zien we dat voor deze dieren de uitslag van de BCR test verder van de afkapwaarde ligt (PCA 15 tot 44%) waardoor deze mutatie toch van meer belang lijkt te zijn voor de ontwikkeling van difenacoum resistentie dan die van bromadiolone resistentie.

Zowel voor bromadiolone als difenacoum hebben homozygote ratten meer kans om resistent te zijn. Voor bromadiolone was dat 44% voor M2M2 tegenover 6% voor M2W, voor difenacoum respectievelijk 80% tegenover 0%. Vergelijken we beide mutaties dan zien we

wel een significant verschil wat de difenacoum resistentie betreft, 7% voor mutatie 1 en 29% voor mutatie 2.

Hieruit kunnen besluiten dat mutatie 2 voornamelijk bijdraagt tot warfarine resistentie doch ook aanleiding kan geven tot difenacoum en in mindere mate bromadiolone resistentie en dan vooral als het homozygote ratten betreft. Omgezet in een resistentiehiërarchie geeft dit warfarine<difenacoum≤bromadiolone.

### 7.4.3 Mutatie 3: L120C

Deze mutatie werd vrij recentelijk ontdekt bij een vrouwelijke rat afkomstig van Maaseik. Ook zeven van haar 12 nakomelingen droegen deze mutatie. Deze ratten waren allemaal warfarine resistent en enkel de nakomelingen werden getest met bromadiolone en difenacoum. Allen bleken ze resistent aan bromadiolone en niet aan difenacoum. De resistentiehiërarchie is vergelijkbaar met mutatie 1: warfarine<bromadiolone<difenacoum.

## 8 Lokaastesten

### 8.1 Inleiding

Net zoals de genetische testen de bloedstollingstesten meer en meer vervangen op internationaal niveau (Pelz et al. 2005, Rost et al. 2009, Grandemange et al. 2010, Buckle 2013), werden ook de lokaastesten nagenoeg volledig vervangen door de bloedstollingstesten. Als een test vervangen wordt door een andere dan is dat vaak omdat de oudere test achterhaald is, minder praktisch of efficiënt is. Dit gaat niet volledig op voor de lokaastesten. De kans dat ratten een lokaastest overleven is niet zo groot, waardoor deze test ethisch minder goed verkocht kan worden (Kerins et al. 2001). Het is inderdaad een drastische test maar langs de ander kant is het een test die kan aangeven of een bestrijdingsactie in zijn meest rigide vorm, continue opname van giftig lokaas, al dan niet succes kan hebben als er sprake is van resistentie. En op die manier naar de praktijk toe best nog wel nuttige informatie kan opleveren. Een nadeel aan de lokaastest is misschien wel het gebrek aan controle van de opname. Je kan de opname wel dagelijks registreren echter ratten eten zo veel ze willen, waardoor niet elk dier met een vergelijkbare dosis getest wordt.

### 8.2 Werkwijze

De ratten werden gedurende 6 dagen enkel gevoederd met giftig lokaas en dagelijks werd de lokaasopname opgevolgd. De dieren die na de test nog 3 weken overleefden en gedurende dag 5 en 6 van de opname minstens 50 % aten van de hoeveelheid lokaas die ze de eerste twee dagen opnamen, werden als praktisch resistent beschouwd (Greaves 1996, EPPO 1995).



Figuur 26: Beginopstelling van een opnametest met lokaas op basis van bromadiolone (bromabo blok).

In 2008 hebben we voor het eerst een aantal lokaastesten uitgevoerd, 108 ratten werden getest met bromabo blok (0,005% bromadiolone) en 25 met difabo blok (0,005% difenacoum). Bovendien kregen 9 ratten lokaasblokken zonder actieve stof. Met uitzondering van twee ratten uit het veld, waren alle ratten afkomstig van onze kweekkolonie met homozygote resistente ratten (mutatie Y139F) en hadden dus nog nooit contact gehad met rodenticiden. Dieren van deze stam zijn volgens stollingstesten bromadiolone resistent.

### 8.3 Resultaten

In de controlegroep zagen we dat de gemiddelde dagelijkse opname 8,3% van het lichaamsgewicht bedroeg. De ratten in de controlegroep vertoonden gedurende de volledige test een goede gelijkmatige opname. Bij de ratten die giftig lokaas kregen varieerde de opname zeer sterk. In de groep overleefden minder dan 20% van de ratten de test. Echter de interpretatie van de testresultaten bleek niet zo eenvoudig. Vaak zagen we een verminderde opname ofwel gedurende de eerste ofwel de laatste dagen. Dit had tot gevolg dat ratten die gedurende 6 dagen gemiddeld gezien evenveel lokaas opnamen, afhankelijk van het feit dat ze in het begin of het einde van de

test meer of minder opnamen, een andere score kregen. Ratten met een goede opname op het einde waren dan per definitie praktisch resistent, de andere niet.

In het geval van bromadiolone zagen we dat 19 ratten van de 108 of 18% de test overleefden. Hiervan hadden 9 ratten voldoende opname gedurende de laatste 2 dagen om ze als praktisch resistent te beschouwen. De 10 andere hadden blijkbaar tijdens de test een aversie voor het lokaas verworven want hun opname van lokaas liep sterk terug. Het was niet zo dat de dieren in die mate geïntoxiceerd waren dat ze niet meer konden eten. Vermoedelijk zullen zij wel nadelige effecten van de opname ondervonden hebben, waardoor ze de opname staakten voor de rest van de test.

Bij difenacoum overleefden vier van de 25 ratten of 16% de opnametest. Theoretisch zouden 3 van de vier ratten als praktisch resistent beschouwd kunnen worden. Zij overleefden de test immers en namen gedurende de laatste 2 dagen meer dan 50% op dan de eerste 2 dagen. Echter 2 van deze 3 ratten vertoonden geen opname gedurende de test en de derde rat vertoonde slechts de laatste dag een opname. Voor deze drie dieren kunnen we dus geen besluit trekken. De andere rat nam dagelijks gemiddeld 6,2% op. Niet zoveel minder dan de ratten in de controle groep, maar vertoonde de laatste 2 dagen nagenoeg geen opname. Deze rat was dus per definitie niet praktisch resistent. Ook hier verwierf de resistente rat gedurende de test een aversie voor het lokaas, zonder dat ze aan de eigenlijke opname stierf.



Figuur 27: Een opnametest met bromabo blok (bromadiolone) toont aan dat niet alle homozygoot resistente ratten (M1M1) ongevoelig zijn voor het vergif. Drie weken na de test overleefde net geen 20% deze test. Een belangrijk resultaat van deze testen is dat resistente ratten toch lokaasschuwheid kunnen ontwikkelen na opname van lokaas.

## 8.4 Vervolg lokaastesten

Om na te gaan in welke mate praktische resistentie kan worden doorgegeven van generatie tot generatie werden praktisch resistente ratten onderling en met laborratten gekruist. De nakomelingen werden dan op hun beurt aan een opnametest met bromadiolone onderworpen. Het aantal geteste dieren was beperkt waardoor deze opzet als een pilotstudie beschouwd moet worden en de resultaten zeker niet veralgemeend kunnen 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 (33%) waren er 4 (3v/1m) of 27% praktisch resistent. Verder werden eveneens 8 homozygote resistente nakomelingen van KB28(v) en KB 66(v) met R1056(m) met dezelfde procedure getest. Er waren 4 overlevenden (50%) waarvan één rat (m) of 13% praktisch resistent was.

Vergelijken we de verhouding praktisch resistente ratten in onze kolonie met die van hun homozygote nakomelingen dan bleek dit duidelijk niet significant verschillend te zijn. Echter met de heterozygote nakomelingen was dit net niet significant verschillend (fisher exact,  $p = 0,053$ ). Kijken we louter naar de aantallen overlevenden dan was er net een significant verschil (fisher exact,

$p=0,048$ ) tussen de ratten van onze kolonie (19 op 108) en hun homozygote nakomelingen (4 op 8). De kruisingen met labo ratten gaven geen significant verschil.

## 8.5 Besluit

De moeilijke interpretatie van de opnametest door de verschillende opnames in tijd en hoeveelheid per rat, maakt dat het niet eenvoudig is om een duidelijk besluit te trekken. Toch hebben deze testen ons de nodige informatie opgeleverd.

Praktische resistentie tegen bromadiolone komt voor in Vlaanderen. Alle dieren van onze kolonie waren afkomstig van dieren die ooit in het veld gevangen werden. Buiten het feit dat ze volgens de BCR test resistent waren voor bromadiolone en homozygoot drager waren van M1 was er geen doorgedreven selectie gebeurd alvorens ze getest werden.

Er is een duidelijk verschil tussen de resultaten volgens de stollingstesten en de lokaastesten. Dieren die resistent zijn volgens de BCR test overleven zeker niet altijd de lokaastesten. Dit betekent dat mits een doorgedreven bestrijdingsinspanning en hoge opname van lokaas in het veld een deel van een resistente populatie nog bestreden kan worden. Een nadeel is dat hierdoor de praktisch resistente dieren uitgeselecteerd worden en deze eigenschap mogelijk kunnen doorgeven aan hun nakomelingen.

Uit onze beperkte proefopzet om dit na te gaan bleek dat praktische resistentie niet zo maar wordt doorgegeven van de ene generatie naar de andere. Doch de resultaten met de homozygote ratten doen vermoeden dat er wel toename is van de overlevingskans. We zagen immers dat de kans op het overleven van een opnametest, zonder rekening te houden met de daadwerkelijke opname, hoger lag bij de homozygote nakomelingen.

Giftig lokaas werd slechter opgenomen dan vergelijkbaar lokaas zonder actieve component. Een aanwijzing dat de actieve stof een nadelige invloed heeft op de opname van het lokaas.

En misschien wel het belangrijkste besluit is dat sommige ratten na 3 à 4 dagen opname een aversie voor het lokaas ontwikkelden. Blijkbaar ervoeren de ratten bepaalde nadelige gevolgen van het vergif zonder dat ze er aan stierven. Dat ze de opname overleefden was vermoedelijk een gevolg van het feit dat ze genetisch resistent waren. Dit resultaat ondermijnt op zijn minst onder laboratoriumomstandigheden een van de gunstigste eigenschappen van rattenvergif op basis van anticoagulantia, namelijk hun traag werkend effect waardoor lokaasschuwheid normaal wordt vermeden.

## 9 Toekomstige screening

Om na te gaan in welke mate wij de trend van resistentie kunnen opvolgen in de toekomst worden in dit hoofdstuk de resultaten van het resistentieonderzoek vanuit een statistisch standpunt herbekeken. Het doel is een beter inzicht te krijgen in de gegevens en de tekortkomingen van het voorbije onderzoek (geen aselechte steekproef, eenduidig protocol) en dit met behulp van meer geavanceerde technieken (logistische regressie, ruimtelijke correlatie onderzoeken, ...). Voor deze analyses gebruikten we enkel de resultaten van de in het veld gevangen ratten en niet van hun eventuele jongen om bewezen clustering te vermijden.

