

Rapportage landelijk beeld resistentie tegen rodenticiden bij bruine ratten en huismuizen

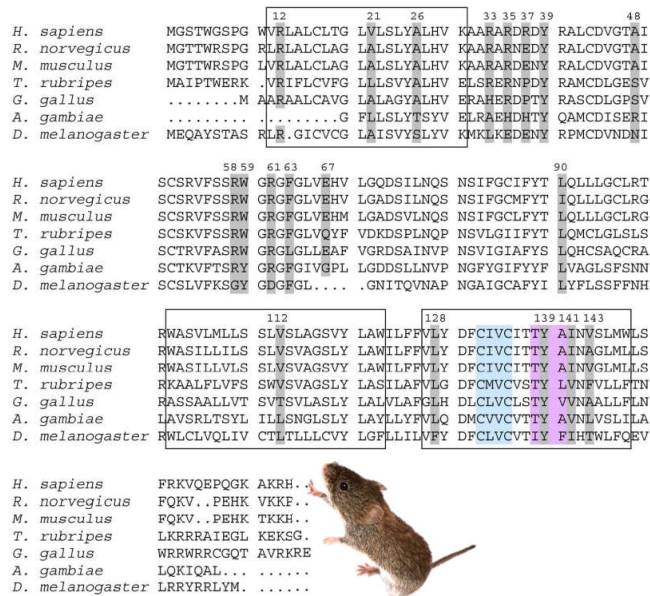


Figure 3
Alignment of VKORC1 proteins of different species. Amino acid substitutions which could be detected in the examined rats and mice are highlighted by grey shading.

Opdrachtgever

Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat

Uitgevoerd door

I.M. Krijger¹, M. Strating¹, M.P.E. Pelzer-Van Gent²,
T.A.J. van der Lee² en B.G. Meerburg^{1,2}

Opdrachtnemer(s)

¹ Stichting Kennis- en Adviescentrum Dierplagen (KAD)
Nudepark 145
6702 DZ Wageningen

² Wageningen University & Research (WUR)
Droevendaalsesteeg 1
6708 PB Wageningen

Datum rapportage

30 maart 2022

Voorwoord

Het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat heeft het Kennis- en Adviescentrum Dierplagen (KAD) gevraagd om een onderzoek op te zetten, om een beter landelijk beeld te verkrijgen van de resistentiesituatie in Nederland. Wegens het belang van dit thema is in 2012 een eerder onderzoek naar resistentie van de bruine rat in Nederland uitgevoerd in opdracht van de overheid. Zowel uit de praktijk als uit de literatuur blijkt dat er sindsdien ontwikkelingen zijn geweest op het gebied van resistentie. Daarom was een nieuwe analyse hiervan wenselijk. De resultaten van het onderzoek naar de huidige stand van zaken zijn te vinden in dit rapport.

Opdracht is verleend door het Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat. Wij danken de betrokken beleidsmedewerkers voor hun geïnteresseerde en constructieve houding tijdens het onderzoek. Ook gaat een woord van dank naar alle deelnemende plaagdierbeheersers en anderen die ons monsters hebben aangeleverd.

De auteurs,
Wageningen, maart 2022

Samenvatting

Dit rapport beschrijft een landelijk en kwantitatief onderzoek naar resistentie bij ratten en huismuizen tegen rodenticiden op basis van anticoagulanten. Deze middelen worden gebruikt bij de bestrijding van ratten en muizen en resistentie tegen deze biociden is een groot probleem. Samen met professionele plaagdierbeheersers zijn tussen september en december 2021 in totaal 2318 knaagdiermonsters verzameld, afkomstig uit 218 verschillende driecijferige postcodegebieden. De samenstelling van de knaagdiermonsters bestond uit 1553 bruine ratten, 397 huismuizen, 286 andere muizensoorten en 82 zwarte ratten. Hiermee kan, met name voor bruine ratten en huismuizen, een goede inschatting worden gemaakt van de actuele landelijke situatie met betrekking tot resistentie tegen rodenticiden. Een groot deel van de mogelijke vormen van genetische resistentie vindt zijn oorsprong in mutaties in het *Vkorc1*-gen, een gen dat codeert voor het eiwit waarop anticoagulanten aangrijpen. Met name mutaties die zorgen voor een verandering van aminozuur 139 leiden tot resistentie. Bij de test op *Vkorc1*-mutaties op aminozuur 139 werd bij 62% van de huismuizen geen resistentie waargenomen (n=246) en bij 151 dieren werd wel resistentie waargenomen (38%). Bij de bruine rat gaven 1476 van de 1553 monsters een signaal in de resistentietest (95%) met daarbij een verdeling van 83% niet-resistente en 17% resistente dieren (n=1476). De zwarte rat-monsters zijn niet meegenomen in de analyse omdat met moleculaire tests voor soortidentificatie niet met zekerheid vastgesteld kon worden dat het ook daadwerkelijk zwarte ratten waren.

In vergelijking met een eerder resistentieonderzoek bij de bruine rat (2012/2013) is het percentage resistente dieren lager, maar het ligt wel in dezelfde range: in 2012 was 25% van de bruine ratten resistent. Ook nu werd de resistentie voor een groot deel gevonden in regio's waar eerder ook resistentie werd aangetroffen, al blijkt uit het huidige onderzoek dat resistentie in meer regio's van Nederland is waargenomen dan in 2012. Dit kan komen doordat de resistente bruine ratten zich verder over Nederland hebben verspreid, of (mede) doordat er een groter aantal bruine ratten is onderzocht, verspreid over meer regio's dan in 2012. De 17% resistente dieren is een gemiddelde voor heel Nederland en er zijn duidelijke regionale verschillen. In sommige regio's werden bijvoorbeeld alleen resistente ratten gevonden. Hoewel in de studie van 2012 de aantallen beperkt waren en de bemonstering geografisch gezien minder gebalanceerd was, laat de vergelijking van resultaten wellicht een trend zien van verminderde rodenticidenresistentie bij bruine ratten. Deze positieve trend kan voortkomen uit het bewuster en restrictiever gebruik van rodenticiden dat de sector in gang heeft gezet sinds de vorige monitoring.

Een aanbeveling van deze studie is om de monitoring met enige regelmaat uit te voeren, waarbij deze studie met oor en staart monsters kan dienen als betrouwbare baseline voor rodenticidenresistentie bij de bruine rat. Voor de huismuis zijn de huidige gegevens niet te vergelijken met eerdere studies omdat deze voor Nederland ontbreken. Het gevonden percentage resistentie bij de huismuizen was duidelijk hoger dan bij bruine ratten. Het advies is om ook voor huismuis de monitoring voort te zetten. Ook voor muizen geldt dat een IPM-benadering (bewuster en restrictiever gebruik van rodenticiden) de ontwikkeling van resistentie kan verminderen.

Er is ook een enquête gehouden onder 91 professionele plaagdierbeheersers. Bijna een kwart van hen gaf aan zonder rodenticiden te werken. Indien er wel rodenticiden worden gebruikt, kiest men het vaakst middelen die (onder andere) bromadiolon als werkzame stof hebben. Voor bruine ratten met één van de mutatie-soorten die vooral in Frankrijk voorkomt (tyr-phe) is in de literatuur te vinden dat deze dieren niet meer gevoelig zijn voor cumatetralyl en bromadiolon, maar nog wel gevoelig zijn voor difenacum, brodifacum, flocumafen en difethialon. Voor de huismuis is er voor diverse mutaties bekend welke werkzame stoffen wel of niet meer effectief zijn. Helaas wordt alleen één van de in dit onderzoek aangetoonde mutaties (tyr-cys) beschreven: huismuizen met een tyr-cys-mutatie zijn niet meer gevoelig voor bromadiolon, in sommige gevallen nog wel gevoelig voor difethialon, en nog wel gevoelig voor brodifacoum, flocumafen, en difethialon.

Summary

In this report the results of the national study into rodenticide resistance in house mice and rats in the Netherlands are described. Between September and December 2021 a total of 2318 rodents were collected with the help of professional pest managers from all over the country. A total of 218 different postal code areas was sampled. This sample size provides a good and realistic overview of the current situation. There were 397 house mice (*Mus musculus*) collected (and 286 mice from different species), 1553 brown rats (*Rattus norvegicus*), and 82 black rats (*Rattus rattus*). For the house mouse the test on *Vkorc1* mutations at amino acid 139 resulted in 246 wild-type (62%), and 151 mice showed resistant (38%). For the brown rat 1476 of the 1553 samples gave a reaction. Of those 1476 rats, 1224 tested wild-type (83%) and 252 rats showed resistant (17%).

In comparison to the study in 2012/2013, the percentage of resistant brown rats is lower (25% in 2012), but lies within the same range. Although the sample size and geographic spread of the rats tested in the previous study was somewhat limited, the new numbers could indicate a positive trend which might be due to more restricted and conscious use of rodenticides. Rodenticide resistance was found in a large part of the same regions as in the previous study, but also a few 'new' regions. This could be due to the fact that resistant rodents have spread, or/also because there were more samples collected with a larger geographic spread than in the earlier study. However, the 17% resistant brown rats is an average for the Netherlands, with clear differences between regions. Despite the fact that the numbers of 2012 were lower with a less balanced geographic sampling, comparison of the results could indicate a positive trend of a decrease in rodenticide resistance in rats. Results of the house mouse are not comparable to previous studies as there are none. Nonetheless the number of rodenticide resistant mice in the Netherlands seems higher than for the rats. It is recommended to continue the monitoring, also for the house mouse. This way, the effect of the IPM approach with less rodenticide use and when used, with more conscious application, can be seen in a hopefully reduced development of rodenticide resistance.

There was also held a survey amongst 91 professional rodent managers. Over 24% of them states to work without rodenticides. In case of rodenticide use, products with bromadiolone as effective compound are used most often. In the literature it is shown that brown rats with a heterozygous mutation prevailing in France (tyr-phe) are insensitive to coumatetralyl and bromadiolone, but still sensitive to difenacoum, brodifacoum, flocoumafen, and difethialone. For the house mouse it is for several mutations known what compounds are still effective or not. However, only one of the found mutations from this study (tyr-cys) is in that list. This means that house mice with a tyr-cys mutation are no longer susceptible to bromadiolone, and in some cases sensitive to difethialone. House mice with this mutation are still sensitive to brodifacoum, flocoumafen, and difethialone.

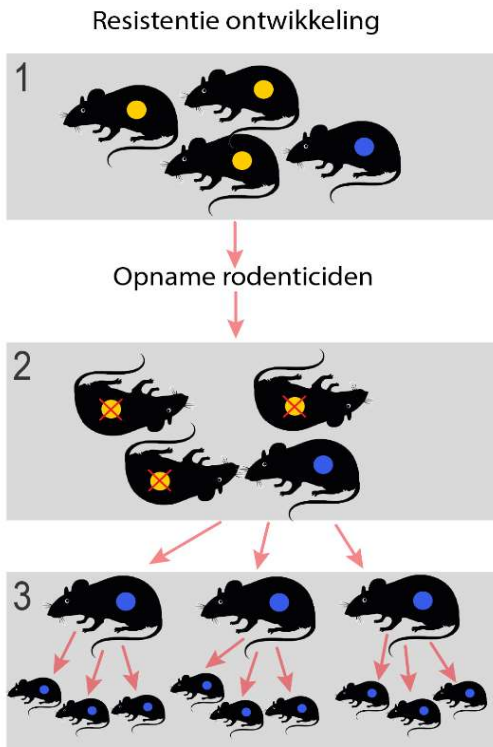
INHOUDSOPGAVE

1. Inleiding.....	1
1.1. Onderzoek 2012/2013	3
1.2. Doelstellingen.....	3
1.3. Ontwikkelingen rondom resistentie tegen anticoagulanten sinds 2012	4
1.4. Effectiviteit werkzame stoffen	10
1.5. Effect resistentie op gezondheid rat	11
1.6. Toekomst resistentie.....	11
2. Materialen en Methoden.....	13
2.1. Verzameling monsters.....	13
2.2. Extractie van DNA.....	15
2.3. TaqMan toets	15
2.4. Amplicon sequencing.	16
2.5. Enquête	16
3. Resultaten	17
3.1. Aantal monsters	17
3.2. Soorts-identificatie	20
3.3. Resistentie.....	21
3.3.1 Resistentie huismuis	22
3.3.2. Resistentie bruine rat.....	25
3.4. Additionele mutaties in het <i>Vkorc1</i> -gen	30
3.5. Enquête uitkomsten.....	30
4. Conclusies	33
5. Discussie.....	35
Referenties	37
Bijlage 1.....	39
Bijlage 2.....	42
Bijlage 3.....	46
Bijlage 4.....	50

1. Inleiding

Plaagdieren zoals ratten en muizen, komen veelvuldig voor in Nederland. Aanwezigheid van muizen en/of ratten kan risico's met zich meebrengen, omdat deze knaagdieren ziekteverwekkers bij zich kunnen dragen en kunnen overbrengen. Tevens kunnen ze knaagschade aanrichten, met alle gevolgen van dien; denk bijvoorbeeld aan knagen aan elektriciteitsdraden. Door middel van plaagdierbeheersing (vroeger: ongediertebestrijding), worden maatregelen getroffen om deze overlast te voorkomen of indien nodig, te verhelpen. In het verleden werd vaak direct gebruik gemaakt van rodenticiden. Rodenticiden zijn biociden ter bestrijding van knaagdieren. Tot begin jaren '50 van de vorige eeuw waren enkel rodenticiden op de markt waarbij na opname van een eenmalige dosis de dood intrad. Doordat muizen en ratten intelligente dieren zijn, ontstond er aasschuwheid. Dit doordat de dieren een link legden tussen vergiftigingsverschijnselen van soortgenoten die van het middel gegeten hadden, en de inname van de rodenticiden. Als reactie op de 'aasschuwheid', is er een ander soort rodenticide ontwikkeld: rodenticiden met een cumulatieve werking (de 1^e en later de 2^e generatie anticoagulantia). Dit zijn rodenticiden die een knaagdier meerdere malen in voldoende mate binnen moet krijgen, binnen 3-18 dagen, om een dodelijk effect te hebben.

Anticoagulantia gaan de stolling van het bloed tegen waardoor er bij de knaagdieren inwendige bloedingen ontstaan. Ook als een rat of muis verzwakt is door rodenticiden, blijven ze van het middel eten waardoor geen aasschuwheid ontstaat. Naast het risico op doorvergiftiging naar niet-doelsoorten (anticoagulantia zijn extreem giftig voor vogels, roofdieren, en huisdieren), is er bij een deel van de ratten- en muizenpopulaties resistentie tegen deze middelen ontstaan. Genetische resistentie kan een oorzaak zijn voor het falen van een chemische bestrijding van een ratten- of muizenpopulatie. Er wordt van genetische resistentie gesproken op het moment dat muizen of ratten wel rodenticiden opnemen, maar er, door een overerfbaar afgenomen gevoeligheid, niet meer van komen te overlijden of pas na langere tijdsduur (Figuur 1).



Figuur 1. Resistentie ontwikkeling. De gevoelige dieren (gele stip) leggen na bestrijding het loodje, de ongevoelige (blauwe stip) krijgen hierop de mogelijkheid om zich verder te ontwikkelen met veel minder concurrentie.

Het optreden van resistentie is in eerste instantie dus een genetisch probleem. DNA bevat informatie over erfelijke eigenschappen van een individu, bijvoorbeeld oog- of haarkleur. Elk gen bestaat uit 2 allelen waarvan 1 allel van elke ouder wordt doorgegeven. Tijdens het doorgeven ontstaan er soms kleine veranderingen; mutaties. Een volwassen individu met een mutatie, kan deze mutatie dan weer doorgeven aan het nageslacht. In het geval van resistentie vindt de mutatie plaats op het gen dat de gevoeligheid voor rodenticiden bepaalt. In dat geval heeft het dier waarbij dat gebeurt een evolutionair voordeel: hij gaat niet dood van het eten van rodenticiden, terwijl soortgenoten die deze mutatie niet hebben, dat wel doen. Op deze manier heeft een resistente muis of rat geen concurrentie meer voor voedsel, drinken, of schuilplaatsen.

Naast het fenomeen genetische resistentie, kennen we overigens ook het fenomeen gewenning. Bij gewenning is er géén genetische verandering opgetreden, maar reageert het betreffende knaagdier door het langdurig toedienen van té kleine hoeveelheden rodenticiden suboptimaal op de toediening. Verkeerd gebruik kan ook hier een oorzaak van zijn.

1.1. Onderzoek 2012/2013

Het laatste onderzoek naar de resistentie van bruine ratten in Nederland is in de periode 2012/2013 uitgevoerd. Door middel van een publieksactie werden in totaal 361 rattenkeutels verkregen. Hiervan waren er 290 bruikbaar en voldeden aan de uiterlijke kenmerken van bruine ratten. Van deze monsters lieten uiteindelijk 121 monsters (41%) geen reactie zien. Dit waren bijvoorbeeld monsters waaruit onvoldoende DNA geïsoleerd kon worden, of monsters die qua uiterlijk wel van bruine ratten zouden kunnen zijn, maar toch van andere diersoorten afkomstig waren. Uiteindelijk bleven er 169 monsters (59%) over waarbij een testuitslag zichtbaar was voor de toets op basis van een mutatie, welke leidt tot resistentie in het *Vkorc1* gen in het codon dat codeert voor aminozuur 139. Van deze monsters waren 131 (75%) afkomstig van niet-resistente ratten (wild-type) en 42 (25%) waren afkomstig van verminderd gevoelige ofwel resistente ratten. Voor het percentage resistentie werd een duidelijk verband gevonden met de geografische locatie, dit percentage is in bepaalde regio's waarschijnlijk veel hoger dan 25%. Homozygoot resistente dieren met de Y139C (tyr-cys) mutatie werden niet alleen aangetroffen in die regio's waarvan al langer bekend is dat er resistentie kan optreden (Twente, Achterhoek), maar ook in de regio Rotterdam en de Noordoostpolder. Ook homozygote resistente dieren met een mutatievorm die voornamelijk in Frankrijk veel voorkomt en daarom bekend staat als de 'Franse' mutatie (Y139P of tyr-phe mutatie) werden op meerdere locaties in het land aangetroffen: in de Gelderse Vallei, Zuidoost Brabant en Noord-Limburg. Daarnaast lijken heterozygoot resistente dieren met zowel de Duitse (Y139C mutatie, veelal voorkomend in Duitsland en Denemarken) als de Franse (Y139P mutatie) mutaties zich verder door Nederland te verspreiden. Transport (o.a. via scheepvaart) werd hierbij als mogelijke oorzaak aangegeven. Naast een rapportage voor het ministerie, zijn de conclusies van dit onderzoek ook beschreven in een wetenschappelijk artikel: "Distribution of anticoagulant rodenticide resistance in *Rattus norvegicus* in the Netherlands according to *Vkorc1* mutations". (Meerburg, van Gent-Pelzer, Schoelitsz, & van der Lee, 2014).

1.2. Doelstellingen

De doelstelling van het huidige onderzoek was om een geactualiseerd landelijk beeld te krijgen van de mate waarin resistentie optreedt bij ratten en muizen tegen rodenticiden op basis van anticoagulanten. De hoofdvraag van dit onderzoek: *In welke mate zijn bruine ratten, zwarte ratten en huismuizen genetisch resistent tegen rodenticiden op basis van anticoagulanten?*

Deelvragen:

- Welke mutaties treden op bij in Nederland gevangen knaagdieren?
- Hoe zit het met de frequenties van de belangrijkste mutaties in het *Vkorc1* gen codon voor aminozuur 139?
- Zijn er specifieke regio's van het land waar meer of minder resistentie optreedt?
- Hoe verschilt de situatie van heden met die van 2012 voor wat betreft bruine ratten?
- Wat is de verwachting voor de resistentieontwikkeling in de nabije toekomst?

1.3. Ontwikkelingen rondom resistentie tegen anticoagulanten sinds 2012

Uit de literatuur blijkt dat er sinds het eigen onderzoek in 2012 heel wat nieuwe studies gedaan zijn naar genetische resistentie in knaagdieren. Er is bekend dat mutaties van één of enkele nucleotiden op het *Vkorc1* gen, leiden tot verschillende mate van resistentie tegen anticoagulanten, en dat deze mutaties veelvoorkomend zijn in verschillende ratten en muizen populaties (Gryseels, Leirs, Makundi, & Goüy de Bellocq, 2015).

Resistentie tegen anticoagulantia wordt veroorzaakt door mutaties op het *Vkorc1* gen, een gen welke betrokken is bij het her- en gebruik van vitamine K in het lijf (Li et al., 2004; Oldenburg et al., 2007; H.-J. Pelz et al., 2005; Wilms, Veldkamp, Van Meegen, & Touw, 2006). Vitamine K is essentieel voor de aanmaak van onder andere de zogenaamde vitamine K-afhankelijke stollingseiwitten. Anticoagulantia zijn gebaseerd op zogenaamde vitamine K antagonisten (tegenpolen) zoals bijvoorbeeld warfarine. Deze werkzame stoffen grijpen aan op de stollingswerking van het VKORC1 enzym, waardoor een dier dat eet van rodenticiden interne bloedingen krijgt. Een ander belangrijk enzym in het metabolisme van vitamine K antagonisten is CYP2C9. In beide enzymen zijn een aantal genetische varianten bekend. Tevens is bekend dat een dier met een homozygote mutatie resistentier is dan een dier met een heterozygote mutatie.

In het huidige onderzoek is gekeken naar het gen wat dominant is en het meest gevonden en beschreven wordt in de gepubliceerde onderzoeken.

In een onderzoek uit 2009 in negen landen (Engeland, Hongarije, de Azoren, Korea, Indonesië, Thailand, Japan, Argentinië, en de Verenigde Staten) zijn ruim 250 ratten en muizen gevangen uit omgevingen waar met rodenticiden gewerkt werd, en getest op resistentie. Hierbij zijn in 178 dieren mutaties gevonden op het *Vkorc1* gen (dus resistent), waarvan 18 nieuwe en vijf reeds bekende mutaties (Rost et al., 2009). Hieronder een beschrijving van de gepubliceerde onderzoeken per diersoort.

Huismuis (*M. musculus*)

Resistentie in huismuizen kan worden gelinkt aan mutaties in het *Vkorc1* gen, maar mogelijk ook veranderingen in het cytochroom P450 dat betrokken is in het ontgiftingssysteem, of via polygenetische interacties zoals al eerder gesuggereerd is voor te komen bij ratten (Ishizuka et al., 2008).



Op het eiland Martinique is in 2019 een onderzoek geweest naar resistentie in 206 ratten en muizen; 129 *Rattus rattus*, 59 *Mus musculus domesticus*, en 18 *Rattus norvegicus*. In 40% van de muizen is resistentie tegen eerste generatie rodenticiden aangetroffen (Y139C mutatie), en in 0,9% van de muizen een dubbele mutatie (A26T/Y139C), deze dubbele mutatie toont resistentie aan tegen tweede generatie rodenticiden (Marquez et al., 2019).

Hybridisatie bij muizen tussen de huismuis (*Mus Musculus domesticus*) en de Algerijnse muis (*Mus spretus*) heeft geleid tot 4 mutaties in het *Vkorc1* gen, wat geresulteerd heeft in sterke resistentie bij huismuizen in Spanje en Duitsland (Hedrick, 2013; Liu et al., 2015; Song et al., 2011).

Uit onderzoek is verder gebleken dat bij huismuizen het gen dat codeert voor enzym CYP2CP9, verantwoordelijk is voor het metaboliseren van anticoagulanten, en variaties van dat gen zorgen ervoor dat rodenticiden in verschillende mate moet worden opgenomen om het gewenste effect te genereren (Gryseels et al., 2015; Zhelev, Koev, Dimitrov, & Petrov, 2019). Volgens Duncan (2021) kunnen ook andere nog niet geïdentificeerde genen een rol spelen bij resistentie tegen bepaalde anticoagulanten. Voedingstesten en bloedklontertesten (BCR) zijn noodzakelijk om te kijken welke invloed er is van bepaalde genetische varianten op de mortaliteit (Duncan, 2021).

Uit onderzoek in Servië kwam naar voren dat muizen die de Y139C mutatie hebben, of drager zijn van een gecombineerde variant (L128S/ Y139C mutatie) resistent zijn tegen bromadiolon, maar nog wel baat hebben bij een korte periode van toediening van brodifacoum (Blažić et al., 2018).

Een Bulgaars onderzoek naar resistentie door middel van bloedstollingstests en lethale dosis tests op 67 huismuizen, resulteerde in de ontdekking van 100% resistentie tegen warfarine, en 23,1% van de muizen testte resistent tegen bromadiolon (Zhelev et al., 2019). In huismuizen uit Ierland zijn twee mutaties aangetroffen (L128S en Y139C) bij maar liefst 84% van de 50 geteste muizen (Mooney et al., 2018). Ook in Duitsland en Zwitserland zijn huismuizen resistent gebleken: in een onderzoek in Duitse en Zwitserse populaties huismuizen zijn de L128S en Y139C en een groep van gekoppelde substituties (R12W/A26S/A48Y/A61L) de meest voorkomende mutaties en zijn geassocieerd met verminderde gevoeligheid tegen anticoagulanten (H. J. Pelz et al., 2012).

Recent zijn in Finland 48 huismuizen en 48 bruine ratten onderzocht vanuit zowel agrarische gebieden als de steden Helsinki, Turku en Pori.

Van de huismuizen had 65% een VKORC1 polymorfisme. Het grootste deel (27 van de 31) had een Y139C polymorfisme, waarvan 16 heterozygoot en acht homozygoot. Drie individuen hadden de L128S polymorfisme (1 heterozygoot, 2 homozygoot). Bovendien werd een individu heterozygoot getest voor zowel Y139C als L128S (Koivisto et al., 2021). L128S betekent resistentie tegen de eerste én tweede generatie anticoagulantia (bromadiolon, difethialon en brodifacoum). Y139C betekent resistentie tegen eerste generatie anticoagulantia en twee van de tweede generatie anticoagulantia (bromadiolon en difenacoum). Hoewel het hier om kleine aantallen gaat is het toch opvallend dat de prevalentie varieerde tussen 25% en 100%, waarbij muizen met de Y139C op alle locaties werden aangetroffen, terwijl de L128S mutaties maar op één plek werden gevonden (Koivisto et al., 2021).

Een review uit 2020 heeft alle tot dan toe gepubliceerde artikelen bekeken en samengevat, onder andere welke mutaties bekend zijn bij huismuizen (Tabel 1) (McGee, McGilloway, & Buckle, 2020).

Tabel 1. Lijst met bekende SNP-mutaties in het *Vkorc1* gen bij de huismuis (*Mus musculus*) en hun geografische locatie. FGAR: eerste generatie anticoagulantia, SGAR: tweede generatie anticoagulantia. Overgenomen van McGee et al. 2020.

SNP	FGAR	SGAR	Locatie
A1W			Frankrijk, Duitsland
A21T		Bromadiolon	Servië
A26S			Frankrijk
A26T		Bromadiolon; Difenacoum	Frankrijk
R35P			VS
E37G			Frankrijk
A48Y			Frankrijk
R58G			Frankrijk
W59G	Warfarine		Frankrijk, Duitsland
R61L			Frankrijk
L124M			Frankrijk
L128S	Warfarine; Coumetetralyl; Chlorophacinon	Bromadiolon; Difenacoum; Brodifacoum	Azoren, Frankrijk, Duitsland, Ierland, Servië, Zwitserland, VK
Y139C	Warfarine; Coumetetralyl; Chlorophacinon		Azoren, Frankrijk, Duitsland, Ierland, Servië, Zwitserland, VK
R12W, A26S, A48T, R61L	Coumetetralyl; Chlorophacinon	Bromadiolon; Difenacoum	Frankrijk, Duitsland, Spanje, Zwitserland
A26T/L128S	Coumetetralyl; Chlorophacinon	Brodifacoum; Bromadiolon; Difenacoum; Diethialon	Frankrijk
Ala26Ser/Leu128S	Coumetetralyl; Chlorophacinon	Brodifacoum; Bromadiolon; Difenacoum; Diethialon	Frankrijk
W59G/L124M			Frankrijk
W59G/L128S			Frankrijk
L128S/Y139C		Bromadiolon	Servië

Bruine rat (*R. norvegicus*)

Van de 48 bruine ratten uit het onderzoek in Finland, werden slechts twee individuen positief getest op een *Vkorc1* gen polymorfisme en beiden waren van een zeldzaam type (R33P). Deze zorgt waarschijnlijk voor resistentie tegen warfarine (Koivisto et al., 2021).



In Engeland is aangetoond dat er resistentie in bruine ratten met een SNP op L120Q (SNP = Single Nucleotide Polymorphism: een verwisseling op een enkele plaats in het DNA van een individu) is tegen alle eerste generatie, en tegen twee tweede generatie (bromadiolon en difenacoum) rodenticiden (A. P. Buckle, Jones, Rymer, Coan, & Prescott, 2020). Slechts één van de 107 geteste ratten was gevoelig voor de rodenticiden en 86.9% was homozygoot resistent.

Uit ander Brits onderzoek waarbij 184 bruine rattenmonsters uit 15 graafschappen in de UK werden onderzocht, is gebleken dat er een relatief lage uitwisseling van genetisch materiaal tussen twee verschillende (naburige) populaties bestaat (Haniza et al., 2015). Er werden in totaal op twee locaties in het *Vkorc1* gen varianten aangetroffen in 17 individuen (Y139C +L120Q, n=12; Y139C+Y139S, n=4 en L120Q +Y139S, n=1), en in één individu werden zelfs drie varianten aangetroffen (Y139C /Y139S+ L120Q). Uit het microsatelliet DNA (korte stukjes niet coderend DNA) was af te leiden dat er een populatiestructuur was gebaseerd op geografische herkomst, dit was in het maternaal overgedragen mitochondrieel DNA niet terug te vinden.