### 9.1 Verkennende analyse periode 2003-2005

Uit tabel 14 blijkt dat de meeste bekkens voldoende bemonsterd zijn, behalve Boven Schelde en Maas Antwerpen (< 10 observaties). We zien bovendien dat er in een aantal bekkens geen (Dender, Dijle, Nete) of weinig resistente ratten gevangen werden (Beneden Schelde, Gentse Kanalen). Dit kan een mogelijk probleem vormen bij de verwerking van de gegevens. We zullen later bekijken of het zinvol is om enkele bekkens samen te nemen in de analyses.

|                 | gevoelig | resistent |
|-----------------|----------|-----------|
| Beneden Schelde | 145      | 6         |
| Boven Schelde   | 0        | 2         |
| Brugse Polders  | 20       | 13        |
| Demer           | 57       | 22        |
| Dender          | 38       | 0         |
| Dijle           | 38       | 0         |
| Gentse Kanalen  | 30       | 4         |
| Ijzer           | 30       | 18        |
| Leie            | 39       | 16        |
| Maas Antwerpen  | 7        | 0         |
| Maas Limburg    | 40       | 23        |
| Nete            | 33       | 0         |

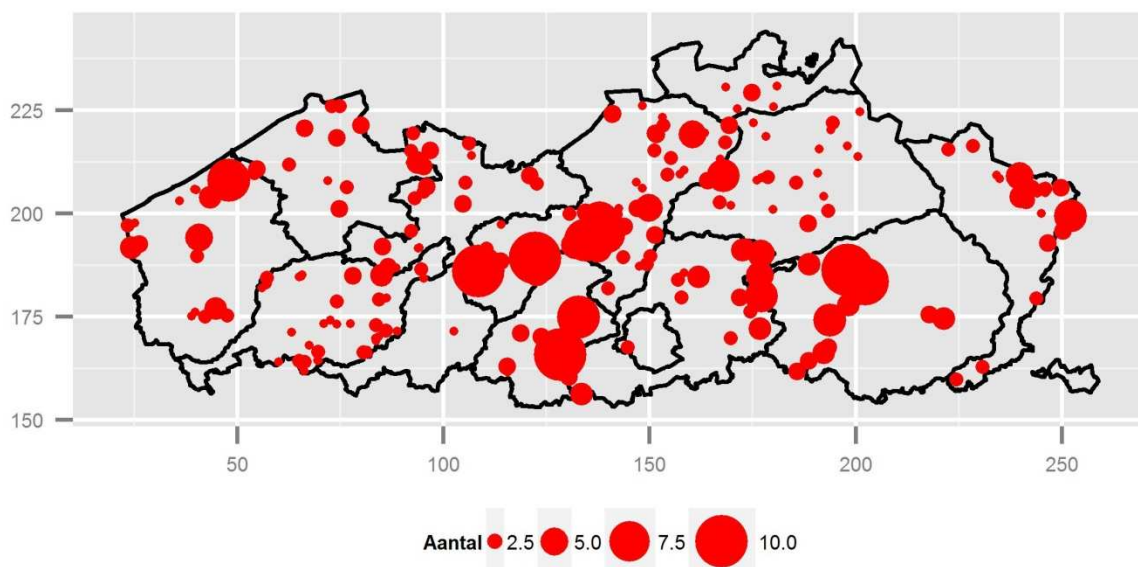
Tabel 14: Verdeling van de resistente ratten per bekken 2003-2005.

Figuur 28 geeft aan dat de locaties niet allemaal even frequent bemonsterd zijn. De doelstelling was om per locatie ongeveer drie ratten te vangen. Dat het werkelijk aantal gevangen dieren per locatie hiervan verschilt is een logisch gevolg van het werken met en het vangen van wilde dieren.

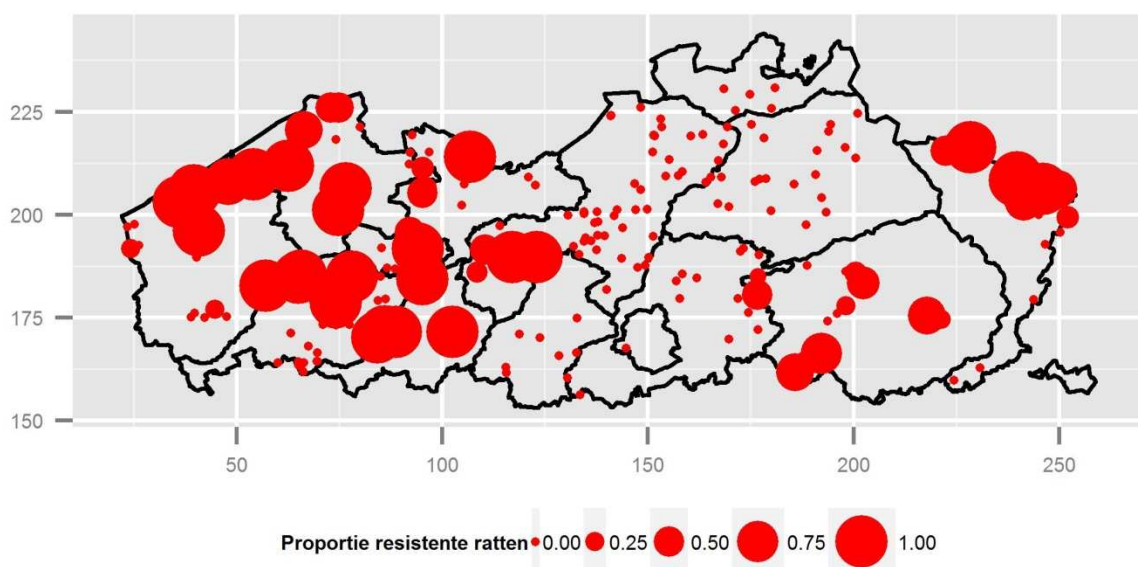
|                          |    |    |    |    |   |   |   |    |
|--------------------------|----|----|----|----|---|---|---|----|
| Aantal ratten            | 2  | 3  | 4  | 5  | 6 | 8 | 9 | 10 |
| Aantal gemeente locaties | 10 | 9  | 8  | 2  | 3 | 1 | 1 | 1  |
| Totaal aantal locaties   | 64 | 43 | 18 | 10 | 5 | 3 | 1 | 4  |

Tabel 15: Aantal locaties met hetzelfde aantal ratten en het aantal gemengde locaties met zowel gevoelige als resistente ratten.

Figuur 29 laat zien dat er grote verschillen zijn in de proportie resistente ratten per locatie, zowel binnen de bekkens als tussen de bekkens. Er zijn slechts 35 van de in totaal 238 locaties (15%) waar de proportie resistente ratten strikt ligt tussen 0 en 1. Als we de locaties met slechts 1 rat in mindering brengen dan komen we op 23%. Dit geeft al duidelijk aan dat de variabiliteit tussen de verschillende locaties veel groter zal zijn dan de variabiliteit binnen een locatie. Tabel 15 laat zien dat op deze 35 gemengde locaties met zowel gevoelige als resistente ratten een heel wisselend aantal ratten getest werd.



Figuur 28: Aantal geteste ratten per locatie 2003-2005.



Figuur 29: Proportie resistente ratten per locatie 2003-2005.

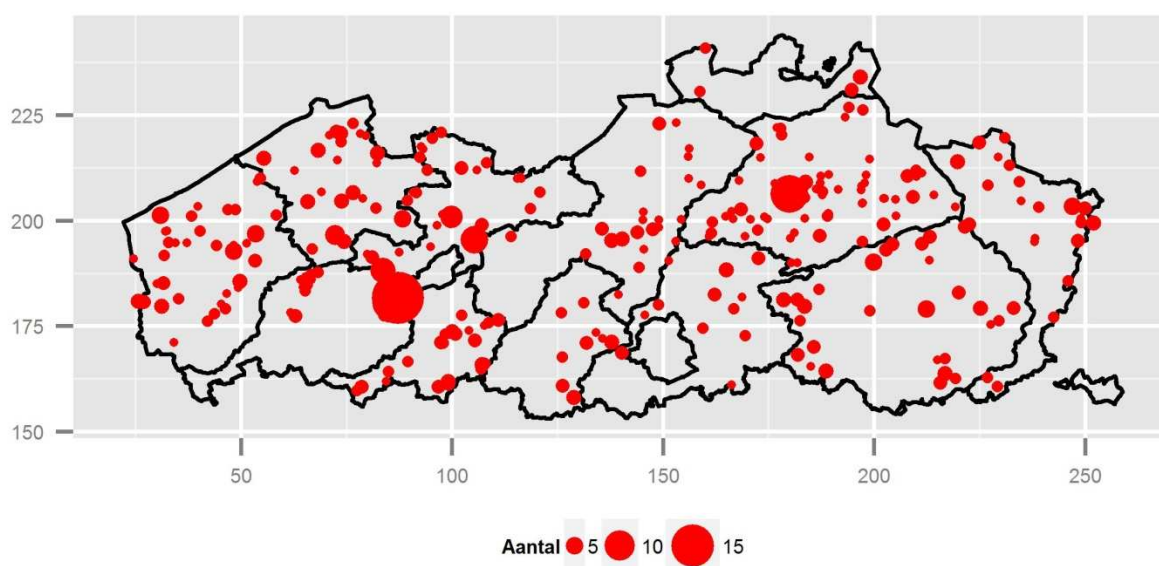
## 9.2 Verkennende analyse periode 2006-2010

Tijdens deze tweede periode werden 17% meer ratten getest dan tijdens de eerste periode. Uit tabel 16 blijkt dat de meeste bekkens voldoende bemonsterd zijn, behalve Dender en Maas Antwerpen kunnen problematisch zijn (< 20 observaties). Tabel 16 geeft eveneens aan dat er in een heel aantal bekkens geen (Beneden Schelde, Dender, Dijle, Maas Antwerpen) of weinig resistente ratten gevangen werden (Nete). Dit kan ook nu mogelijk een probleem vormen bij de verwerking van de gegevens. We zullen later bekijken of het zinvol is om enkele bekkens samen te nemen in de analyses.

|                 | gevoelig | resistent |
|-----------------|----------|-----------|
| Beneden Schelde | 42       | 0         |
| Boven Schelde   | 13       | 44        |
| Brugse Polders  | 27       | 40        |
| Demer           | 63       | 19        |
| Dender          | 18       | 0         |
| Dijle           | 28       | 0         |
| Gentse Kanalen  | 49       | 23        |
| Ijzer           | 46       | 31        |
| Leie            | 18       | 45        |
| Maas Antwerpen  | 11       | 0         |
| Maas Limburg    | 31       | 22        |
| Nete            | 109      | 1         |

Tabel 16: Gevoelige en resistente ratten in de verschillende bekkens 2006-2010.