In Ierland (Mooney et al., 2018) werd geen indicatie gevonden van resistentie bij onderzoek van 65 monsters van bruine ratten vanuit het oosten van het eiland.

In een Franse studie in bruine ratten in Hauts de Seine, werden 86 ratten onderzocht op mutaties en aanwezigheid van rodenticiden. Er werd een hoge prevalentie gevonden van de Y139F mutatie (55.8%) en in bijna de helft van de ratten (48%) waren residuen van rodenticiden aanwezig (Desvars-Larrive et al., 2017).

In een studie in Bulgarije zijn 58 bruine ratten gevangen op boerderijen waar minstens zes maanden geen rodenticiden waren ingezet. Op basis van lethale dosis en bloedklontertests werd geen resistentie gevonden (Zhelev et al., 2019).

Een review uit 2020 heeft alle tot dan toe gepubliceerde artikelen bekeken en samengevat, onder andere welke mutaties bekend zijn bij ratten (Tabel 2) (McGee et al., 2020).

Tabel 2. Lijst met bekende SNP-mutaties in het *Vkorc1* gen bij de bruine rat (*Rattus norvegicus*) en hun geografische locatie. FGAR: eerste generatie anticoagulantia, SGAR: tweede generatie anticoagulantia. Overgenomen van McGee et al. 2020.

SNP	FGAR	SGAR	Locatie
V12L			Azoren
A21T			Korea
A26T			Engeland
R33P			Engeland
R35P			Frankrijk, VS
Y39N			Engeland
S56P			Duitsland
W59R			Argentinië
F63C			Engeland
E67K			Japan
I90L			Argentinië, Azoren, Indonesië, VS, Frankrijk, Nederland, Engeland
L120Q	Chlorophacinon, Warfarine	Bromadiolon, Difenacoum	Italië
I123S			Frankrijk, Engeland
L128S			Frankrijk
Y139C	Chlorophacinon, Coumatetracyl, Warfarine	Bromadiolon, Difenacoum	Denemarken, Frankrijk, Duitsland, Hongarije, Nederland, Engeland
Y139S	Chlorophacinon, Coumatetracyl, Warfarine		Engeland
Y139F	Chlorophacinon, Coumatetracyl, Warfarine	Bromadiolon, Difenacoum	België, Frankrijk, Korea, Nederland, Engeland
I141V			Indonesië
A142V			Indonesië, Thailand

Zwarte rat (*R. rattus*)

In Spanje is er in 2015 een mutatie in het *Vkorc1* gen (op Y25F) in zwarte ratten (n=10) aangetoond, wat leidt tot resistentie tegen onder andere bromadiolon (Goulois et al., 2016). Deze mutatie was vóór 2015 nog niet eerder aangetoond in de zwarte rat, bruine rat en ook niet in de huismuis.



In 2012 is er een studie gedaan in 275 zwarte ratten uit Japan waarbij negen verschillende mutaties op het *Vkorc1* gen werden aangetroffen, waarvan er 4 tot resistentie tegen warfarine leiden (Tanaka et al., 2012). In een latere studie in Japan is ook resistentie gedetecteerd door mutaties in het *Vkorc1* gen van zwarte ratten (A41V, A41Y, R61W en L76P). Een andere optie die Takeda *et al.* (2016) noemen, is de betrokkenheid van cytochroom P450. Indien dit cytochroom op een bepaalde manier functioneert als gevolg van de mutatie, wordt warfarine sneller afgebroken door het lichaam.

Een review uit 2020 heeft alle tot dan toe gepubliceerde artikelen bekeken en samengevat, onder andere welke mutaties bekend zijn bij de zwarte rat (Tabel 3, (McGee et al., 2020).

Tabel 3. Lijst met bekende SNP-mutaties in het *Vkorc1* gen bij de zwarte rat (*Rattus rattus*) en hun geografische locatie. FGAR: eerste generatie anticoagulantia, SGAR: tweede generatie anticoagulantia. Overgenomen van McGee *et al.* 2020.

SNP	FGAR	SGAR	Locatie
A14V			Nieuw-Zeeland
Y25F		Bromadiolon, Difenacoum, Difethialon	Spanje, Nieuw-Zeeland
A26V			Nieuw-Zeeland
A41T	Warfarine		Japan
A41V	Warfarine		Japan
R61W	Warfarine		Japan
L76P	Warfarine		Japan
I90L			Nieuw-Zeeland

In 2019 zijn er bij de zwarte rat (n=129), de meest voorkomende rattensoort op het eiland Martinique, drie nieuwe *Vkorc1* mutaties gevonden: H68N, A115T en S149N.

Dit zijn mutaties welke geassocieerd worden met matige resistentie tegen eerste generatie rodenticiden (Marquez et al., 2019).

Een recent Frans onderzoek laat zien dat 151 van 219 geteste zwarte ratten een mutatie heeft op het *Vkorc1* gen, met wel negen verschillende genotypen, te weten: Y25F, A26P, R40G, S57F, W59C, W59R, H68N, Y25F/K152T and Y25F/W59R (Damin-Pernik et al., 2022). Dit biedt inzichten en aanvullingen op bovenstaande tabel.

1.4. Effectiviteit werkzame stoffen

In geval van resistentie, kunnen werkzame stoffen zoals bromadiolon (het enige toegestane middel voor buitengebruik in Nederland tot juni 2014) en difenacoum hun effectiviteit dus (gedeeltelijk) verliezen. Een Duits onderzoek uit 2013 heeft aangetoond dat bruine ratten uit Duitsland met de tyr-cys mutatie duidelijk resistent waren voor difenacoum (A. Buckle, Endepols, Klemann, & Jacob, 2013). Dit betekent dat difenacoum geen geschikt middel meer is om in die bruine rat populatie te gebruiken. Een andere studie uit Duitsland toonde aan dat gebruik van een middel met 0.005% brodifacoum wel effectief was bij heterozygoot bruine ratten (tyr-cys).

Een overzicht van de huidige status van de efficiëntie van werkzame stoffen voor de huismuis is te vinden in Tabel 4, en voor de bruine rat in Tabel 5.

Tabel 4. Overzicht effectiviteit van de verschillende werkzame stoffen ingedeeld per mutatietype voor de huismuis (*Mus musculus*). De tabel is gedeeltelijk gebaseerd op het werk van de Rodenticide Resistentie Actie Groep. Toelichting tekens: - = werkzame stof heeft zijn effectiviteit verloren voor dit type mutatie; +/- = werkzame stof kan effectief zijn, maar wordt niet aanbevolen om in te zetten als pest control; + = werkzame stof wordt verwacht nog effectief te zijn voor deze mutatie, ? = effectiviteit onbekend).

Werkzame stof	Mutatie				Toegelaten op Nederlandse markt?	Verminderde gevoeligheid aangetoond in Nederland
	Y139C (tyr-cys)	Y139S (tyr-ser)	L120Q	L128S		
Warfarine	-	?	?	-	Nee	Ja
Difenacoum	+/-	?	?	+	Ja	Ja
Bromadiolon	-	?	?	-	Ja	Ja
Brodifacoum	+	+	+	+	Ja	Nee
Flocumafen	+	+	+	+	Ja	Nee
Difethialon	+	+	+	+	Ja	Nee

Tabel 5. Overzicht effectiviteit van de verschillende werkzame stoffen ingedeeld per mutatietype voor de bruine rat (*Rattus norvegicus*). De tabel is gedeeltelijk gebaseerd op het werk van de Rodenticide Resistentie Actie Groep en op het artikel van Meerburg et al 2013. Toelichting tekens: - = werkzame stof heeft zijn effectiviteit verloren voor dit type mutatie; +/- = werkzame stof kan effectief zijn, maar wordt niet aanbevolen om in te zetten als pest control; + = werkzame stof wordt verwacht nog effectief te zijn voor deze mutatie).

Werkzame stof	Mutatie					Toegelaten op Nederlandse markt?	Verminderde gevoeligheid aangetoond in Nederland
	Y139F (tyr-phe)	Y139C (tyr-cys)	Y139S (tyr-ser)	L128Q	L120Q		
Warfarine	-	-	-	-	-	Nee	Ja
Chlorophacinon	-	-	-	-	-	Nee	Ja
Coumatetralyl	-	-	-	-	-	Nee	Nee
Difenacoum	+	-	+	+	+/-	Ja	Ja
Bromadiolon	-	-	+	-	+/-	Ja	Ja
Brodifacoum	+	+	+	+	+	Ja	Nee
Flocumafen	+	+	+	+	+	Ja	Nee
Difethialon	+	+	+	+	+	Ja	Nee

1.5. Effect resistentie op gezondheid rat

Het is bekend dat de SNPs op het *Vkorc1* gen niet enkel zorgen voor resistentie tegen rodenticiden, maar ook leiden tot een verhoogde vitamine K behoefte (J. Jacob & Freise, 2011) waardoor de dieren hun dieet anders moeten uitbalanceren (meer vitamine K) dan niet-resistente dieren.

Mutaties op het *Vkorc1* gen die zorgen voor resistentie tegen rodenticiden, zorgen voor een fitheidsvoordeel voor ratten die aan anticoagulantia worden blootgesteld. Maar aan de andere kant brengt elke mutatie ook kosten met zich mee. Voor de Tyr139Cys mutatie is ondervonden dat er een aanzienlijk verhoogde vitamine K behoefte ontstaat, en deze mutatie ook een negatief effect op de voortplanting heeft. In een onderzoek uit Duitsland is aangetoond dat resistente vrouwelijke dieren in het wild minder rittens per nest hebben dan niet-resistente dieren. In datzelfde onderzoek kon er niet aangetoond worden of/wat de effecten zijn van resistentie op aspecten van de mannelijke reproductie. (Jens Jacob et al., 2012). Een ander onderzoek heeft aangetoond dat gematigd resistente vrouwtjes grotere nesten hebben dan zeer resistente vrouwelijke dieren, maar dat het tegenovergestelde effect in de mannelijke ratten te zien was (Heiberg, Leirs, & Siegismund, 2006). Verder is vanuit de literatuur bekend dat homozygote resistente individuen nog beter tegen het gif kunnen dan heterozygoot resistente dieren.

Recente studies hebben aangetoond dat een vitamine K tekort in ratten een negatief effect heeft op de spermatogenese (productie zaadcellen) (Sanyaolu, Oremosu, Osinubi, Vermeer, & Daramola, 2019). Indien een resistente mannelijke rat niet voldoende vitamine K in zijn dieet kan vergaren, zal dit dus negatief effect hebben op de reproductiviteit.

1.6. Toekomst resistentie

Als er een populatie is met dieren met een resistente mutatie en dieren met het wildtype, dan zal de fractie resistente dieren toenemen indien er rodenticiden worden gebruikt, en afnemen wanneer er geen rodenticiden worden gebruikt. Hiervoor is het wel van belang dat beide typen dieren, zowel resistent als wildtype in de populatie aanwezig zijn, of dat er migratie kan plaatsvinden vanuit andere gebieden. Het alternatief van een nieuwe mutatie of een terugmutatie komt slechts heel zelden voor. Vandaar dat heterozygote individuen (die de mutatie in één van de twee aanwezige kopieën hebben) van extra belang zijn. Zij kunnen in één generatie de omslag geven, omdat na paring naast heterozygote individuen ook homozygoot resistente als homozygoot wildtype individuen ontstaan. Wanneer een groot deel van de populatie bestaat uit heterozygote individuen, kan resistentie sneller uitselecteren.

Indien er geen rodenticiden meer gebruikt zullen worden en de ratten of muizen geen rodenticiden meer opnemen, zal de mutatie uiteindelijk verdwijnen. In de praktijk zal dit op korte termijn waarschijnlijk nog niet gebeuren, ten eerste omdat dieren af en toe weer in contact komen met rodenticiden en de selectie dan de andere kant op gaat.

Ten tweede speelt het feit mee dat resistentie bij rodenticiden een groot voordeel oplevert, maar dat het bij afwezigheid van rodenticiden slechts een klein nadeel vormt. Dit is dan weer mede afhankelijk van het dieet - als hier van nature weinig vitamine K in zit, is het negatieve effect groter. Mogelijk speelt dit bij de bruine rat (granenrijk dieet) meer dan bij bijvoorbeeld de zwarte rat (noten- en vruchteneter).

2. Materialen en Methoden

2.1. Verzameling monsters

Gezien de beperkte doorlooptijd van het project (23 september tot 15 december 2021) en om de betrouwbaarheid van de gegevens te vergroten, is in tegenstelling tot het onderzoek uit 2012/2013, de keuze gemaakt om de monsters zelf te verzamelen. Alle medewerkers van het KAD zijn uitgerust met een set handschoenen, een aantal monsterbuisjes en een schaar om zo onderweg monsters te kunnen nemen van bijvoorbeeld 'roadkills' (Fig. 2 en 3).



Figuur 2. Bruine rat op fietspad.
Insert: oormonster in buisje.



Figuur 3. Bruine rat op weg. Insert: staartmonster in buisje.

Via verschillende wegen zijn plaagdierbeheersers vanuit het hele land benaderd, onder andere middels gemeenten, via de brancheverenigingen PLA.N en NVPB en reeds bestaande eigen contacten. Het verzoek aan de plaagdierbeheersers was om karkassen van knaagdieren te bewaren. De dieren/monsters zijn opgehaald door het hele land, om zo de extra arbeid voor plaagdierbeheersers te minimaliseren en dus de betrokkenheid te vergroten. In totaal hebben er ruim 50 plaagdierbeheersers verspreid door heel NL meegedaan. Tevens zijn monsters van muizen en ratten verkregen via connecties bij het RIVM en de Universiteit Utrecht. Het gaat hierbij om monsters die eveneens recent verzameld zijn (van eind 2019 tot en met eind 2021).