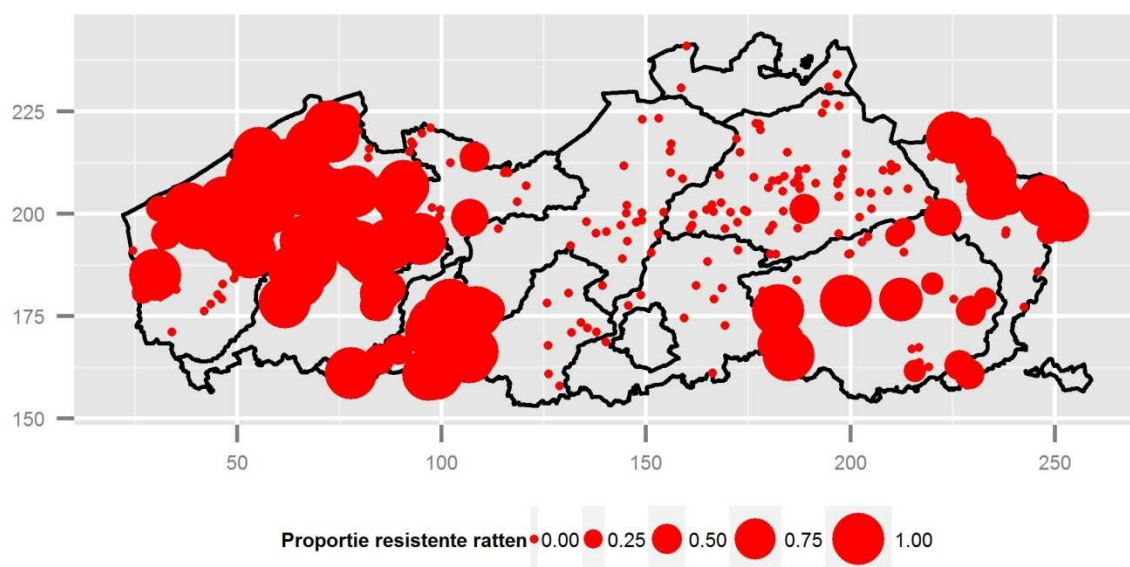
Figuur 30 laat duidelijk zien dat er per locatie een verschillend aantal ratten getest werden. In totaal werden 320 verschillende locaties bemonsterd. Daarnaast zagen we dat er grote verschillen zijn in proportie resistente ratten per locatie (zie figuur 31) zowel binnen bekkens als tussen bekkens.



Figuur 30: Aantal geteste ratten per locatie 2006-2010.

Bij slechts 14% (46 van de 320) van de locaties ligt de proportie resistente ratten strikt tussen 0 en 1. Brengen we echter de locaties met slechts 1 dier in mindering dan komen we aan 26% (46 op 174). Dit geeft opnieuw duidelijk aan dat de variabiliteit tussen de verschillende locaties veel groter zal zijn de variabiliteit binnen een locatie.

Tabel 17 toont aan dat op deze 46 gemengde locaties met zowel gevoelige als resistente ratten een heel wisselend aantal ratten getest werd.



Figuur 31: Proportie resistente ratten 2006-2010.

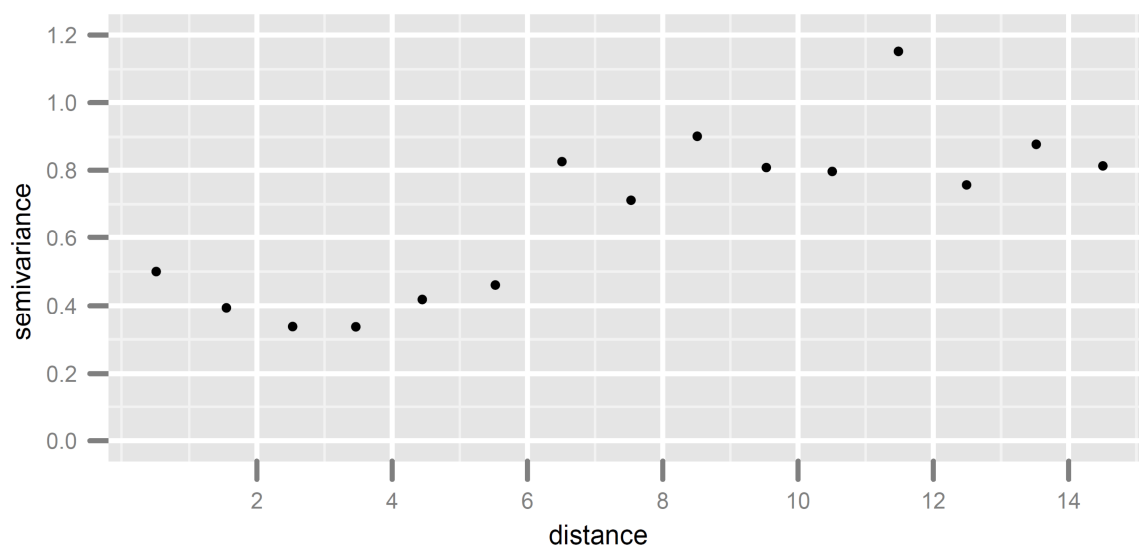
| Aantal ratten            | 2  | 3  | 4  | 5 | 8 | 11 | 19 |
|--------------------------|----|----|----|---|---|----|----|
| Aantal gemengde locaties | 18 | 13 | 7  | 5 | 1 | 1  | 1  |
| Totaal aantal locaties   | 85 | 46 | 28 | 7 | 1 | 1  | 1  |

Tabel 17: Aantal locaties met hetzelfde aantal ratten en het aantal gemengde locaties met zowel gevoelige als resistente ratten 2006-2010.

### 9.3 Logistische regressie en bijkomende analyses

Een logistische regressie werd uitgevoerd om na te gaan of er een verschil was in proportie resistente ratten tussen de verschillende bekkens. Aangezien er meerdere ratten per locatie gevangen werden, en deze waarnemingen sterk gecorreleerd zijn, werd locatie als random effect toegevoegd aan de logistische regressie om hiervoor te corrigeren. Uit de resultaten blijkt dat er een significant verschil is in resistentie tussen de bekkens. Om na te gaan of er een ruimtelijke correlatie was tussen dichtbij gelegen locaties, bestudeerden we het variogram van de random effecten. Hieruit bleek dat locaties dicht bij mekaar gelegen (< 6km) minder variabel zijn, en dus sterker gecorreleerd zijn (zie figuur 32). Dit betekent dat we voor de proefopzet van een volgende screening best rekening houden met het feit dat locaties (vangplaatsen) een goede ruimtelijke spreiding vertonen.

Bijkomende analyses bleken nodig omdat er bekkens zijn met enkel gevoelige ratten, en daardoor eigenlijk "geen" informatie bevatten en omdat er weinig variabiliteit is binnen de locaties. Deze werden dan gebaseerd enerzijds op een dataset waarbij de bekkens zonder resistente ratten verwijderd werden en anderzijds door een aggregatie van de gegevens per locatie, met als respons aan- of afwezigheid van resistente ratten (ongeacht de proportie resistentie).



Figuur 32: Voorbeeld van een variogram van de random effecten op schaal van 15 km, periode 2006-2010.

Hieruit bleek dat enkel met "informatieve" bekkens werken, geen invloed heeft op de parameterschattingen van de resterende bekkens, maar ook niet op de variogrammen. Aggregeren van de gegevens per locatie geeft voor sommige bekkens weinig verlies aan informatie, voor andere bekkens kan dit een over- of onderschatting geven van de kans op resistentie, afhankelijk van de manier waarop geaggregeerd wordt. Hiermee dient rekening gehouden te worden bij de steekproefgroottebepaling.

De berekeningen van de logistische regressie en de bijkomende analyses werden niet in het rapport opgenomen maar kunnen indien gewenst opgevraagd worden.

## 9.4 Steekproefgrootte bepalingen uitgaande voorgaande analyse

Op basis van de analyses van voorgaande screenings leerden we veel over hoe we de steekproef in de toekomst kunnen optimaliseren. Er zijn hierbij twee verschillende strategieën mogelijk.

- Enerzijds kan men kiezen voor niet geclusterde gegevens, wat wil zeggen dat er per locatie slechts 1 rat gevangen wordt.
- Anderzijds kan er gekozen worden voor geclusterde gegevens, waar er meerdere ratten per locatie onderzocht worden.

In de voorbije screenings werd deze laatste optie toegepast. Er is echter gebleken dat de variatie tussen locaties veel groter is dan de variatie binnen locaties, zodat een groot aantal ratten van eenzelfde locatie niet zinvol is. We beperken ons dan ook tot de steekproefbepaling op basis van niet geclusterde gegevens.

### 9.4.1 Niet geclusterde gegevens

We gaan er dus vanuit dat er per locatie het resultaat van slechts 1 rat beschikbaar is. De benodigde steekproefgrootte wordt dan bepaald aan de hand van de huidige kans op resistentie in een bekken. In tabel 18 worden de benodigde steekproefgroottes weergegeven voor verschillende waarden van de kans ( $p$ ) op resistentie, en enkele combinaties in functie van type I-fout of het significantieniveau ( $\alpha$ ) en het onderscheidingsvermogen of power ( $1-\beta$ ).

|     |     | $\alpha=0,05$  | $\alpha=0,05$  | $\alpha=0,10$  | $\alpha=0,10$  |
|-----|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|
| P1  | P2  | $1-\beta=0,90$ | $1-\beta=0,80$ | $1-\beta=0,90$ | $1-\beta=0,80$ |
| 0,0 | 0,1 | 119            | 78             | 88             | 54             |
| 0,1 | 0,2 | 232            | 173            | 183            | 131            |
| 0,2 | 0,3 | 338            | 249            | 263            | 186            |
| 0,3 | 0,4 | 408            | 302            | 319            | 220            |
| 0,4 | 0,5 | 445            | 321            | 341            | 236            |
| 0,5 | 0,6 | 445            | 321            | 341            | 236            |
| 0,6 | 0,7 | 408            | 302            | 319            | 220            |
| 0,7 | 0,8 | 338            | 249            | 263            | 186            |
| 0,8 | 0,9 | 232            | 173            | 183            | 131            |
| 0,9 | 1,0 | 119            | 78             | 88             | 54             |

Tabel 18: Benodigde steekproefgrootte per screening om een stijging van p1 naar p2 te detecteren, bij gegeven  $\alpha$  en  $1-\beta$ .

De steekproef is het grootst wanneer de kans op resistentie ongeveer 50% bedraagt en het kleinst wanneer de kans op resistentie heel klein of groot is ( dicht bij 0 of 1). Bij een kans van 0,5 is namelijk de variantie maximaal en hebben we een grotere steekproef nodig om hetzelfde effect te kunnen detecteren. Op basis van de mixed logistische regressie van screening II delen we de bekkens op in groepen met gelijke kans op resistentie.