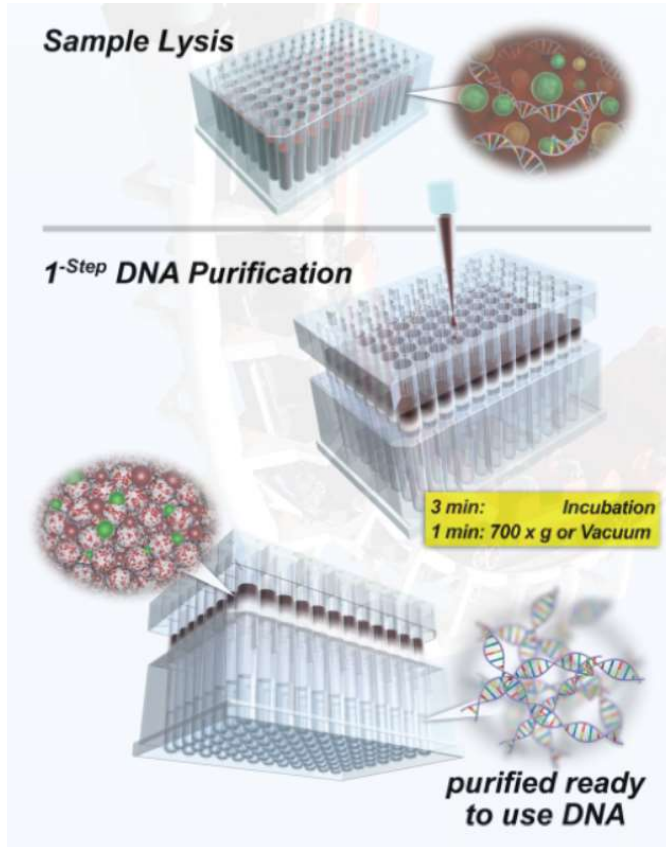
Van de dode knaagdieren is in het laboratorium oorweefsel afgenomen met behulp van een ponsapparaat (Figuur 5). Indien het oor niet aanwezig was, is er gebruik gemaakt van de staart om een weefselmonster van te ponsen. Van elk monster zijn de postcode, datum, diersoort, weefseltype, vangmethode (indien bekend), en eventuele opmerkingen bijgehouden in een Excel tabel. De geponste monsters zijn gecodeerd en bij de WUR aangeleverd voor het uitvoeren van moleculaire testen met de TaqMan-PCR test op het dierlijk DNA.



Figuur 5. Afnemen oorweefsel van een rat met behulp van een ponsapparaat (nat doordat hij gevangen was door een kastval gevuld met vloeistof).

2.2. Extractie van DNA

DNA is geïsoleerd uit oor en staart ponsjes \varnothing 4mm, met behulp van de een commerciële extractie kit nexttec™ 1-Step Tissue & Cells, volgens het door hen aanbevolen protocol (Figuur 6). Het opgeschoonde DNA is onverdund gebruikt in de TaqMan PCR.



Figuur 6. Visualisatie van DNA-extractie uit monsters van nexttec™.

2.3. TaqMan toets

Voor de TaqMan werd 1 μ l DNA gepipetteerd in een 25 μ l assay, bestaande uit 300nM van de primers F-Vkorc1-139 en R-Vkorc1-139 en de vier probes P-139-A-ATTO550 (50nM), P-139-C-ATTO647 (6.25nM), P-139-G-FAM (25nM) en P-139-T-HEX (100nM) in PerfeCTa Multiplex qPCR ToughMix (QuantaBio). De real-time PCR start met 1 min bij 95°C, vervolgens werden 40 cycli uitgevoerd met de temperatuurstappen 95°C (10 sec) en 60°C (30 sec) in de Quantstudio 12K flex. De verkregen profielen werden visueel gescoord. Van de reverse primer R-Vkorc1-139 zijn twee varianten, een voor de bruine/zwarte rat en een voor de huismuis. Alle probes bevatten Locked Nucleic Acid (LNA) modificaties.

2.4. Amplicon sequencing.

Amplicon sequencing voor soorten-identificatie en het identificeren van additionele sequentie variatie in de *Vcork1*-gen werd uitgevoerd voor twee regio's voor 48 bruine rat monsters, 16 huismuismonsters, en 24 zwarte rat monsters. Met amplicon sequencing wordt een specifiek stuk van het DNA geanalyseerd. DNA-sequenties geven de volgorde aan van de nucleotiden waaruit het DNA van een organisme is opgebouwd. Voor soorten-identificatie werd gebruik gemaakt van het barcode gen cytochroom c oxidase subunit I. De primer combinatie van BatL5310 (CCTACTCRGCCATTTTACCTATG) R6036R (ACTTCTGGGTGTCCAAAGAATCA) levert een amplicon op van 750 bp. De PCR start met 5 min bij 94°C, vervolgens werden 40 cycli uitgevoerd met de temperatuurstappen 94°C (30 sec), 48°C (45 sec), 72°C (90s) met aan het einde een stap bij 72°C gedurende 10 minuten.

2.5. Enquête

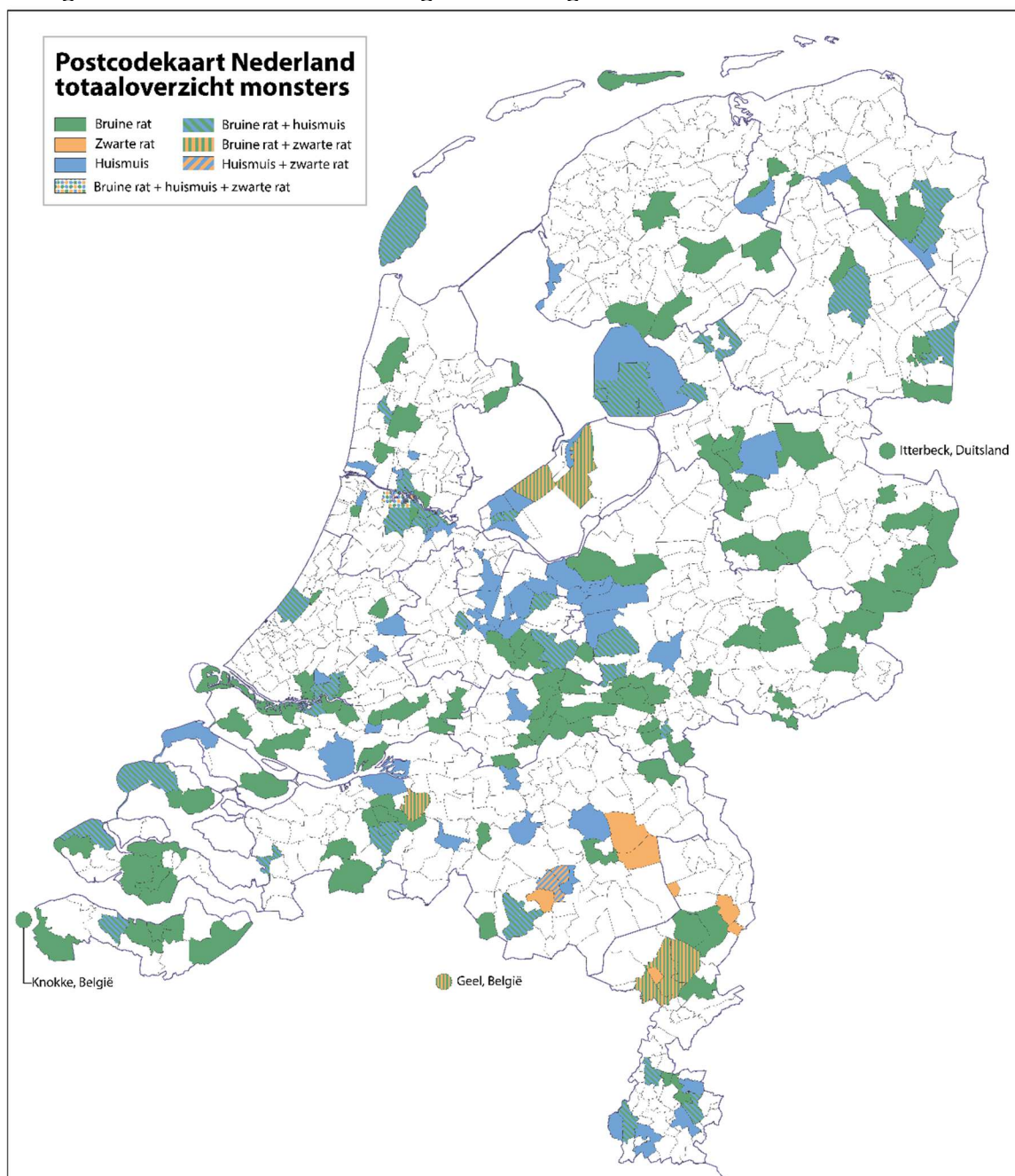
In de maand november is er een digitale enquête verspreid, om zo inzicht te krijgen in de ervaringen van plaagdierbeheersers in Nederland met rodenticiden resistentie. De volgende vragen zijn gesteld:

1. Hoe lang bent u actief als gecertificeerd plaagdierbeheerser?
2. In welke 2-cijferige postcodegebieden bent u werkzaam?
3. Maakt u gebruik van rodenticiden?
 - a. Zo ja, welke werkzame stof zit erin?
4. Bent u weleens resistentie tegengekomen bij de uitvoering van uw werkzaamheden?
 - a. Zo ja, bij welke diersoort?
 - b. En op welke locatie (postcodegebied)?
 - c. Op welke wijze heeft u het aangepakt toen u resistentie tegenkwam?

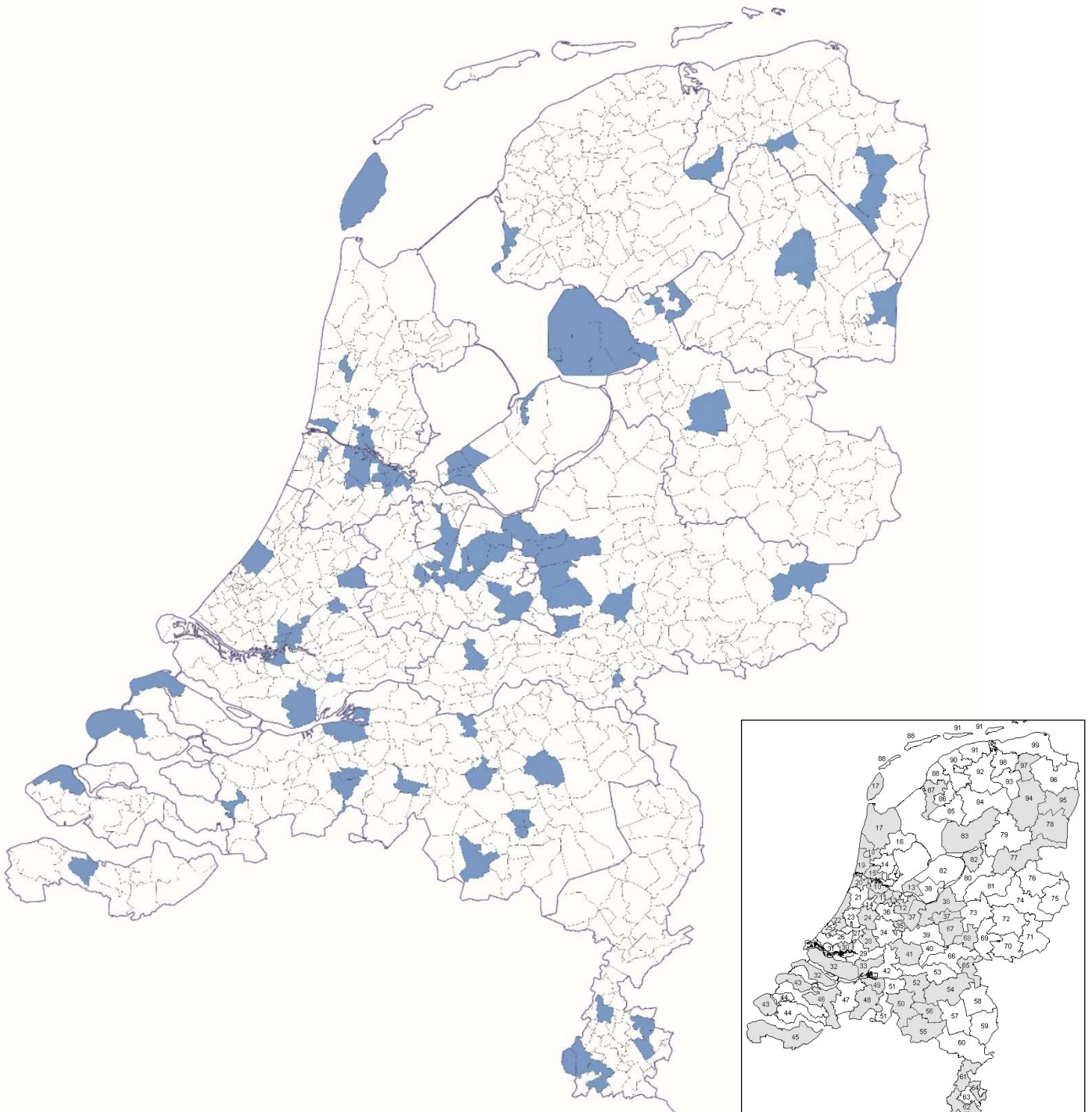
3. Resultaten

3.1. Aantal monsters

Van september tot en met november 2021 zijn in totaal 2318 knaagdiermonsters verzameld, verdeeld over 218 verschillende driecijferige postcodegebieden. Dit bestond uit 397 huismuizen (en 286 andere diverse muizensoorten), 1553 bruine rat, en 82 zwarte rat monsters (Figuur 7). Voor de huismuizen (Figuur 8) en de bruine rat (Figuur 9) is een goede landelijke spreiding gerealiseerd, respectievelijk 43 tweecijferige- en 87 driecijferige postcodegebieden, en 60 tweecijferige- en 145 driecijferige postcodegebieden (er zijn in Nederland in totaal 90 tweecijferige- en 798 driecijferige postcodegebieden). Er zijn ook bruine ratten van twee locaties in België en één locatie in Duitsland ingezameld en getest.



Figuur 7. Overzichtskaat van de locaties waarvandaan de monsters huismuis, bruine rat en zwarte rat verzameld zijn op basis van 3-cijferige postcodegebieden van Nederland.



Figuur 8. Overzichtskaart van 3-cijferige postcodegebieden van Nederland waarvandaan de huismuizen verzameld zijn.
 Insert: overzichtskaart van muizen uit 2-cijferige postcodegebieden NL waarvandaan de huismuizen verzameld zijn.



Figuur 9. Overzichtskaart van 3-cijferige postcodegebieden van Nederland waarvandaan de bruine ratten verzameld zijn. Insert: overzichtskaart van bruine ratten uit 2-cijferige postcodegebieden NL.

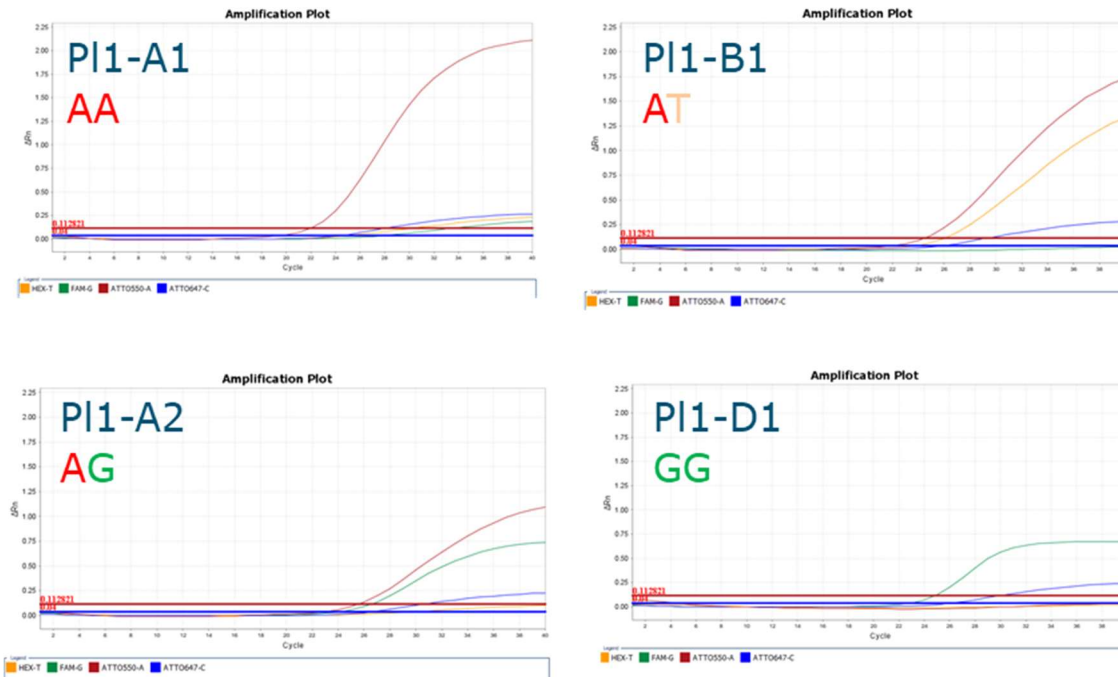
3.2. Soorts-identificatie

De sequentie analyse van 48 geselecteerde bruine rat monsters bevestigt dat deze 48 monsters ook daadwerkelijk bruine ratten zijn. Een selectie van 16 huismuismonsters bleek dat in 15 gevallen de herkomst “huismuis” bevestigd werd, terwijl het in één geval om een bruine rat bleek te gaan. Voor de zwarte rat kan geen eenduidig antwoord gegeven worden. De zwarte rat monsters en zijn daarom niet meegenomen in de verdere analyse.

Ter controle zijn twee als woelmuis ingebrachte monsters ook getest op soort, en deze bleken op basis van de sequentie analyse inderdaad woelmuis. Twee spitsmuismonsters zijn ook met de sequentie analyse bevestigd als zijnde spitsmuis. De muis-monsters zijn aangepast op basis van de moleculaire soorts-identificatie. Andere muizensoorten dan huismuizen kunnen niet getest worden op resistentie omdat de test alleen werkt op huismuis DNA.

3.3. Resistentie

In totaal zijn er 683 diverse muizen en 1553 bruine ratten op aminozuur 139 onderzocht voor de *Vkorc1* mutaties (Figuur 10). De resultaten zijn samengevat in Tabel 6.



Figuur 10. Voorbeeld van enkele gevonden profielen voor bruine rat monsters met linksboven het wildtype profiel (AA) gekenmerkt door een rode curve. Bij heterozygote individuen worden twee kleuren lijnen zichtbaar.

Tabel 6. Overzicht van de geanalyseerde huismuis en bruine rat monsters, percentages staan tussen haakjes.

Soort	Gevonden profielen					Totaal
	Wildtype	tyr-cys	tyr-phe	cys-cys	phe-phe	
Huismuis	246 (62%)	105 (26%)	0	46 (12%)	0	397
Bruine rat	1224 (83%)	135 (9%)	55 (4%)	29 (2%)	33 (2%)	1476

3.3.1 Resistentie huismuis

Ondanks dat veel van de muis-monsters geen huismuis bleken te zijn konden er 397 van de 683 muis monsters gescoord worden en zijn daarmee met 100% zekerheid huismuismonsters. De overige 286 geteste muizen bleken geen huismuizen te zijn, maar andere, bijvoorbeeld bosmuizen of woelmuizen. Deze muizen horen tot andere geslachten en de PCR test laat hierdoor geen reactie zien.

Bij de test op *Vkorc1* mutaties op aminozuur 139 werd bij de huismuizen de gevoelige DNA-variant (het zogenaamde wildtype) 246 keer gevonden (62%) terwijl 105 keer de tyr-cys (26%, Figuur 11) en 46 keer de cys-cys (12%, Figuur 12) variant werd aangetroffen, die een rol spelen bij resistentie, beiden de zogeheten ‘Duitse’ mutatie omdat deze variant voornamelijk voorkomt in Duitsland, zowel heterozygoot (tyr-cys) als homozygoot (cys-cys). Andere mutaties zijn niet gevonden.

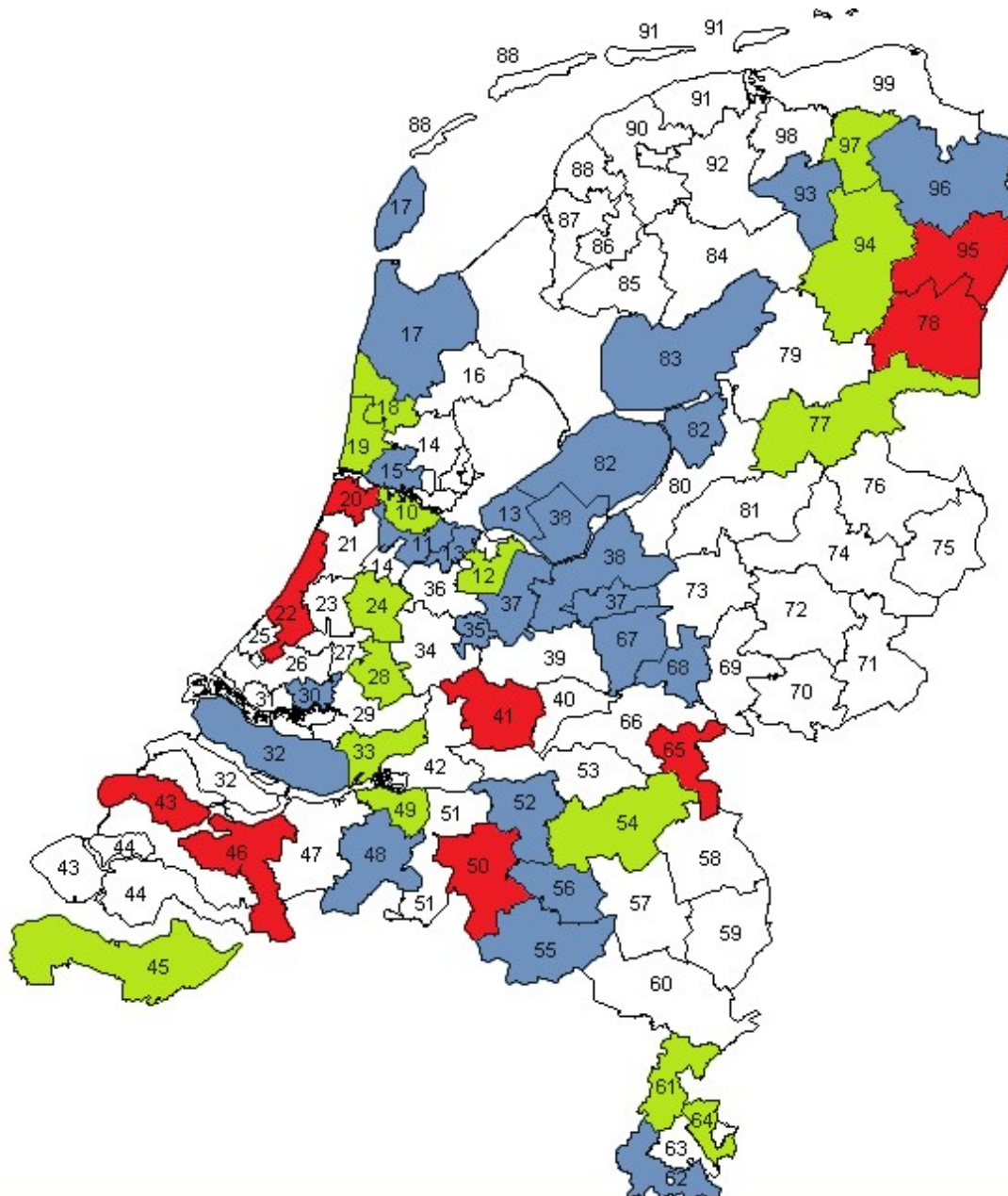


Figuur 11. Overzicht van de tyr-cys mutaties bij de huismuizen. Getallen tussen haakjes geven het aantal aangetroffen mutaties van die soort binnen het driecijferige postcodegebied.



Figuur 12. Overzicht van de cys-cys mutaties bij de huismuizen. Getallen tussen haakjes geven het aantal aangetroffen mutaties van die soort binnen het driecijferige postcodegebied.

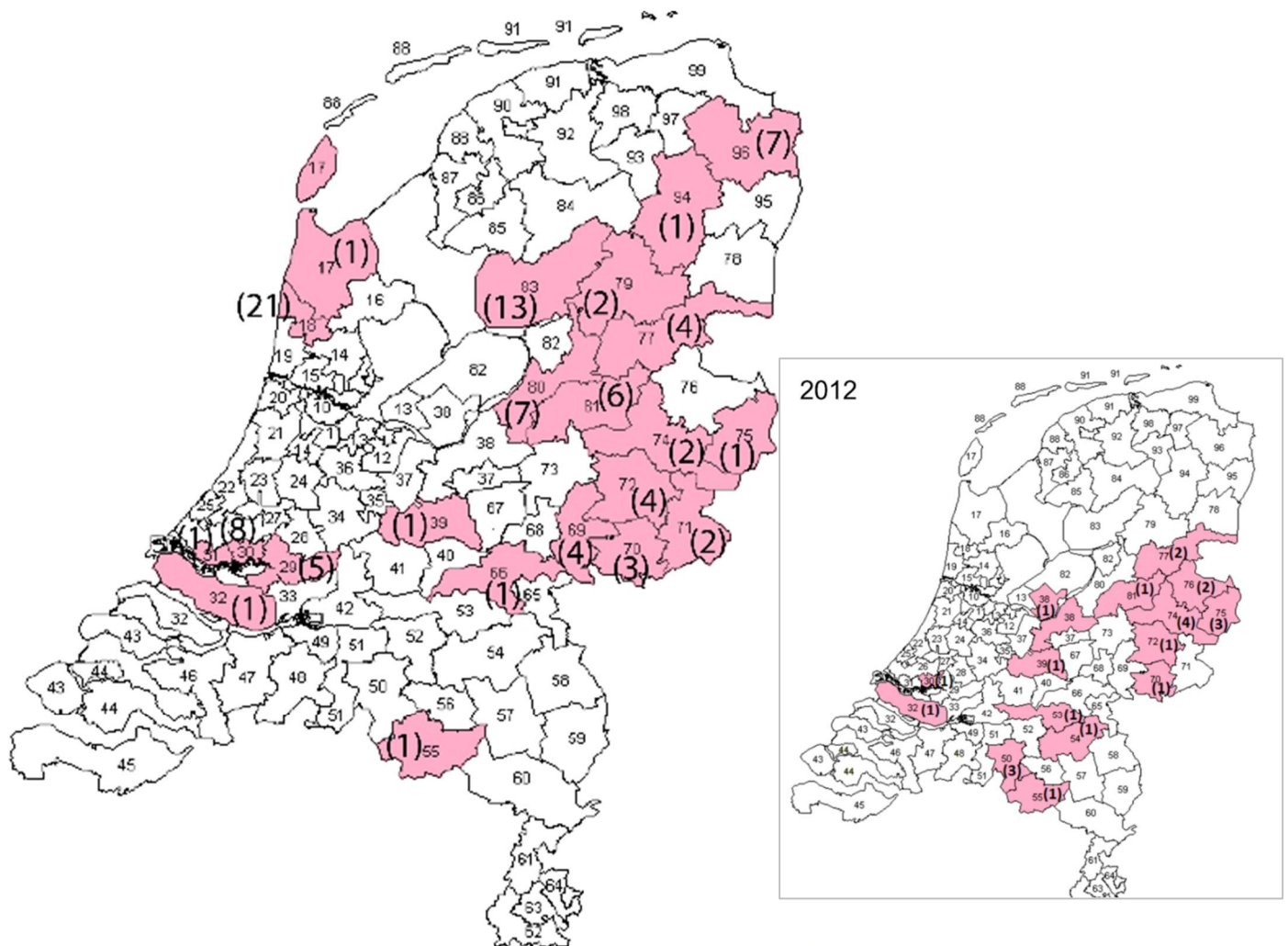
De kaart met inzicht in mutaties bij de huismuis op basis van tweecijferige postcodegebieden geeft ook een goed overzicht (Figuur 13). De inkleuring is arbitrair, want op basis van één gevonden resistente muis kon een postcodegebied al rood kleuren. De kaarten van de driecijferige postcodegebieden bieden wat dat betreft meer inzicht (Figuur 11 en 12). Een totaaloverzicht van de aantallen monsters per postcodegebied is te vinden in Bijlage 1.



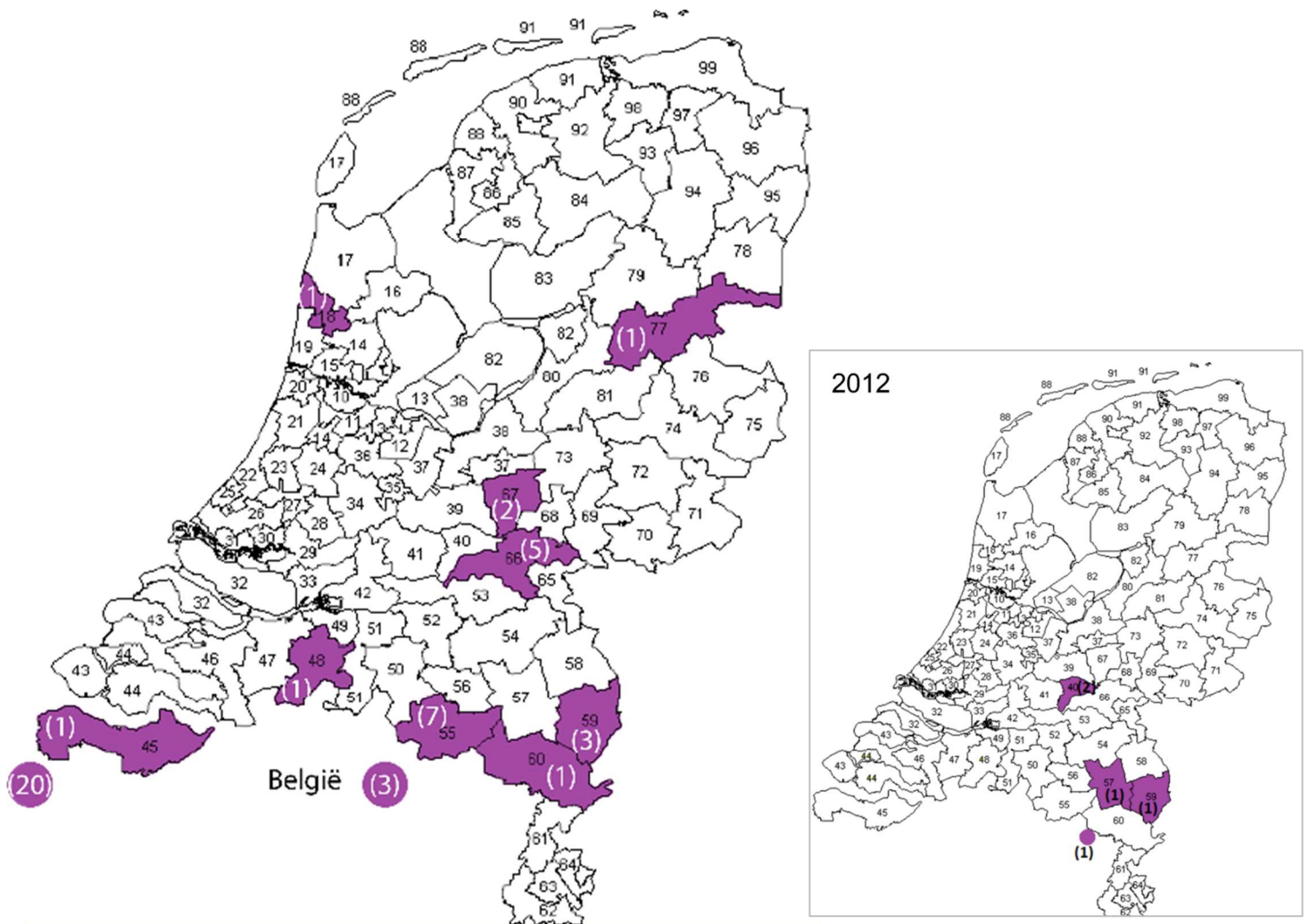
Figuur 13. Overzichtskaat van Nederland van de resultaten van de resistentie test op de huismuizen op basis van tweecijferige postcodegebieden. Groen betekent geen resistente huismuizen aangetroffen, blauw is zowel resistente als niet-resistente huismuizen aangetroffen, rood betekent uitsluitend resistente huismuizen aangetroffen