#### 9.4.1.1 Groep 1: geen of nagenoeg geen kans op resistentie

- Bekkens waar (bijna) geen resistentie gevonden werd (Beneden Schelde, Dender, Dijle, Maas Antwerpen en Nete).
- Voor deze bekkens hebben we voldoende aan 120 locaties per screening, om een stijging van de resistentie met 10% te kunnen detecteren op het 5% significantieniveau, en een onderscheidingsvermogen van 90%.
- Willen we een stijging van 5% detecteren bij dezelfde  $\alpha$  en  $1-\beta$ , dan hebben we dubbel zoveel locaties nodig ( $n = 254$ ).
- En een stijging van 1% vereist 1330 locaties om dit verschil te kunnen detecteren.
- Minder strenge eisen voor  $\alpha$  en  $1-\beta$  leiden tot een kleinere benodigde steekproefgrootte. Bv. voor  $\alpha = 0,10$  en  $1-\beta = 0,80$  hebben we in de 3 situaties van 10%, 5% en 1% stijging respectievelijk 54, 113 en 590 locaties nodig per screening.

#### 9.4.1.2 Groep 2: 40 tot 50% kans op resistentie

- Bekkens met 40 tot 50% kans op resistentie (Ijzer en Maas Limburg).
- Voor deze bekkens hebben we het meeste locaties nodig, namelijk 445 locaties per screening, om een stijging van de resistentie met 10% te kunnen detecteren op het 5% significantieniveau, en met een onderscheidingsvermogen van 90%.
- Willen we een stijging van 5% detecteren bij dezelfde  $\alpha$  en  $1-\beta$  dan hebben we meer dan 3 maal zoveel locaties nodig ( $n = 1746$ ).
- Minder strenge eisen voor  $\alpha$  en  $1-\beta$  leiden tot een kleinere steekproefgrootte. Bv voor  $\alpha = 0,10$  en  $1-\beta = 0,80$  hebben we in de 2 situaties (10% en 5% stijging) respectievelijk 236 en 933 locaties nodig per screening.
- Een stijging van 1% detecteren is voor deze kans op resistentie haast onmogelijk ( $n = 43013$  en  $n = 22736$  respectievelijk).

#### 9.4.1.3 Groep 3: ongeveer 30% of 60% kans op resistentie

- Bekkens met ongeveer 30% (Demer en Gentse Kanalen) of 60% (Brugse Polders) kans op resistentie
- Voor deze bekkens hebben we voldoende aan 408 locaties per screening, om een stijging van de resistentie naar 10% (of 100%) te kunnen detecteren op het 5% significantieniveau en een onderscheidingsvermogen van 90%.
- Willen we een stijging van 5% detecteren bij dezelfde  $\alpha$  en  $1-\beta$  dan hebben we ook meer dan 3 keer zoveel locaties nodig ( $n = 1538$ ).
- Minder strenge eisen voor  $\alpha$  en  $1-\beta$  leiden tot een kleinere benodigde steekproefgrootte. Bv. voor  $\alpha = 0,10$  en  $1-\beta = 0,80$  hebben we in de 2 situaties (10% en 5% stijging) respectievelijk 220 en 831 locaties nodig per screening.
- Een stijging van 1% detecteren is voor deze kans op resistentie haast onmogelijk ( $n = 36505$  en  $n = 19310$  respectievelijk).

#### 9.4.1.4 Groep 4: ongeveer 80 % kans op resistentie

- Bekkens met ongeveer 80% kans op resistentie (Boven Schelde en Leie).
- Voor deze bekkens hebben we voldoende aan 232 locaties per screening, om een stijging van de resistentie met 10% te kunnen detecteren op het 5% significantieniveau en een onderscheidingsvermogen van 90%
- Willen we een stijging van 5% detecteren bij dezelfde  $\alpha$  en  $1-\beta$ , dan hebben we meer dan 4 keer zoveel locaties nodig ( $n = 1024$ ).
- Minder strenge eisen voor  $\alpha$  en  $1-\beta$  leiden tot een kleinere steekproefgrootte. Bv. voor  $\alpha = 0,10$  en  $1-\beta = 0,80$  hebben we in de 2 situaties (10% en 5% stijging) respectievelijk 131 en 557 locaties nodig per screening.
- Een stijging van 1% detecteren is voor deze kans op resistentie haast onmogelijk ( $n = 27084$  en  $n = 14351$  respectievelijk).

De eventueel gekozen steekproefgrootte is dan nodig op beide tijdstippen of periodes die we willen vergelijken. Willen we over meerdere tijdstippen telkens eenzelfde verschil detecteren, dan moeten we er rekening mee houden dat na een aantal tijdstippen de kans op resistentie veranderd is, en de benodigde steekproefgrootte ook gewijzigd kan zijn. Om zeker te zijn dat het onderscheidingsvermogen niet afneemt in de loop van de tijd, is het dus veiliger om in alle bekkens eenzelfde (maximale) steekproefgrootte te nemen, namelijk deze van groep 2 (ongeveer 50% kans), of deze geleidelijk aan op te drijven naar deze grootteorde. Indien we enkel een stijging van de kans op resistentie verwachten (en dus geen daling), dan is dit enkel nodig voor de bekkens met een kans op resistentie lager dan 50%.

*Opmerking: Bovenstaande berekeningen gaan uit van onafhankelijke locaties. Om dit te realiseren is het noodzakelijk dat er een willekeurige steekproef getrokken wordt uit alle mogelijke locaties binnen een bekken. Dit kan door een random generatie van XY-coördinaten, of eerder door het gebruik van een ruimtelijk gebalanceerde steekproef. In beide gevallen kunnen er restricties opgelegd worden door enkel gebieden in rekening te brengen waar de bruine rat aanwezig is.*

| alpha | power | Bekken         | p    | n1  | power1 | delta1 | n2   | power2 | delta2 | n3   | power3 | delta3 |
|-------|-------|----------------|------|-----|--------|--------|------|--------|--------|------|--------|--------|
| 0.05  | 0.80  | Benedenschelde | 0.00 | 35  | 0.81   | 0.19   | 100  | 0.83   | 0.07   | 300  | 0.95   | 0.03   |
| 0.05  | 0.80  | Bovenschede    | 0.77 | 35  | 0.80   | 0.21   | 100  | 0.85   | 0.14   | 300  | 0.86   | 0.09   |
| 0.05  | 0.80  | Brugse Polders | 0.60 | 35  | 0.81   | 0.28   | 100  | 0.81   | 0.17   | 300  | 0.81   | 0.10   |
| 0.05  | 0.80  | Demer          | 0.23 | 35  | 0.82   | 0.32   | 100  | 0.83   | 0.18   | 300  | 0.85   | 0.10   |
| 0.05  | 0.80  | Dender         | 0.00 | 35  | 0.84   | 0.19   | 100  | 0.85   | 0.07   | 300  | 0.95   | 0.03   |
| 0.05  | 0.80  | Dijle          | 0.00 | 35  | 0.80   | 0.19   | 100  | 0.85   | 0.07   | 300  | 0.95   | 0.03   |
| 0.05  | 0.80  | Gentse Kanalen | 0.32 | 35  | 0.82   | 0.32   | 100  | 0.82   | 0.19   | 300  | 0.84   | 0.11   |
| 0.05  | 0.80  | Ijzer          | 0.40 | 35  | 0.81   | 0.31   | 100  | 0.81   | 0.18   | 300  | 0.82   | 0.11   |
| 0.05  | 0.80  | Leie           | 0.71 | 35  | 0.80   | 0.24   | 100  | 0.81   | 0.15   | 300  | 0.80   | 0.09   |
| 0.05  | 0.80  | Maas Antwerpen | 0.00 | 35  | 0.81   | 0.19   | 100  | 0.84   | 0.07   | 300  | 0.94   | 0.03   |
| 0.05  | 0.80  | Maas Limburg   | 0.42 | 35  | 0.81   | 0.30   | 100  | 0.81   | 0.18   | 300  | 0.82   | 0.11   |
| 0.05  | 0.80  | Nete           | 0.01 | 35  | 0.80   | 0.20   | 100  | 0.84   | 0.09   | 300  | 0.88   | 0.04   |
| 0.05  | 0.80  | Vlaanderen     | 0.33 | 420 | 0.83   | 0.09   | 1200 | 0.81   | 0.05   | 3600 | 0.85   | 0.03   |
| 0.05  | 0.90  | Benedenschelde | 0.00 | 35  | 0.90   | 0.21   | 100  | 0.91   | 0.08   | 300  | 0.94   | 0.03   |
| 0.05  | 0.90  | Bovenschede    | 0.77 | 35  | 0.92   | 0.23   | 100  | 0.92   | 0.16   | 300  | 0.94   | 0.10   |
| 0.05  | 0.90  | Brugse Polders | 0.60 | 35  | 0.92   | 0.32   | 100  | 0.92   | 0.20   | 300  | 0.92   | 0.12   |
| 0.05  | 0.90  | Demer          | 0.23 | 35  | 0.91   | 0.36   | 100  | 0.91   | 0.20   | 300  | 0.94   | 0.12   |
| 0.05  | 0.90  | Dender         | 0.00 | 35  | 0.90   | 0.22   | 100  | 0.93   | 0.08   | 300  | 0.95   | 0.03   |
| 0.05  | 0.90  | Dijle          | 0.00 | 35  | 0.90   | 0.21   | 100  | 0.92   | 0.08   | 300  | 0.94   | 0.03   |
| 0.05  | 0.90  | Gentse Kanalen | 0.32 | 35  | 0.91   | 0.36   | 100  | 0.92   | 0.22   | 300  | 0.90   | 0.12   |
| 0.05  | 0.90  | Ijzer          | 0.40 | 35  | 0.91   | 0.36   | 100  | 0.92   | 0.22   | 300  | 0.93   | 0.13   |
| 0.05  | 0.90  | Leie           | 0.71 | 35  | 0.91   | 0.26   | 100  | 0.92   | 0.18   | 300  | 0.92   | 0.11   |
| 0.05  | 0.90  | Maas Antwerpen | 0.00 | 35  | 0.93   | 0.22   | 100  | 0.92   | 0.08   | 300  | 0.94   | 0.03   |
| 0.05  | 0.90  | Maas Limburg   | 0.42 | 35  | 0.92   | 0.36   | 100  | 0.90   | 0.22   | 300  | 0.93   | 0.13   |
| 0.05  | 0.90  | Nete           | 0.01 | 35  | 0.92   | 0.24   | 100  | 0.91   | 0.10   | 300  | 0.96   | 0.05   |
| 0.05  | 0.90  | Vlaanderen     | 0.33 | 420 | 0.93   | 0.11   | 1200 | 0.92   | 0.06   | 3600 | 0.97   | 0.04   |
| 0.10  | 0.80  | Benedenschelde | 0.00 | 35  | 0.80   | 0.15   | 100  | 0.84   | 0.06   | 300  | 0.85   | 0.02   |
| 0.10  | 0.80  | Bovenschede    | 0.77 | 35  | 0.83   | 0.19   | 100  | 0.81   | 0.12   | 300  | 0.85   | 0.08   |
| 0.10  | 0.80  | Brugse Polders | 0.60 | 35  | 0.84   | 0.25   | 100  | 0.84   | 0.16   | 300  | 0.82   | 0.09   |
| 0.10  | 0.80  | Demer          | 0.23 | 35  | 0.83   | 0.28   | 100  | 0.82   | 0.15   | 300  | 0.87   | 0.09   |
| 0.10  | 0.80  | Dender         | 0.00 | 35  | 0.81   | 0.15   | 100  | 0.86   | 0.06   | 300  | 0.85   | 0.02   |
| 0.10  | 0.80  | Dijle          | 0.00 | 35  | 0.84   | 0.16   | 100  | 0.87   | 0.06   | 300  | 0.84   | 0.02   |
| 0.10  | 0.80  | Gentse Kanalen | 0.32 | 35  | 0.84   | 0.29   | 100  | 0.83   | 0.16   | 300  | 0.83   | 0.09   |
| 0.10  | 0.80  | Ijzer          | 0.40 | 35  | 0.81   | 0.28   | 100  | 0.84   | 0.17   | 300  | 0.80   | 0.09   |
| 0.10  | 0.80  | Leie           | 0.71 | 35  | 0.83   | 0.22   | 100  | 0.83   | 0.14   | 300  | 0.82   | 0.08   |
| 0.10  | 0.80  | Maas Antwerpen | 0.00 | 35  | 0.81   | 0.16   | 100  | 0.84   | 0.06   | 300  | 0.87   | 0.02   |
| 0.10  | 0.80  | Maas Limburg   | 0.42 | 35  | 0.83   | 0.29   | 100  | 0.84   | 0.17   | 300  | 0.81   | 0.09   |
| 0.10  | 0.80  | Nete           | 0.01 | 35  | 0.82   | 0.16   | 100  | 0.81   | 0.07   | 300  | 0.81   | 0.03   |
| 0.10  | 0.80  | Vlaanderen     | 0.33 | 420 | 0.84   | 0.08   | 1200 | 0.89   | 0.05   | 3600 | 0.92   | 0.03   |
| 0.10  | 0.90  | Benedenschelde | 0.00 | 35  | 0.91   | 0.19   | 100  | 0.92   | 0.07   | 300  | 0.98   | 0.03   |
| 0.10  | 0.90  | Bovenschede    | 0.77 | 35  | 0.90   | 0.21   | 100  | 0.94   | 0.15   | 300  | 0.94   | 0.09   |
| 0.10  | 0.90  | Brugse Polders | 0.60 | 35  | 0.90   | 0.28   | 100  | 0.91   | 0.18   | 300  | 0.92   | 0.11   |
| 0.10  | 0.90  | Demer          | 0.23 | 35  | 0.92   | 0.33   | 100  | 0.92   | 0.19   | 300  | 0.91   | 0.10   |
| 0.10  | 0.90  | Dender         | 0.00 | 35  | 0.91   | 0.18   | 100  | 0.92   | 0.07   | 300  | 0.98   | 0.03   |
| 0.10  | 0.90  | Dijle          | 0.00 | 35  | 0.92   | 0.18   | 100  | 0.94   | 0.07   | 300  | 0.98   | 0.03   |
| 0.10  | 0.90  | Gentse Kanalen | 0.32 | 35  | 0.91   | 0.34   | 100  | 0.92   | 0.19   | 300  | 0.94   | 0.11   |
| 0.10  | 0.90  | Ijzer          | 0.40 | 35  | 0.90   | 0.34   | 100  | 0.92   | 0.20   | 300  | 0.91   | 0.11   |
| 0.10  | 0.90  | Leie           | 0.71 | 35  | 0.90   | 0.24   | 100  | 0.92   | 0.16   | 300  | 0.94   | 0.10   |
| 0.10  | 0.90  | Maas Antwerpen | 0.00 | 35  | 0.90   | 0.18   | 100  | 0.94   | 0.07   | 300  | 0.98   | 0.03   |
| 0.10  | 0.90  | Maas Limburg   | 0.42 | 35  | 0.91   | 0.33   | 100  | 0.90   | 0.19   | 300  | 0.92   | 0.11   |
| 0.10  | 0.90  | Nete           | 0.01 | 35  | 0.90   | 0.19   | 100  | 0.92   | 0.09   | 300  | 0.94   | 0.04   |
| 0.10  | 0.90  | Vlaanderen     | 0.33 | 420 | 0.92   | 0.09   | 1200 | 0.96   | 0.06   | 3600 | 0.91   | 0.03   |