3.3.2. Resistentie bruine rat

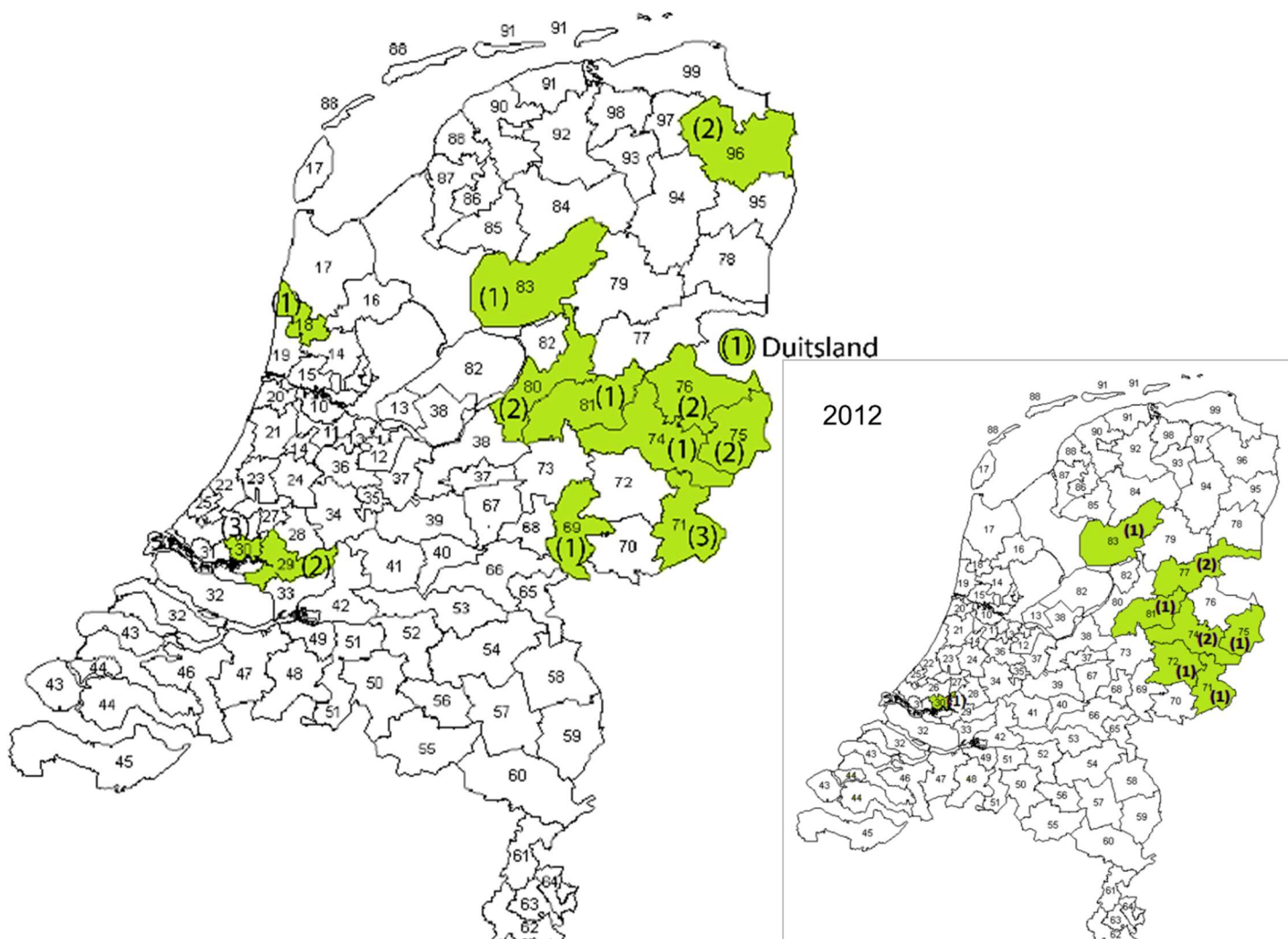
Bij de bruine rat konden 1476 van de 1553 monsters gescoord worden (95%, zie Bijlage 2). Van de gescoorde monsters werd de gevoelige DNA-variant (het zogenaamde wildtype, 'niet-resistent') 1224 keer gevonden (83%) en 252 dieren toonden mutaties (17%). Er zijn vier verschillende soorten mutaties gevonden: 135 tyr-cys (9%), 55 tyr-phe (4%), 29 cys-cys (2%), en tenslotte 33 keer phe-phe (2%), zie ook Tabel 6. Het grootste aandeel wordt gevormd door de zogeheten 'Duitse' mutatie, net als bij de huismuis zowel heterozygoot (tyr-cys) als homozygoot (cys-cys) aangetroffen. De 'Franse' mutatie is bij de bruine rat ook aangetroffen, zowel heterozygoot (tyr-phe) als homozygoot (phe-phe). Net als in het voorgaande onderzoek is te zien dat de verschillende mutaties in verschillende delen van het land optreden (Figuren 14 t/m 17). Meer gedetailleerde kaarten op basis van driecijferige postcodegebieden zijn te vinden in Bijlage 3.



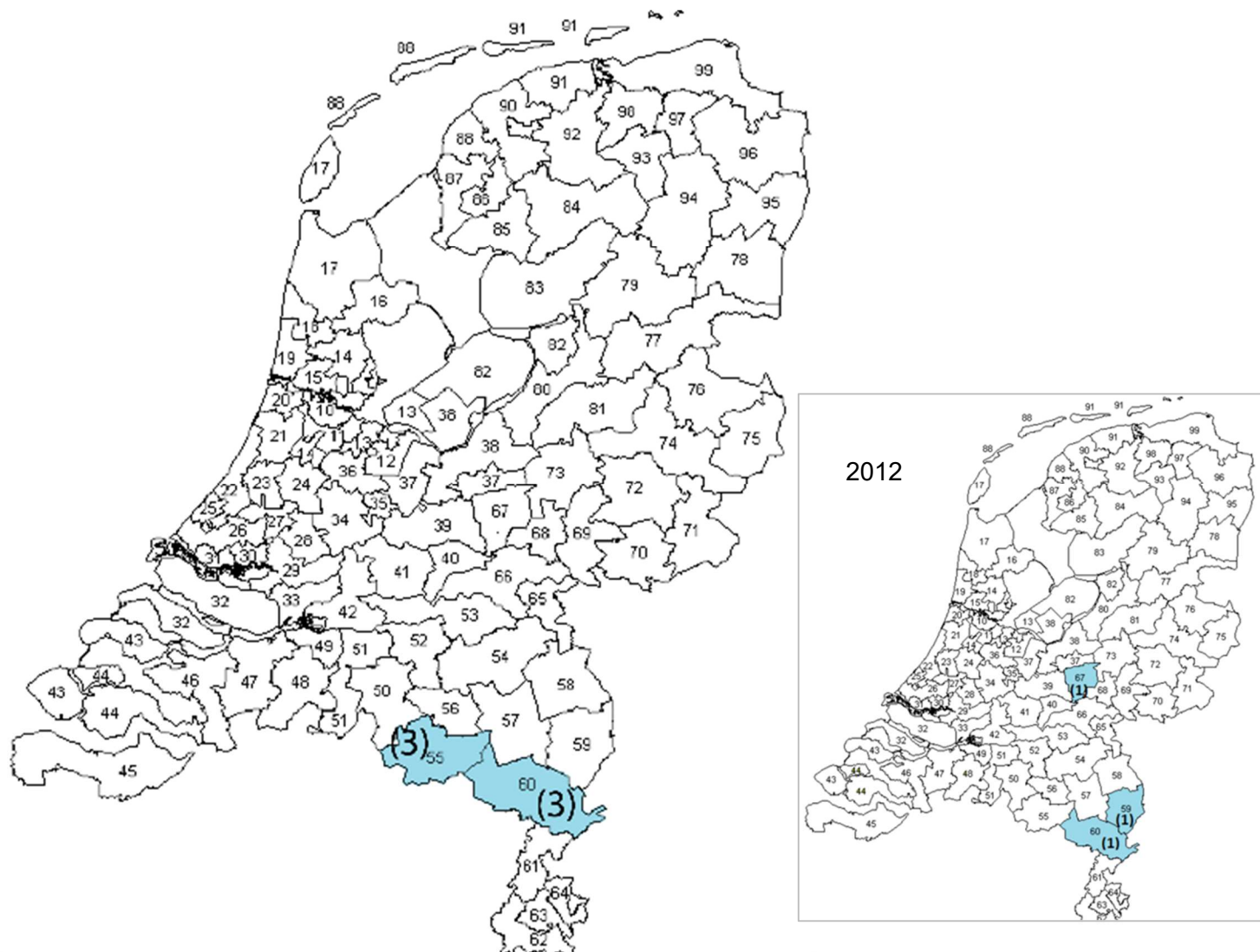
Figuur 14. Overzicht van de tyr-cys mutaties bij de bruine rat . Getallen tussen haakjes geven het aantal aangetroffen mutaties van die soort binnen het tweecijferige postcodegebied. Insert: overzicht onderzoek 2012.



Figuur 15. Overzicht van de tyr-phe mutaties bij de bruine rat. Getallen tussen haakjes geven het aantal aangetroffen mutaties van die soort binnen het tweecijferige postcodegebied. Insert: overzicht onderzoek 2012.

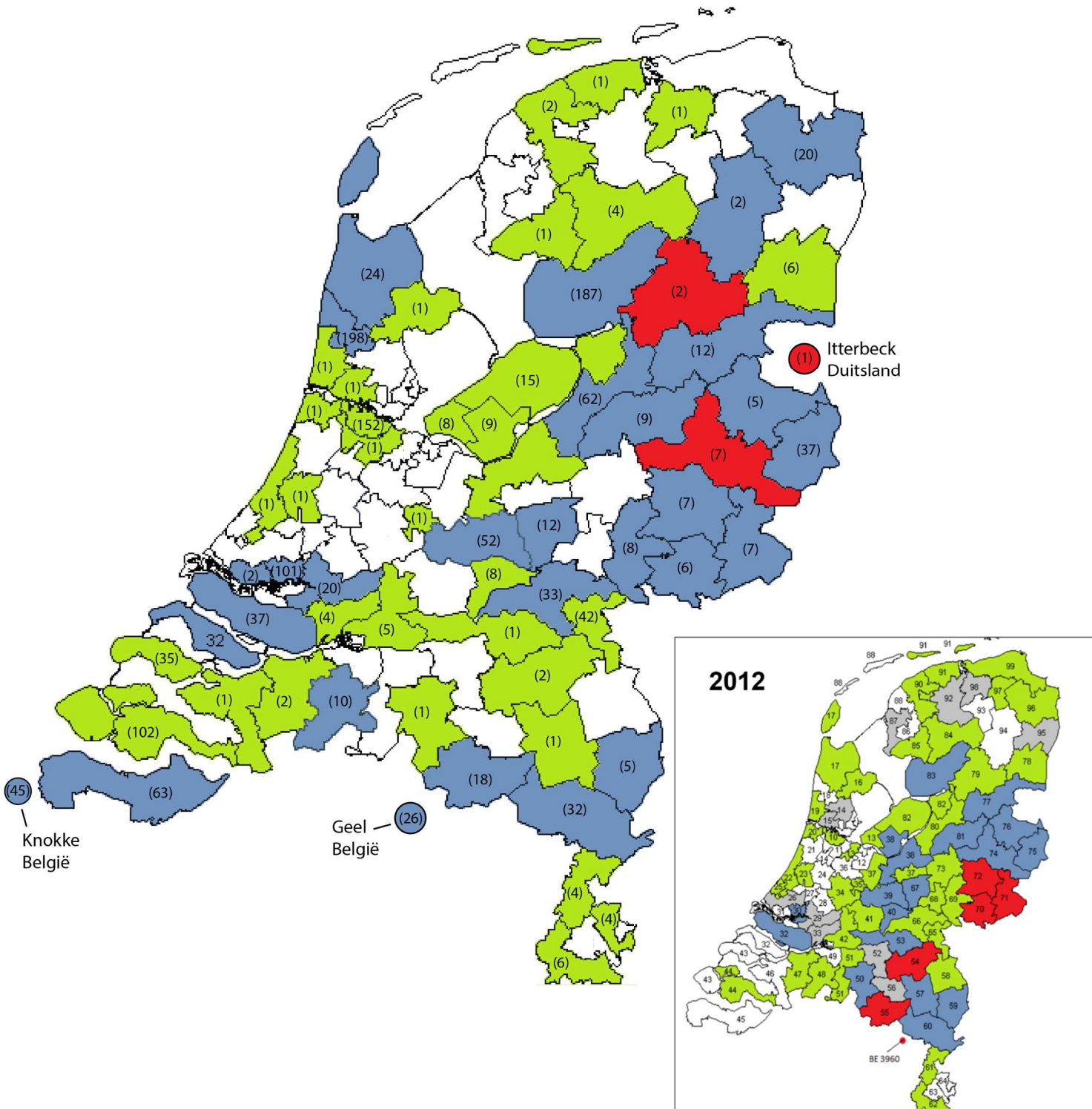


Figuur 16. Overzicht van de cys-cys mutaties bij de bruine rat. Getallen tussen haakjes geven het aantal aangetroffen mutaties van die soort binnen het tweecijferige postcodegebied. Insert: overzicht onderzoek 2012.