Tabel 19: Overzicht van de te detecteren toename of afname (delta) in functie van de jaarlijkse steekproefgrootte (35, 100, 300), alfa en power.

## 9.5 Steekproefgrootte uitgaande van praktische overwegingen

In voorgaande steekproefbepalingen vertrokken we van een vooropgestelde detectielimiet en bijhorend significantieniveau en power. Dit gaf afhankelijk van het resistentieniveau per bekken een zeer verschillend aantal te testen dieren. Daar echter de inspanningen voor het vangen van dieren per bekken mogelijk niet veel kunnen verschillen leek het ons interessant om de zaak ook eens om te draaien. Welke stijging in resistentie zouden we nog kunnen detecteren als we vertrekken van een vast aantal ratten per bekken?

Tabel 19 geeft weer welke stijging (delta) gedetecteerd kan worden met een steekproef van 35, 100 en 300 ratten per bekken, vertrekkende van de geobserveerde resistentie in de 2e screening. Ze bevat voor elk bekken afzonderlijk, en voor Vlaanderen in zijn geheel berekeningen voor 4 verschillende combinaties van type I-fout of alfa (0,05 en 0,10) en power (0,80 en 0,90).

Bekijken we bijvoorbeeld de eerste situatie (alfa= 0,05, power= 0,80), dan zien we voor Vlaanderen dat er met een jaarlijkse steekproef van 35 ratten per bekken een stijging van ongeveer 10% gedetecteerd kan worden. Per bekken kunnen echter slechts stijgingen van ongeveer 20 tot 30% gedetecteerd worden. Na 3 jaar (met dus ongeveer 100 ratten per bekken) kan op niveau van Vlaanderen een resistentietoename van 5% gedetecteerd worden, op bekken niveau varieert dit van ongeveer 10 tot 20% (hierbij is geen rekening gehouden met het feit dat de gegevens gespreid zijn over 3 jaren, en een mogelijk voor- of nadeel hiervan indien gekozen wordt voor dezelfde locaties). Als er jaarlijks 100 ratten per bekken gevangen worden, dan kunnen de vorige toenames reeds na 1 jaar gedetecteerd worden (Vlaanderen 5%, per bekken 10 tot 20%), en na 3 jaar (met dus 300 ratten per bekken) een toename van 3% voor Vlaanderen en 3 tot 10% per bekken. Ook voor deze laatste situatie werd er geen rekening gehouden met het feit dat jaarlijks dezelfde locaties bezocht kunnen worden. Voor andere combinaties van alfa en power zijn de resultaten vergelijkbaar.

## 10 Slotwoord

Bij aanvang van deze studie was er over resistentie tegen rodenticiden in België nagenoeg niets geweten. Het enige dat we daarover in de literatuur konden terugvinden was een vermelding van Lund in 1984 over resistentie bij huismuizen in België. Hij verwijst daarvoor naar een persoonlijke anonieme communicatie en het is dan ook niet duidelijk waar hij zijn informatie vandaan heeft gehaald.

Tien jaar later staan we duidelijk een stap verder. Volgende vragen werden gesteld bij aanvang van de studie:

- Is er bij de bruine rat in Vlaanderen überhaupt wel resistentie tegen rattenvergift aanwezig?
- Volgt dit een bepaalde geografische spreiding?
- Als er resistentie is bestaat er dan resistentie tegen meerdere producten en zo ja dewelke?
- In welke mate of gradatie is resistentie aanwezig?

Later, met de evolutie van de genetische ontwikkelingen in het resistentieonderzoek vroegen we ons ook nog af welke verschillende mutaties in het VKORC1 gen verantwoordelijk waren voor resistentie in Vlaanderen.

Wat de eerste vraag betreft kregen we al vlug een antwoord. Op 18 juni 2003 testten we op basis van bloedstollingstesten onze eerste rat warfarine resistent. Het dier, rat nummer 38, was afkomstig van Kinrooi gelegen in het bekken van Maas Limburg. Reeds in datzelfde jaar werden nog ratten gevonden die resistent waren tegen bromadiolone en difenacoum.

Op basis van de eerste testresultaten van 691 ratten in de periode van 2003 tot 2005 zagen we reeds een duidelijke geografisch verspreiding van resistentie in Vlaanderen. Deze resultaten werden bevestigd in een tweede screening van 2006 tot 2010 waarbij nog eens 845 ratten werden getest. Gemiddeld gezien over beide periodes neemt resistentie in Vlaanderen toe van ongeveer 20% tot ongeveer 35%. Aangevuld met informatie over de genetische achtergrond leverde dat een beeld op waarbij we Vlaanderen kunnen opdelen in vier regio's.

Een eerste regio is gesitueerd in het Westen en omvat de rivierbekkens van de Ijzer, Brugse Polders, Gentse Kanalen, Leie en Boven Schelde. Een tweede in het Oosten en komt overeen met het bekken Maas Limburg. Resistente ratten afkomstig van beide regio's zijn drager van mutatie 1 of Y139F en worden gekenmerkt door resistentie tegen warfarine en ook bromadiolone. Het percentage resistente ratten varieert van ongeveer 35% in het Ijzerbekken tot 80% in het bekken van de Boven Schelde. In de loop van de jaren zagen we voornamelijk een toename van resistentie in het Westen, vooral dan in de Brugse Polders en de Gentse Kanalen. In Maas Limburg zagen we dan eerder een lichte daling van ongeveer 50% naar 40% resistentie.

Mutatie Y139F is in Vlaanderen de meest algemeen voorkomende mutatie (85%), net zoals in Frankrijk waarbij in een studie met 268 ratten bijna 30% van de ratten deze mutatie droegen. Dit was goed voor ongeveer 75% van de ratten met een mutatie in VKORC1 (Grandemange et al. 2010). Diezelfde onderzoeksgroep had eerder na terugkruisingen met laborratten een labostam gecreëerd met de Y139F mutatie in VKORC1 (Grandemange et al. 2009). Na BCR testen op deze dieren bleken ze ook bromadiolone resistent te zijn. Recentelijk werd deze mutatie ook in Kent, Verenigd Koninkrijk teruggevonden. Dit op een plaats waar ze in de praktijk bromadiolone resistentie hadden vastgesteld (Prescott et al. 2011). Deze resultaten kom overeen met onze bevindingen. Verder werd de mutatie ook bij ratten in Korea en Nederland teruggevonden (Rost et al. 2009, van der Lee 2011).

Naast mutatie 1 vonden we in Maaseik ook nog een andere mutatie (Y139C) terug. Tot hiertoe is dat de enige plaats in Vlaanderen waar we deze mutatie aantreffen. De ratten met mutatie Y139C bleken resistent aan warfarine en bromadiolone. In het buitenland werd deze mutatie vooral

bestudeerd in Denemarken en Duitsland waar ze veel voorkomend is (Pelz et al. 2005, Heiberg 2009). Daarvan weten we dat ze aanleiding geeft tot bromadiolone en in mindere mate difenacoum resistentie. De resistentiehiërarchie in beide regio's is voor de twee mutaties gelijk en kunnen we als volgt omschrijven: warfarine < bromadiolone < difenacoum.

De derde regio in Vlaanderen komt overeen met het Demerbekken en is gekenmerkt door aanwezigheid van resistente ratten met puntmutatie L120Q. Deze mutatie draagt voornamelijk bij tot resistentie tegen warfarine. Echter met toenemende homozygotie is de kans reëel dat difenacoum resistentie zal toenemen. Dit komt dan ook overeen met gegevens vanuit Engeland waar de traditionele Berkshire en Hampshire stammen, gekenmerkt door deze mutatie, resistentie vertoonden tegen difenacoum en in mindere mate tegen bromadiolone (Buckle, 2012). Hierop gebaseerd kunnen we stellen dat de resistentiehiërarchie in het Demerbekken gelijk is aan warfarine < difenacoum ≤ bromadiolone.

Tot slot is er nog een vierde regio in Vlaanderen gekenmerkt door afwezigheid van resistentie. In de centraal gelegen bekkens Beneden Schelde, Dender, Dijle, Nete en Maas Antwerpen zitten er volgens onze resultaten op uitzondering van enkele plaatsen in de periferie geen resistente ratten. Op zich merkwaardig want je zou verwachten dat bestrijding een rol zou spelen in het uitsélectioneren van resistentie. Gezien de bestrijding van de bruine rat in Vlaanderen gemiddeld gezien niet verschilt per regio, moet de oorzaak ergens anders gezocht worden. We weten dat de bruine rat zowat overal aanwezig is in Vlaanderen (Stuyck 2003). Bovendien is Vlaanderen dicht bevolkt, sterk gefragmenteerd, doorvlochten met wegen en daaraan gekoppeld behoorlijk wat verkeer (EEA 2007). Allemaal factoren die de dispersie van ratten kunnen vergemakkelijken en dus ook de verspreiding van resistente ratten in de hand zouden kunnen werken. Toch blijkt dit niet uit onze gegevens. Op zijn minst een merkwaardig feit waarvoor we de verklaring schuldig moeten blijven.

Een specifieke veldstudie om na te gaan welke invloed resistente ratten hebben op de bestrijding in de praktijk, hebben we niet uitgevoerd. Maar in 2011 hebben we op vraag van RATO, een vzw die oa instaat voor de bestrijding van de bruine rat in Oost-Vlaanderen, wel nagegaan in welke mate resistentie problemen veroorzaakte in Nazareth. Daar bleek immers in vergelijking met andere gemeenten meer vergif gebruikt te worden zonder het verwachte resultaat. 27 ratten afkomstig van 7 verschillende plaatsen in Nazareth werden door ons getest. Ze droegen allemaal mutatie 1 (21 M1M1 en 6 M1W) en bleken volgens de BCR test resistent aan warfarine en op drie na allemaal nog gevoelig te zijn aan difenacoum. Een half jaar later werden nog eens 15 ratten genetisch getest, met een vergelijkbaar resultaat: 12 M1M1 en 3 M1W. Op een totaal van 43 ratten was er geen enkele rat zonder mutatie in VKORC1 en bedroeg de graad van homozygotie bijna 80%. Alle gevoelige ratten in het veld werden dus waarschijnlijk wel bestreden maar op de resistente ratten had de bestrijding geen vat meer. Een schoolvoorbeeld van hoe een doorgedreven bestrijding resistentie kan uitsélectioneren maar vooral een teken aan de wand dat resistente ratten in het veld daadwerkelijk voor problemen zorgen. Deze resultaten staan in schril contrast met de bevindingen van Greaves (1996) waarbij heterozygote ratten de beste relatieve fitness zouden hebben in geval van langdurige bestrijding (zie ook p.20).

Lokaaltesten met homozygote M1M1 ratten in ons labo toonden aan dat deze ratten nog deels te bestrijden zijn met bromadiolone, het vergif waar ze volgens de bloedstollingstesten resistent aan waren. Hierbij toch even in herinnering brengen dat lokaaltesten vrij drastisch zijn omdat de ratten zes dagen gevoederd worden met enkel giftig lokaas. Een vergelijkbare vorm van bestrijding is in de praktijk waarschijnlijk zelfs niet eens te realiseren omdat daar steeds andere voedselbronnen aanwezig zijn. Dat resistente ratten dan toch nog gedood kunnen worden met vergif waartegen ze resistent zijn klinkt dan misschien wel paradoxaal maar op zich is dat niet zo eigenaardig. Intoxicatie is nu eenmaal dosis gebonden. Een voldoende hoge opname van het lokaas blijft dus de vereiste. Voor eerste generatie anticoagulantia gaat deze redenering niet meer op. De dosis actieve stof in het lokaas, vaak is dat 0,005%, is gezien de hoge resistentiegraad daarvoor niet hoog genoeg.

Deze ogenschijnlijke contradictie kan ook verklaard worden door de verschillende definities die gebruikt worden om resistentie te omschrijven en waarbij onderscheid gemaakt wordt tussen technische en praktische resistentie. BCR testen sluiten eerder aan bij de definitie van technische resistentie, terwijl lokaastesten eerder resulteren in inzichten rond praktische resistentie (Buckle 2006). Ook al is het niet duidelijk waar de grens juist ligt, het verklaart wel waarom we geen verband vonden tussen de resultaten van de bloedstollingstesten en de lokaastesten.

Verder leerden de lokaastesten ons dat er daadwerkelijk ratten waren die een dieet van zes dagen giftig lokaas op basis van bromadiolone overleefden. Ratten die de lokaastesten in het labo overleefden zouden in de praktijk met hetzelfde vergif nog moeilijk te bestrijden zijn. We zagen wel een merkwaardig verschil tussen de verschillende ratten die de test overleefden. Er waren ratten die gedurende de zes dagen een goede opname vertoonden en dus de stempel praktisch resistent verdienden, maar er waren echter ook ratten die dit predicaat meekregen omdat ze net in het begin, de eerste twee dagen dus, minder aten. Daarnaast waren er ratten die de laatste dagen minder opnamen. Gemiddeld gezien hadden die evenveel gegeten als de ratten die in het begin minder aten, maar ze werden wel anders beoordeeld. Wij hebben ons dan ook niet blind gestaard op deze regel en ook rekening gehouden met de ratten die na enkele dagen stopten met eten en de test overleefden.

Dergelijk gedrag wordt in de bestrijdingscontext omschreven als lokaasschuwheid en zagen we vroeger reeds optreden bij het gebruik van acuut werkend vergif. Te lage opnames van giftig lokaas na verstoring of na het instinctmatig verorberen van kleine porties van een nieuwe voedselbron leidde dan tot een negatieve prikkel maar zonder dat de ratten stierven. Ratten met een dergelijke ervaring lieten het lokaas nadien links liggen. Vermoedelijk is het in onze testen ook zo verlopen. De ratten ondervonden enig nadeel, stopten met eten en in combinatie met hun genetische achtergrond overleefden ze daardoor een dosis vergif die een gevoelige rat zeker gedood zou hebben. Dit betekent dat op zijn minst onder labocondities een belangrijk voordeel van anticoagulantia als rodenticide, de trage werking waardoor er normaal gezien geen lokaasschuwheid optreedt, onderuit gehaald werd. In de praktijk betekent dit dat resistente dieren met een eventueel beperktere resistentiegraad mogelijk ook niet meer te bestrijden zijn.

Tijdens het verloop van onze studie hebben we noch van individuele ratten noch van een kleine groep ratten de resistentiegraad bepaald. Dit gebeurde vroeger door de LD<sub>50</sub> waarden te vergelijken van groepen gevoelige en resistente ratten. De verhouding tussen beide was dan de resistentiegraad. Vandaag de dag worden geen dierproeven meer toegelaten voor de bepaling van een LD<sub>50</sub> en dat was dus niet langer een optie. Later in 2007 stelde Prescott voor om een veelvoud van de testdosis van de SBCR te gebruiken. Gezien de BCR in vergelijking met de SBCR voor 2<sup>e</sup> generatie anticoagulantia zowel verschillen in de dosis als het gebruikte tijdsinterval is het niet mogelijk om dit zo maar om te rekenen. Maar omdat de door ons gebruikte dosis (5mg/kg) in de BCR test hoger lag dan voorzien in de SBCR test kunnen we toch een inschatting maken van de resistentiegraad. Voor de dosis alleen zou het betekenen dat zowel voor difenacoum als bromadiolone de resistente ratten hier op zijn minst een factor 8 resistent zijn (zie tabel 7). Gezien het langere tijdsinterval en dus langere inwerking tijdens de BCR test betekent dit dat de werkelijke factor hoger moet liggen.

Onze resultaten toonden aan dat er behoorlijk wat individuele verschillen zijn in respons op de BCR test. In de eerste plaats zijn er natuurlijk de verschillen doordat ratten gevoelig of resistent zijn. Voor de 568 ratten waarvoor we zowel een resultaat hadden van de BCR als de genetische test, zagen we een grote overeenkomst tussen de uitslag van beide testen (kappa van 0,915 [CI 95%, 0,880-0,950]). Dergelijke hoge overeenkomst zagen we in 2005 ook bij Pelz et al. met slechts een mismatch voor 10 van de 428 geteste ratten wat resulteerde in een kappa van 0,947 [CI 95%, 0,915-0,980]. Met dergelijke hoge overeenkomsten kunnen we ervan uitgaan dat de aan- of afwezigheid van een puntmutatie in VKORC1 bepaalt of een rat respectievelijk resistent of gevoelig is. Concreet betekent dit dat voor ratten veranderingen in de farmacodynamiek het belangrijkste

mechanisme achter resistentie is. Dit biedt perspectieven om in de toekomst ons te concentreren op de mutaties in VKORC1 zonder daarbij nog afhankelijk te zijn van bloedstollingstesten. Dit laat toe om heel wat meer dieren te testen en zo een beter zicht op de situatie te krijgen.

Daarnaast zagen we ook binnen de groepen van gevoelige en resistente ratten individuele verschillen in de bloedstolling. Waarbij we kunnen stellen dat hoe verder het resultaat van de afkapwaarde ligt hoe resistenter of hoe gevoeliger een rat is. We vermoeden dat deze kleinere verschillen eerder te wijten zijn aan veranderingen in farmacokinetiek of de metabolisatie van het vergif door oa verschillende cytochroom P450 enzymen. Net zoals er verschillen werden waargenomen in de expressie van cyp2e1 tussen mannelijke en vrouwelijke ratten, welk een mogelijke verklaring is waarom vrouwelijke ratten toleranter zijn aan rattenvergif dan mannelijke ratten (Markussen et al. 2008). In die hypothese versterkt een verhoogde metabolisatie mogelijk de effecten van de mutaties in VKORC1 en verklaart dit misschien waarom ratten met dezelfde mutatie toch een verschillende resistentiestatus kunnen hebben tegenover bijvoorbeeld bromadiolone en difenacoum.