Figuur 17. Overzicht van de phe-phe mutaties bij de bruine rat. Getallen tussen haakjes geven het aantal aangetroffen mutaties van die soort binnen het tweecijferige postcodegebied. Insert: overzicht onderzoek 2012.

Voor de bruine rat ziet de kaart met inzicht in mutaties op basis van tweecijferige postcodegebieden er verdeeld uit; er zijn 32 van de 60 gemonsterde tweecijferige postcodegebieden waar enkel wild-type ratten aangetoond zijn (53%), en 26 gebieden waar zowel resistent als niet resistente ratten gevonden zijn. In twee tweecijferige postcodegebieden zijn enkel resistente ratten aangetroffen (Figuur 18).



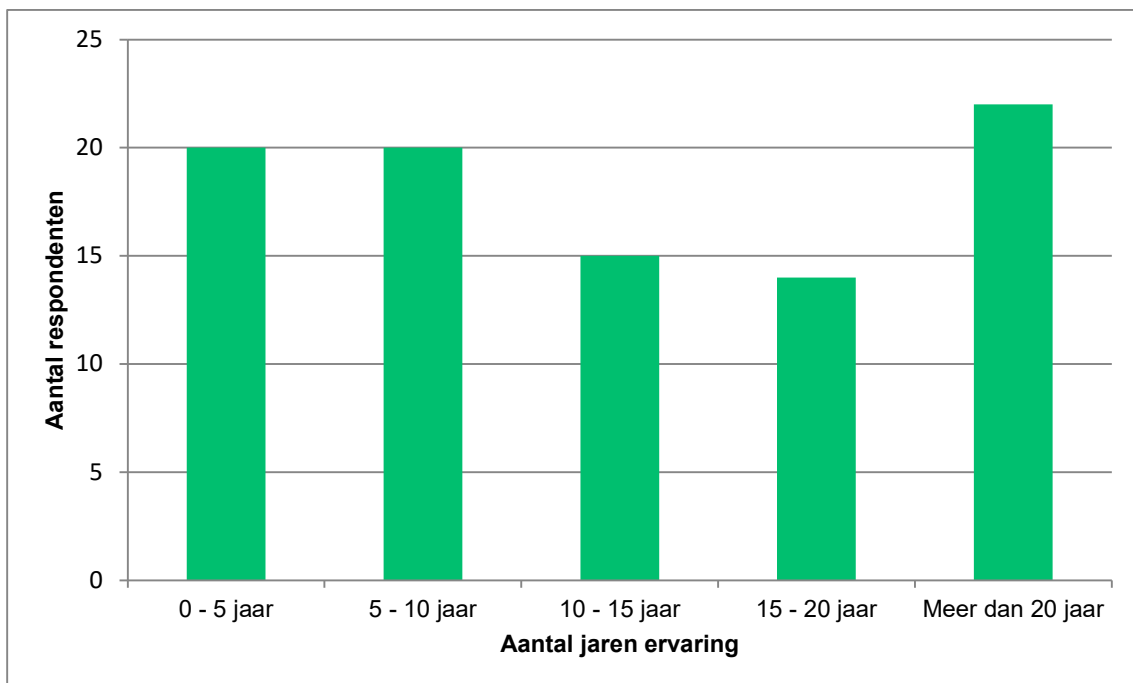
Figuur 18. Overzichtskaart van Nederland van de resultaten van de resistentie test op bruine ratten op basis van tweecijferige postcodegebieden met het aantal monsters per gebied tussen haakjes (). Groen betekent geen resistente bruine ratten aangetroffen, blauw is zowel resistente als niet-resistente bruine ratten aangetroffen, rood betekent uitsluitend resistente bruine ratten aangetroffen, en grijs betekent dat er weliswaar monsters ingestuurd zijn, maar deze lieten bij de test geen reactie zien.

3.4. Additionele mutaties in het *Vkorc1*-gen

Helaas zijn er op basis van de sequentie analyse van het *Vkorc1*-gen geen additionele mutaties gevonden. Dit komt voor een belangrijk deel door de kwaliteit van de gegenereerde sequenties. Na een korte sequentie die goed af te lezen is, wordt het beeld rommelig en lijken er twee sequenties (bijvoorbeeld door heterozygotie) door elkaar te lopen. Meer onderzoek is nodig om deze technische problemen te verhelpen.

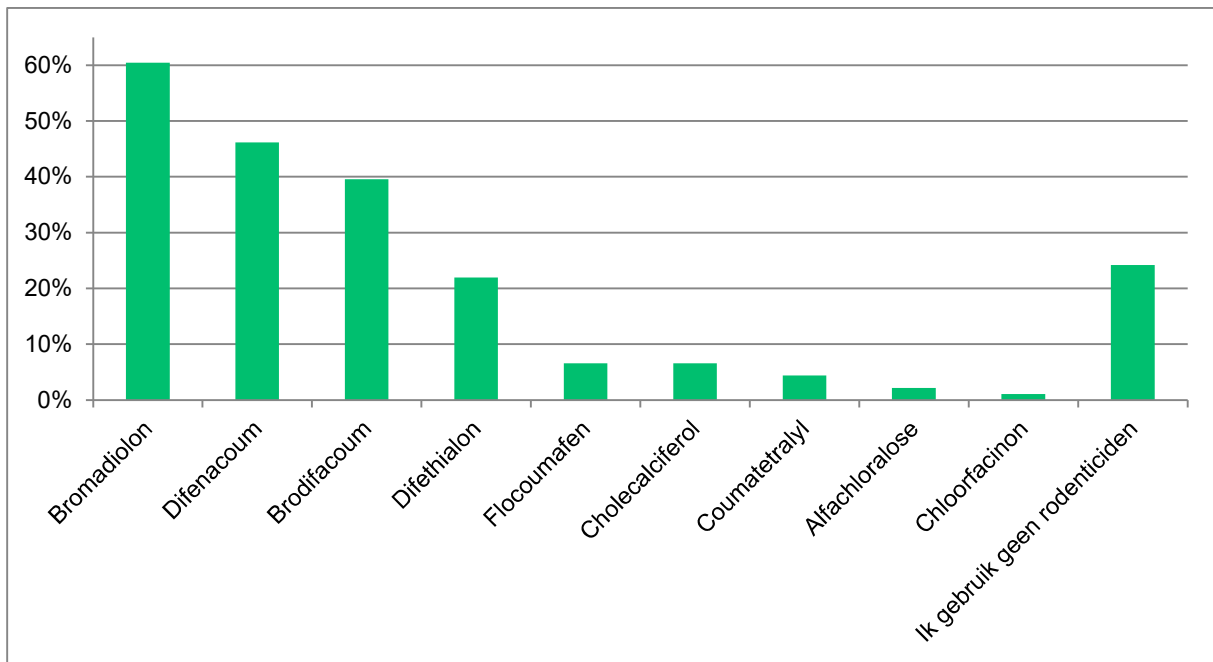
3.5. Enquête uitkomsten

In totaal hebben 91 plaagdierbeheersers deelgenomen aan de enquête. Van de 91 geënquêteerden is ruim 24% al langer dan 20 jaar werkzaam als plaagdierbeheerser (Figuur 19).



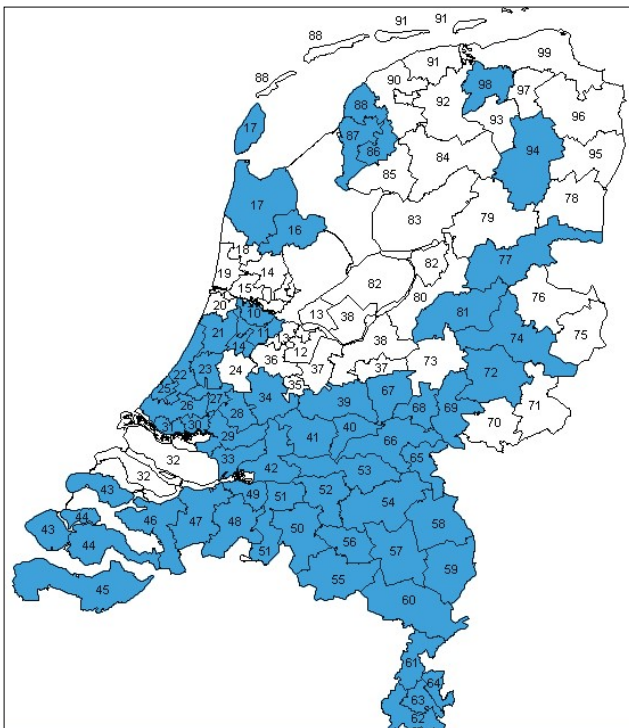
Figuur 19. Resultaat enquêtevraag aantal jaren ervaring als plaagdierbeheerser

Ruim 24% van de plaagdierbeheersers geeft aan zonder rodenticiden te werken. Wat opvallend is, is dat indien er wel rodenticiden gebruikt worden, men het vaakst werkt met middelen welke (onder andere) bromadiolon als werkzame stof hebben (Figuur 20).



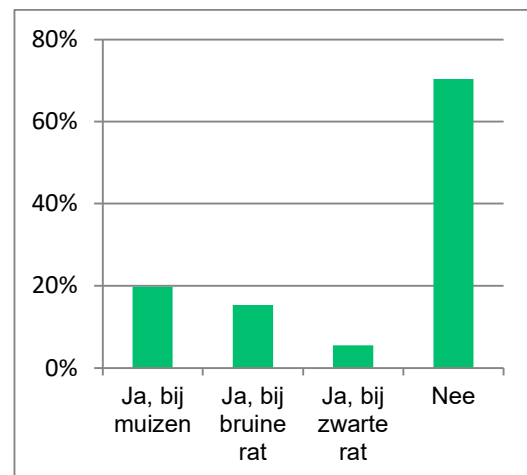
Figuur 20. Resultaat enquêtevraag welke werkzame stoffen gebruikt worden.

Van de 91 plaagdierbeheersers die de enquête ingevuld hebben, gaven er acht aan door het hele land werkzaam te zijn. De overige 83 zijn werkzaam in één of meerdere (soms wel tot 15) tweecijferige postcodegebieden per persoon, zie figuur 21.



Figuur 21. 2-cijferige postcodekaart van Nederland met aangegeven waar de geënquêteerde plaagdierbeheersers werkzaam zijn.

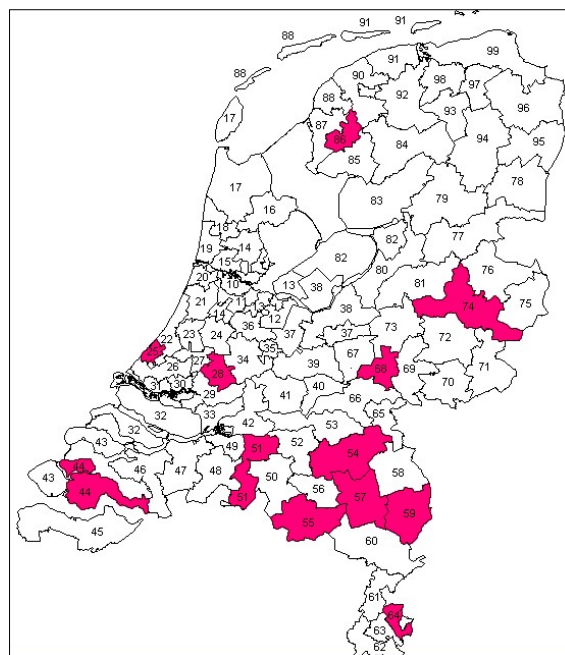
Ruim 70% van de geënquêteerden heeft geen ervaring met resistentie (Figuur 22). Resistentie tegen rodenticiden bij muizen is het vaakst ervaren (19,8%).



Figuur 22. Inzicht in ervaringen van plaagdierbeheersers met resistentie.

Resistentie tegen rodenticiden is in 21 verschillende tweecijferige postcodegebieden waargenomen door 26 plaagdierbeheersers (Figuur 23). Slechts één plaagdierbeheerser gaf aan in twee postcodegebieden resistentie tegengekomen te zijn, de overige 25 hebben enkel één gebied aangegeven.

Op de vraag: “Op welke wijze heeft u uw plaagdierbeheersing aangepakt toen u resistentie tegenkwam?”, hebben 11 van de 13 plaagdierbeheersers aangegeven van werkzame stof te veranderen. Elf van de 26 zijn overgegaan op klemmen en werken volgens de IPM-methode, twee van de 26 zijn overgestapt op schieten met perslucht en warmtebeeldkijker, en één persoon is overgegaan op werken met roofvogels.



Figuur 23. Tweecijferige postcodekaart van Nederland met aangegeven waar de geënquêteerde plaagdierbeheersers resistentie menen te hebben aangetroffen bij ratten of muizen.

Wanneer de tweecijferige postcode kaarten van de in dit onderzoek geteste ratten (Figuur 18) vergeleken wordt met de kaart waarop aangegeven is waar professionals resistentie ervaren hebben (Figuur 23, in totaal 12 tweecijferige postcodegebieden), worden een aantal gebieden aangeduid door de bestrijders waar in dit onderzoek helaas geen ratten vandaan getest zijn. Dit betreffen de postcodegebieden 25, 28, 51, 68, en 86. De gebieden die aangeduid worden door de bestrijders en ook in dit onderzoek resistente ratten zijn aangetoond zijn 55, 59 en 74. De overige vier postcodegebieden aangegeven door de professionals als gebieden waar ze resistentie tegen zijn gekomen, kleuren in de huidige onderzoekskaart groen. Het betreft de gebieden 44 (n=60), 54 (n= 2), 57 (n=1) en 64 (n=2).

4. Conclusies

In dit onderzoek is er bij de bruine rat een verdeling van 83% niet resistente (wildtype) en 17% resistente dieren aangetroffen (n=1476). In vergelijking met het resistentieonderzoek uit 2012/2013 is het percentage resistente dieren lager, maar wel in dezelfde range -25% testte resistent in 2012. De huidige 17% is een gemiddelde voor heel Nederland. Er zijn duidelijke verschillen tussen de bemonsterde regio's. In sommige regio's zijn bijvoorbeeld geen resistente ratten gevonden, waar in andere gebieden bijvoorbeeld alleen resistente ratten aangetroffen zijn. Het voorkomen van homozygoot resistente dieren (cys-cys, phe-phe) is ook een duidelijke indicator dat het percentage resistente ratten in die gebieden hoog is. Hoewel in de studie van 2012 de aantallen beperkt waren en de bemonstering geografisch gezien minder gebalanceerd was, laat de vergelijking van resultaten wellicht een trend zien van verminderde rodenticiden resistentie bij bruine ratten. Deze positieve trend kan voortkomen uit het bewuster en restrictiever gebruik van rodenticiden dat de sector in gang heeft gezet sinds de vorige monitoring.