Voor de toekomstige screening werden verschillende scenario's uitgewerkt zowel uitgaande van het gewenst te detecteren verschil als eerder vanuit praktische overwegingen. Na overleg met de VMM werd er beslist om de laatste piste te volgen. Voor hen is het een haalbare kaart om vanaf 2013 jaarlijks per bekken 100 ratten van 100 verschillende locaties te vangen.

Uit de statistische analyse van onze resultaten kwamen daarbij twee belangrijke punten naar voor:

- één rat per locatie;
- maximale spreiding van de locaties.

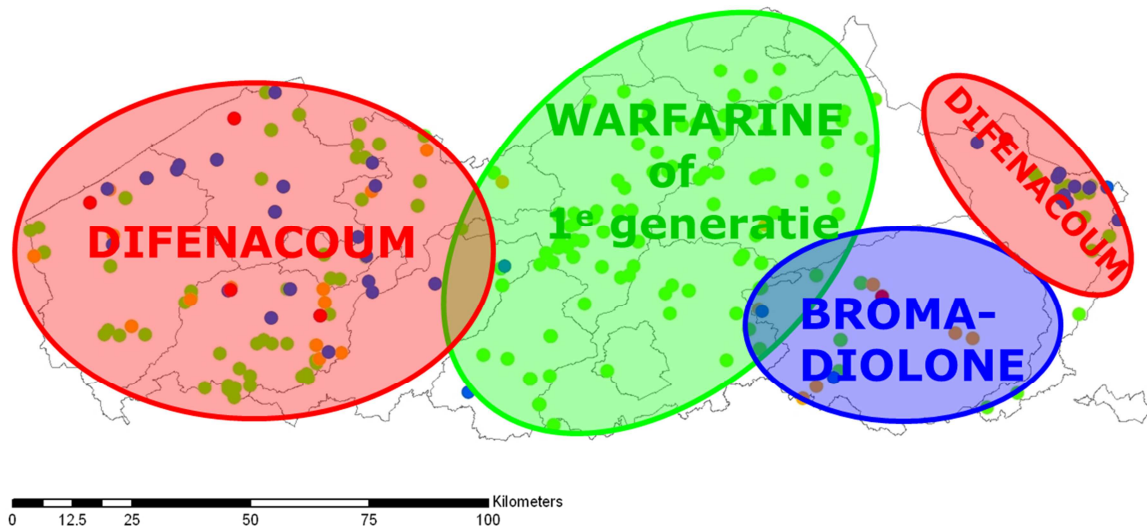
We zagen immers dat de variatie binnen een locatie kleiner is dan de variatie tussen de locaties, wat betekent dat als we meerdere ratten van een bepaalde locatie vangen en testen dit ons nagenoeg niet meer informatie oplevert. Daarnaast leerden de analyses ons dat locaties die minder dan 6 km bij elkaar liggen, minder variabel zijn. Deze ruimtelijke correlatie dwingt ons om een goede spreiding te voorzien van de toekomstige vangplaatsen. Als we deze kennis respecteren dan zullen we in de toekomst per jaar en per bekken een gemiddelde stijging van resistentie van ongeveer 10 tot 20% kunnen detecteren. Op niveau van Vlaanderen spreken we dan over een detectieniveau van 5%. In periodes van 3 jaar wordt dit dan zelfs 3 tot 10% per bekken of 3% voor Vlaanderen.

Nu we meer inzicht hebben verworven in de resistentie problematiek en met de toekomstige screening in het vooruitzicht blijft de vraag: Hoe kunnen we met resistentie omgaan in de bestrijding? Uit onze resultaten halen we zeker aanwijzingen over welke producten waar te gebruiken (zie figuur 33). Zo is het voor regio 1 en 2 aangewezen om gebruik te maken van difenacoum om resistente ratten te bestrijden. Dit in tegenstelling met regio 3 waar het eerder aangewezen is om bromadiolone te gebruiken. In regio 4 waar geen resistentie is kan in principe naast bromadiolone of difenacoum ook nog gebruik gemaakt worden van 1<sup>e</sup> generatie producten.

Blijkt de situatie in de toekomst te veranderen dan kunnen deze richtlijnen altijd aangepast worden aan de nieuwe omstandigheden. Belangrijk bij het gebruik van vergif in geval van resistentie is dat men steeds de verdelging van de volledige populatie moeten nastreven. Resterende resistente ratten en hun nakomelingen zullen anders vlug de vrijgekomen ruimte innemen. Met als gevolg een nieuwe nog moeilijker te bestrijden populatie.

Sommige onderzoekers hebben aangetoond dat de producten zoals brodifacoum nog goed werken tegen resistente ratten. En zijn dan ook voorstander van het gebruik ervan (Buckle et al. 2012). Hier in België zijn deze producten niet toegelaten voor het gebruik buitenshuis. In dat opzicht kunnen zij ook niet bijdragen tot de bestrijding van resistente ratten die buiten leven. Bovendien vormen ze door hun persistent karakter een verhoogd risico voor secundaire intoxicatie. Net om die

reden houdt de Europese Commissie de rodenticiden op basis van anticoagulantia scherp in het oog. Het ziet er zelfs naar uit dat indien er een waardig alternatief zou zijn voor de bestrijding, deze producten van de markt geweerd zullen worden.



Figuur 33: Overzicht van welke producten aangewezen zijn om resistente ratten te bestrijden.

Naast het aangepast gebruik van rodenticiden om resistentie tegen te gaan resten er ons niet zoveel extra mogelijkheden. Hierbij willen we dan ook het belang van het gebruik van preventieve maatregelen nogmaals onderstrepen. Deze zijn natuurlijk niet alleen aangewezen in geval van resistentie maar maken deel uit van een goede rattenbestrijding. Alleen worden zij nog te vaak vergeten of niet toegepast. Preventieve maatregelen zorgen ervoor dat ratten ontmoedigd worden om zich ergens te vestigen. Eenvoudig gezegd komt het er op neer dat er geen voedsel en schuilplaatsen vrij aanwezig mogen zijn die ratten het leven aangenaam maken. Daarnaast kunnen ratten geweerd worden uit gebouwen door verschillende bouwtechnische maatregelen en kan op plaatsen waar het aangewezen is gebruik gemaakt worden van mechanische bestrijding. Een eerder theoretische optie om resistentie te onderdrukken is het behoud van gevoelige populaties van waaruit dan dieren kunnen migreren en zo de resistentiedruk op andere locaties kunnen verminderen.

Het is Greaves die in Buckle & Smith (1996) schrijft dat er voor de toekomst rond resistentie maar twee zekerheden zijn. Het onverminderd gebruik van vergif waartegen resistentie bestaat zal resistentie doen toenemen. Het gericht gebruik van producten waartegen geen resistentie bestaat zal resistentie doen verminderen. Als we dit vrij interpreteren dan betekent dit dat je op zijn minst de situatie moet opvolgen om gepast te kunnen reageren. We vinden het dan ook belangrijk dat onze verworven kennis naar de praktijk vertaald werd en zal worden.

## Referenties

- ATTERBY H, KELLY MJ & MACNICOLL AD (2001). Difenacoum resistance in rats is not a consequence of increased metabolism and excretion. In: PELZ HJ, COWAN DP & FEARE CJ (eds), *Advances in Vertebrate Pest Management*, Filander Verlag, Fürth: 193-201.
- BACHMANN KA & SULLIVAN TJ (1983). Dispositional and pharmacodynamic characteristics of brodifacoum in warfarin-sensitive rats. *Pharmacology* 27: 281-288.
- BRECKENRIDGE AM, CHOLERTON S, HART JA, PARK BK & SCOTT AK (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.
- BOUMA BN (2000). Nieuwe inzichten in de regulatie van bloedstolling en fibrinolyse. *Nederlands Tijdschrift voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde*, 25: 275-278.
- BOYLE CM (1960) Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to anticoagulant poisons. *Nature*, 188: 517.
- BRAKES CR & SMITH RH (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.
- BRUNTON CFA, MACDONALD DW & BUCKLE AP (1993). Behavioural resistance towards poison baits in brown rats, *Rattus norvegicus*. *Applied Animal Behaviour Science*, 38: 159-174.
- BUCKLE AP (1996). Rodent control methods: chemical. In: BUCKLE AP & SMITH RH (eds), *Rodent Pests and Their Control*, CAB International, Wallingford: 127-160.
- BUCKLE AP (2006). The Current status of anticoagulant resistance in rodents, resistance monitoring and management strategies. *Forum for Sustainable Management of Disease Vectors*. Beijing 21-23 April 2006.
- BUCKLE AP, KLEMMANN N & PRESCOTT CV (2012). Brodifacoum is effective against Norway rats (*Rattus norvegicus*) in a tyrosine139cysteine focus of anticoagulant resistance in Westphalia, Germany. *Pest Management Science*, 68:1579-1585.
- Buckle AP (2013). Anticoagulant resistance in the United Kingdom and a new guideline for the management of resistant infestations of Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.) *Pest Management Science*, 69: 334-41.
- CHU PH, HUANG TY, WILLIAMS J, & STAFFORD DW (2006). Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH<sub>2</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 19308-19313.
- CHOU LS, GEDGE F & LYON E (2005). Complete Gene Scanning by Temperature Gradient Capillary Electrophoresis Using the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene as a Model. *Journal of Molecular Diagnostic*, 7: 111-120.
- COWAN DP & TOWNSEND MG (1996). Field evaluation of rodenticides. In: BUCKLE AP & SMITH RH (eds), *Rodent Pests and Their Control*, CAB International, Wallingford: 181-196.
- DAMON M, ZHANG NZ, HAYTOWITZ DB & BOOTH SL (2005). Phylloquinone (vitamin K<sub>1</sub>) content of vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 751-758.

- DOHOO I, MARTIN W & STRYHN H (2003). Veterinary epidemiologic research. AVC Inc. Charlottetown.
- EEA (2007). Halting the loss of biodiversity by 2010: proposal for a first set of indicators to monitor progress in Europe. Technical Report 11/2007. European Environment Agency.
- Elmeros M, CHRISTENSEN TK & LASSEN P (2011). Concentrations of anticoagulant rodenticides in stoats *Mustela erminea* and weasels *Mustela nivalis* from Denmark. Science of The Total Environment, 409: 2373-2378.
- EPPO (1995). Guideline for the Evaluation of Resistance to Plant Protection Products: Testing rodents for resistance to anticoagulant rodenticides. EPPO Bulletin, 25: 575-593.
- ERVYNCK A, MEILLANDER V & VAN DE WALLE R (1991) Ratman: een verhaal van mensen en ratten. Museum voor Volkskunde, Gent.
- FRANTZ SC & PADULA CM (1998). Warfarin resistance revisited. In: BAKER RO & CRABB AC (eds), Proceedings Eighteenth Vertebrate Pest Conference, Costa Mesa, California: 276-280.
- GILL JE & MACNICOLL AD (1991). Determination of the susceptibility of wild populations of the Norway rat (*Rattus norvegicus*) to the anticoagulant rodenticide brodifacoum. Zeitschrift für angewandte Zoologie 78: 101-117.
- GILL JE, KERINS GM & MACNICOLL AD (1992). Inheritance of low grade brodifacoum resistance in the Norway rat. Journal of Wildlife Management, 56: 809-816.
- GILL JE, KERINS GM, LANGTON SD & MACNICOLL AD (1993). The development of a blood clotting response test for discriminating between difenacoum-resistant and susceptible Norway rats (*Rattus norvegicus*, Berk.). Comparative Biochemistry and Physiology, 104C: 29-36.
- GILL JE, KERINS GM, LANGTON SD & MACNICOLL AD (1994). Blood-clotting response test for bromadiolone resistance in Norway rats. Journal of Wildlife Management, 58: 454-461.
- GRANDEMANGE A, MICHAEL HK, LASSEUR R, LONGIN-SAUVAGEON C, BERNY P & BENOIT E (2009). Consequences of the Y139F Vkorc1 mutation on resistance to AVKs: in-vivo investigation in a 7th generation of congenic Y139F strain of rats. Pharmacogenetics and Genomics, 19: 742-750.
- GRANDEMANGE A, LASSEUR R, LONGIN-SAUVAGEON C, BENOIT E & BERNY P (2010). Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. Pest Management Science, 66: 270-276.
- GREAVES JH & AYRES PB (1973). Warfarin resistance and vitamin K requirements in the rat. Laboratory Animals, 7: 141-148.
- GREAVES JH & AYRES PB (1985). Fuzzy: a genetic marker for warfarin resistance in the Norway rat. Laboratory Animals, 19: 145-147.
- GREAVES JH (1996). Resistance to anticoagulant rodenticides. In: BUCKLE AP & SMITH RH (eds), Rodent Pests and Their Control, CAB International, Wallingford: 127-160.
- GRATZ N (2006). Vector- and Rodent-borne Diseases in Europe and North America. Cambridge University Press, New York.
- HERMODSON MA, SUTTIE JW & LINK KP (1969). Warfarin metabolism and vitamin K requirement in the warfarin-resistant rat. American journal of physiology, 217: 1316-1319.
- HILL MJ (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. European Journal of Cancer Prevention, 6:S43-S45.

HEIBERG AC (2009). Anticoagulant resistance: a relevant issue in sewer rat (*Rattus norvegicus*) control? Pest Management Science, 65:444-449.

HEYMAN P, BAERT K, PLYUSNINA A, COCHEZ C, LUNDKVIST A, ESBROECK M, GOOSSENS E, VANDENVELDE C, PLYUSNIN A & STUYCK J (2009). Serological and genetic evidence for the presence of Seoul hantavirus in *Rattus norvegicus* in Flanders, Belgium. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 41: 51-56.

HOARE JM & HARE KM (2006). The impact of brodifacoum on non-target wildlife: gaps in knowledge. New Zealand Journal of Ecology, 30: 157-167.

JACOB J, ENDEPOL S, PELZ HJ, KAMPLING E, COOPER TG, YEUNG CH, REDMANN K & SCHLATT S (2012). Vitamin K requirement and reproduction in bromadiolone-resistant Norway rats. Pest management science, 68:378-385.

KERINS GM & MACNICOLL AD (1999). Comparison of the half-lives and regeneration rates of blood clotting factors II, VII, and X in anticoagulant-resistant and susceptible Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 122: 307-316.

KERINS GM, DENNIS N, ATTERBY H, GILL JE & MACNICOLL AD (2001). Distribution of resistance to anticoagulant rodenticides in the Norway rat (*Rattus norvegicus* Berk.) in England 1995-98. In: PELZ HJ, COWAN DP & FEARE CJ (eds), Advances in Vertebrate Pest Management, Filander Verlag, Fürth: 149-160.

LAST JA (2002). The Missing Link: The Story of Karl Paul Link. Toxicological Sciences, 66: 4-6.

LECHEVIN JC (1988). Activity of Im 2219 (difethialone), a new anticoagulant rodenticide, in commensal rodents. Proceedings Vertebrate Pest Conference, 13: 59-63.

LI T, CHANG CY, JIN DY, LIN PJ, KHVOROVA A AND STAFFORD DW (2004). Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. Nature, 427:541-544.

LODAL J (2001). Distribution and levels of anticoagulant resistance in rats (*Rattus norvegicus*) in Denmark. In: PELZ HJ, COWAN DP & FEARE CJ (eds), Advances in Vertebrate Pest Management, Filander Verlag, Fürth: 139-148.

LUND M (1984). Resistance to the second-generation anticoagulant rodenticides. Proceedings Vertebrate Pest Conference, 11: 89-94.

MACNICOLL AD & GILL JE (1987). The occurrence and significance of rodenticide resistance in the UK. In: British Crop Protection Council Monograph No. 37, British Crop Protection Council, Thornton Heath: 85-95.

MACNICOLL AD & GILL JE (1993). Vitamin K3 in feedstuffs - antidotal effects in captive anticoagulant-resistant rats and mice. Journal of Wildlife Management, 57: 835-841.

MACNICOLL AD & GILL JE (1993a). Revised methodology for a blood clotting response test for identification of warfarin-resistant Norway rats (*Rattus norvegicus*). EPPO Bulletin, 23: 701-707.

MARKUSSEN MD, HEIBERG A-C, FREDHOLM M & KRISTENSEN M (2008). Differential expression of cytochrome P450 genes between bromadiolone-resistant and anticoagulant-susceptible Norway rats: a possible role for pharmacokinetics in bromadiolone resistance. Pest Management Science, 64: 239-248.

MARTIN AD, STEED LC, REDFERN R, GILL JE & HUSON LW (1979). Warfarin-resistance genotype determination in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. Laboratory Animals, 13: 209-214.

MEEHAN AP (1984). Rats and mice. Their biology and control. Rentokil limited, East Grinstead.

OLDENBURG J, MARINOVA M, MÜLLER-REIBLE C & WATZKA M (2008). The vitamin K cycle. *Vitamins and Hormones*, 78: 35-62.

PELZ HJ, HÄNISCH D & LAUENSTEIN G (1995). Resistance to anticoagulant rodenticides in Germany and future strategies to control *Rattus norvegicus*. *Pesticide Science*, 43:61-67.

PELZ HJ (2001). Extensive distribution and high frequency of resistance to anticoagulant rodenticides in rat populations from northwestern Germany. In: PELZ HJ, COWAN DP & FEARE CJ (eds), *Advances in Vertebrate Pest Management*, Filander Verlag, Fürth: 161-170

PELZ HJ, ROST S, HUNERBERG M, FREGIN A, HEIBERG AC, BAERT K, MACNICOLL AD, PRESCOTT CV, WALKER AS, OLDENBURG J & MULLER CR (2005). The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*, 170: 1839-1847.

PELZ HJ, ROST S & MULLER CR (2007). DNA-based field monitoring of warfarin resistance in rats (*Rattus norvegicus*). *International Journal of Pest Management*, 53: 281-284.

PRESCOTT CV & BUCKLE AP (2000). Blood-clotting response tests for resistance to diphacinone and chlorophacinone in the Norway Rat (*Rattus norvegicus* Berk.). *Crop Protection*, 19: 291-296.

PRESCOTT CV, BUCKLE AP, HUSSAIN I & ENDEPOLS S (2007). A standardised BCR resistance test for all anticoagulant rodenticides. *International Journal of Pest Management*, 53: 265-272.

PRESCOTT CV, BUCKLE AP, GIBBINGS JG, ALLANA NW & STUART AM (2011) Anticoagulant resistance in Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.) in Kent - a VKORC1 single nucleotide polymorphism, tyrosine139phenylalanine, new to the UK. *International Journal of Pest Management*, 57: 61-65.

ROST S, FREGIN A, IVASKEVICIUS V, CONZELMANNE, HORTNAGEL K, PELZ HJ, LAPPEGARD K, SEIFRIED E, SCHARRE I, TUDDENHAM EG, MULLER CR, STROM TM & OLDENBURG J (2004). Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, 427: 537-541.

ROST S, PELZ HJ, MENZEL S, MACNICOLL A, LEON V, SONG KJ, JAKEL T, OLDENBURG J & MULLER C (2009). Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice - a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genetics*, 10:4.

SMITH P, TOWNSEND MG & SMITH RH (1991). A cost of resistance in the brown rat? Reduced growth rate in warfarin-resistant lines. *Functional Ecology*, 5: 441-447.

SMITH P, BERDOY M, SMITH RH & MACDONALD DW (1993). A new aspect of warfarin resistance in wild rats - benefits in the absence of poison. *Functional Ecology*, 7: 190-194.

STUYCK J (2003). Bruine rat. In: VERKEM S, DE MAESENEER J, VANDENDRIESSCHE B, VERBEYLEN G & YSKOUT S (eds), *Zoogdieren in Vlaanderen. Ecologie en verspreiding van 1987 tot 2002*, Natuurpunt Studie & JNM-Zoogdierenwerkgroep, Mechelen & Gent: 211-215.

THIJSEN HHW, JANSSEN CA & MOSTERD JJ (1989). Warfarin resistance: Biochemical evaluation of a warfarin-resistant wild brown rat. *Biochemical pharmacology*, 38: 3129-3132.

THIJSEN HHW (1995). Warfarin-based rodenticides: mode of action and mechanism of resistance. *Pesticide Science*, 43: 73-78.

TIE JK, NICCHITTA C, VON HEIJNE G & STAFFORD DW (2005). Membrane Topology Mapping of Vitamin K Epoxide Reductase by *in Vitro* Translation/Cotranslocation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 16410-16416.

VAN DER LEE TAJ, VAN HOOF RA, BROUWER G & MEERBURG BG (2011). Ontwikkeling en toepassing van een snelle diagnostische test voor resistentie van de bruine rat tegen rodenticiden. Wageningen UR Livestock Research, rapport 510.

VON DEM BORNE PA (1996). The role of factor XI in blood coagulation and fibrinolysis. Proefschrift, Universiteit Utrecht, Nederland.

WALLIN R, HUTSON SM, CAIN D, SWEATT A & SANE DC (2001). A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 15:2542–2544.

Yacobi A, Lai CM & Levy G (1984). Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of acute interaction between warfarin enantiomers and chloramphenicol in rats. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 231: 80-84.

YE S, DHILLON S, KE X, COLLINS AR & DAY INM (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Research, 29: e88.

YIN T & MIYATA T (2007). Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1 Rationale and perspectives. Thrombosis Research, 120: 1–10.