De mutaties die optreden bij de bruine rat in Nederland zijn van zowel de 'Duitse' als 'Franse' variant de heterozygote en homozygote varianten, respectievelijk tyr-cys (9%), cys-cys (2%), tyr-phe (4%), phe-phe (2%). Homozygoot resistente bruine ratten met de Duitse mutatie (cys-cys) werden niet alleen aangetroffen in die regio's waarvan al langer bekend is dat er resistentie kan optreden (Twente, Achterhoek), maar ook in de regio Rotterdam en Noord-Holland. Dit komt grotendeels overeen met de resultaten uit het eerdere onderzoek in Nederland (Bijlage 3). Homozygote resistente dieren met de Franse mutatie (phe-phe) werden ook op meerdere locaties in Nederland aangetroffen: in Zuid-Brabant, Noord-Limburg, en vlak onder Zeeland in België. In het onderzoek uit 2012 werd deze mutatie ook nog aangetroffen in de Gelderse Vallei, in het huidige onderzoek niet. Mogelijk hebben de locaties van deze Franse mutatie te maken met transport (o.a. scheepvaart) vanuit België en Frankrijk.

Daarnaast lijken heterozygoot resistente dieren met zowel de Duitse (tyr-cys) als de Franse (tyr-phe) mutaties zich verder over Nederland te verspreiden ten opzichte van het vorige onderzoek. De tyr-phe variant duidelijk meer in het zuiden van Nederland voorkomt dan de tyr-cys variant. Het risico van aanwezigheid van heterozygoot resistente dieren is dat als zij onderling paren, er selectie plaats kan vinden richting homozygotie met alle nadelen van dien. Homozygote zijn mogelijk meer resistent en ook zullen alle nakomelingen van ouders die homozygoot resistent zijn ook resistent zijn. De mutatie splitst dan niet meer uit.

Tevens is de huismuis onderzocht, wat nieuw is voor Nederland. Voor de huismuis is het percentage dieren met een mutatie hoger dan bij de bruine rat, namelijk 62% wildtype en 38% resistente dieren (n=397). Het is interessant om te zien dat er verschillen zijn tussen de locaties van resistente huismuizen en bruine ratten. Dit geldt voor zowel de heterozygoot Duitse mutatie (tyr-cys) als voor de homozygoot Duitse mutatie (cys-cys). Er zijn bijvoorbeeld in midden Nederland wel muizen met de cys-cys variant getest, maar geen ratten. Op basis van de resultaten lijkt resistentie bij huismuizen een belangrijkere factor te zijn dan bij de bruine rat. Ook de bestrijders zelf geven aan dat bij muizen meer resistentie gevonden wordt.

De zwarte rat monsters zijn niet meegenomen in de verdere analyse, omdat met sequentie analyse ter bevestiging van de soort geen eenduidig antwoord naar voren kwam. Dit betekent dat het de aanbeveling geniet om in een volgend onderzoek als eerste stap te starten met soortidentificatie voor alle monsters. De volgende stap is dan het selecteren, en eventueel ontwikkelen op basis van de nieuwste ontwikkelingen en literatuur, van de juiste test voor resistentie voor de specifieke soort in kwestie.

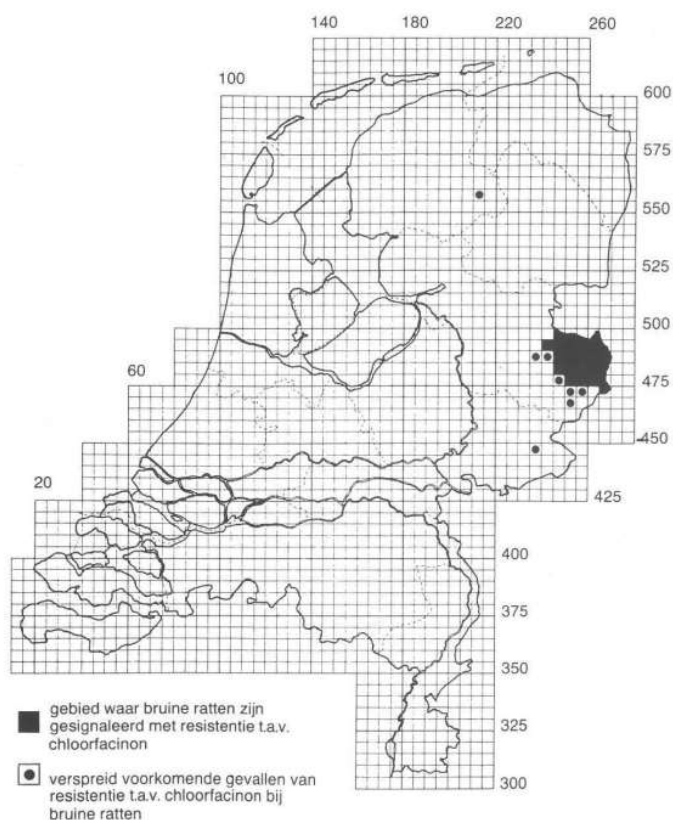
Voor ratten en muizen zijn er ook nadelen verbonden aan resistentie wanneer geen rodenticiden gebruikt worden. Doordat een resistent dier bijvoorbeeld een grotere vitamine K behoefte heeft dan een niet-resistent dier, zal wanneer de selectie druk van de rodenticiden wegvalt, het percentage resistente dieren verminderen. Door het verminderde gebruik van rodenticiden conform IPM werkwijze, is dit een reële mogelijkheid. Het is zelfs mogelijk dat de lagere aantallen resistentie bij bruine ratten een gevolg zijn van de recent ingezette IPM strategieën en de veranderende rol van rodenticiden.

De verwachting voor de resistentieontwikkeling in de nabije toekomst is dat het percentage resistente bruine ratten verder af zal nemen, ondanks dat er in bepaalde regio's in Nederland toch resistentie optreedt. Dat betekent dat in deze gebieden enkele werkzame stoffen verminderd of zelfs geheel ineffectief zouden kunnen zijn, of worden. Deze verwachting geldt voornamelijk voor de minder krachtige rodenticiden van de tweede generatie: bromadiolon en difenacoum. Onderzoek uit Duitsland toonde aan dat gebruik van een middel met 0.005% brodifacoum nog wel effectief was bij bruine ratten met de tyr-cys mutatie. Het is de verwachting dat dit ook voor de bruine ratten in Nederland met de tyr-cys mutatie geldt. Uit de literatuur wordt ook duidelijk dat succes van een bestrijding samenhangt met of men te maken heeft met een populatie met heterozygoot of homozygoot resistente dieren. Voor bruine ratten met een heterozygoot Franse mutatie (tyr-phe) is in de literatuur te vinden dat deze dieren niet meer gevoelig zijn voor coumatetralyl en bromadiolon, maar nog wel gevoelig zijn voor difenacoum, brodifacoum, flocumafen, en difethialon.

Voor de huismuis is er voor diverse mutaties bekend welke werkzame stoffen wel of niet meer effectief zijn. Helaas wordt slechts één van de in dit onderzoek aangetoonde mutaties (tyr-cys) beschreven. Huismuizen met een tyr-cys mutatie zijn niet meer gevoelig zijn voor bromadilon, in sommige gevallen nog wel gevoelig voor difenacoum, en nog wel gevoelig voor brodifacoum, flocumafen, en difethialon.

5. Discussie

Verminderde gevoeligheid tegen rodenticiden is al langere tijd bekend. In een publicatie uit 1989 over resistentieonderzoek bij de bruine rat in Nederland, wordt vermeld dat er resistentie tegen chloorfacinon is vastgesteld in oostelijke gedeelten van het land (Twente, Figuur 24), en dat dat opgelost is door het wisselen van werkzame stof: “door gebruik van difenacoum lokaas zijn de chloorfacinon-resistente ratten toch afgedood” (van Blaaderen & Bode, 1989). Het rapport geeft aan dat resistentieproblemen bij de bestrijding van de bruine rat elders in Nederland destijds niet of nauwelijks voorkwamen. In deze publicatie van ruim dertig jaar geleden werd tevens al gesuggereerd dat bruine ratten uit Duitsland, direct grenzend aan Twente, mogelijk ook resistentie vertonen. Het is interessant om te zien dat er in het huidige onderzoek zowel in Twente als direct over de grens bruine ratten met mutaties gevonden zijn.



Figuur 24. Overzichtskartaal Nederland met de verspreiding van chloorfacinon-resistentie bij de bruine rat in de periode 1986-1988. Overgenomen van van Blaaderen en Bode 1989.

In de praktijk wordt er bij verdenking op resistentie veelal gewisseld naar een middel met andere werkzame stof(fen). Het wisselen van middelen kan effectief zijn om een populatie te bestrijden, maar het is de vraag of ontwikkeling/aanpassing van resistentie voorkomen wordt.

In dit onderzoek hebben plaagdierbeheersers input gegeven in waar men resistentie heeft ervaren/ervaart.

Helaas zijn uit een aantal van die aangegeven gebieden geen ratten verzameld in dit onderzoek. Dat maakt dat er geen conclusie getrokken kan worden over de huidige stand van zaken in de betreffende postcodegebieden. Voor een vervolgonderzoek zou er zeker ingezet moeten worden op het verkrijgen van monsters uit die specifieke postcodegebieden.

Wegens de verschillende vangst- en aanlevermethoden is het voor een deel van de monsters in het vervolg essentieel om moleculaire soortbepaling toe te passen. Een gedeelte van de monsters was aangeleverd als oor, stukje van het oor, staart, of stukje van de staart, waardoor de soort bepaald is op basis van kennis van de plaagdierbeheersers in kwestie. Tevens zijn er dieren verzameld en gebruikt welke gevangen zijn met behulp van EKO1000 vangsystemen. Deze dieren waren nat en soms al in (verre) staat van ontbinding, waardoor het lastig is om de soort met zekerheid visueel te bepalen.

In het huidige onderzoek werd er verwacht dat er voor de huismuizen met mutaties meer clustering per postcodegebied zou zijn dan bij de bruine rat. Dit lijkt echter niet het geval. Wat tevens interessant is om te vermelden is het aantal niet-huismuizen dat ingezameld is, zeker gezien het feit dat de meeste monsters binnengekomen zijn via gecertificeerde, professionele bestrijders. In sommige gevallen leken de muizen qua uiterlijk ook op huismuizen, en in andere gevallen was duidelijk te zien dat het om andere soorten ging zoals bijvoorbeeld de bosmuis (ruim 140 exemplaren), woelmuis, of spitsmuis. Helaas is er geen test om resistentie bij bosmuizen of andere muizen dan huismuizen te testen, en zijn de muizen die geen huismuis waren, geclassificeerd als 'niet detecteerbaar'.

Onderzoek heeft aangetoond dat het gebruiken van rodenticiden binnenshuis, de enige manier binnen het gebruik van rodenticiden is om blootstelling aan niet-doeldieren te minimaliseren. Bij buitengebruik van rodenticiden was de concentratie van rodenticiden in niet-doeldieren bijna 50% hoger dan bij de niet-doeldieren binnen (Walther, Geduhn, Schenke, Schlötelburg, & Jacob, 2021). In Engeland komt de bosmuis ook vaak binnenshuis voor, in een onderzoek uit 2007 kwam naar voren dat 77% van de binnenshuis gevangen muizen in de UK, bosmuizen waren (Davies & Anderson, 2013). Er zijn meerdere onderzoeken waarin beschreven wordt dat er residuen van rodenticiden in andere muizensoorten aangetroffen is, met daarbij de bevinding dat de hoogste concentraties van rodenticiden residuen in de bosmuis worden gevonden (Brakes & Smith, 2005; Geduhn, Esther, Schenke, Mattes, & Jacob, 2014; Tosh et al., 2012). Dit geeft aan dat het lokaas/gif dat gebruikt wordt, aantrekkelijke voeding is voor de bosmuis. Ook zijn er residuen van rodenticiden in bosmuizen gevonden op locaties waar geen gif gebruikt wordt, wat aangeeft dat bosmuizen zich snel en over relatief grote afstanden verspreiden (Tosh et al., 2012). Dit betekent ook dat er een groot risico is op doorvergiftiging naar roofdieren/vogels en aaseters (Elmeros et al., 2019). Met het gebruik van rodenticiden voor muizen is er dus een groot risico om niet-doeldieren te bereiken. Zodoende is het dus altijd van belang om eerst uit te zoeken welk dier aanwezig is en overlast veroorzaakt, voordat men overgaat tot bestrijding/inzet van rodenticiden. Daarnaast verdient het de aanbeveling om ook bij muizen de bestrijding door gekwalificeerd personeel te laten uitvoeren. Zeker omdat rodenticiden tegen muizen nog vrij in de winkel voor particulieren te koop is, met de reële kans dat het middel niet conform gebruiksvoorschriften is toegepast. Onderzoek gaf aan dat in particulieren in 2019 rond de 330.000 verpakkingen met rodenticiden kochten (Komen & Wezenbeek, 2021). In een volgende monitoring zouden huismuizen zeker nog meer aandacht moeten krijgen.

Referenties

- Blažič, T., Jokić, G., Götz, M., Esther, A., Vukša, M., & Đedović, S. (2018). Brodifacoum as a first choice rodenticide for controlling bromadiolone-resistant *Mus musculus*. *Journal of Stored Products Research*, 79, 29-33.
- Brakes, C. R., & Smith, R. H. (2005). Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. *Journal of Applied Ecology*, 42(1), 118-128. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2005.00997.x>
- Buckle, A., Endepols, S., Klemann, N., & Jacob, J. (2013). Resistance testing and the effectiveness of difenacoum against Norway rats (*Rattus norvegicus*) in a tyrosine139cysteine focus of anticoagulant resistance, Westphalia, Germany. *Pest Management Science*, 69(2), 233-239.
- Buckle, A. P., Jones, C. R., Rymer, D. J., Coan, E. E., & Prescott, C. V. (2020). The Hampshire-Berkshire focus of L120Q anticoagulant resistance in the Norway rat (*Rattus norvegicus*) and field trials of bromadiolone, difenacoum and brodifacoum. *Crop Protection*, 137, 105301.
- Damin-Pernik, M., Hammed, A., Giraud, L., Goulois, J., Benoît, E., & Lattard, V. (2022). Distribution of non-synonymous *Vkorc1* mutations in roof rats (*Rattus rattus*) in France and in Spain - consequences for management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105052. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105052>
- Davies, M. P., & Anderson, M. (2013). Rodenticide use in houses. *Outlooks on Pest Management*, 24(2), 70-75. doi:10.1564/v24_apr_06
- Desvars-Larrive, A., Pascal, M., Gasqui, P., Cosson, J.-F., Benoit, E., Lattard, V., . . . Teynié, A. (2017). Population genetics, community of parasites, and resistance to rodenticides in an urban brown rat (*Rattus norvegicus*) population. *PLoS one*, 12(9), e0184015.
- Duncan, B. J. M. L. (2021). A genetic investigation of anticoagulant rodenticide resistance in *Mus musculus* of Western Australia: Implications for conservation and biosecurity.
- Elmeros, M., Bossi, R., Christensen, T. K., Kjær, L. J., Lassen, P., & Topping, C. J. (2019). Exposure of non-target small mammals to anticoagulant rodenticide during chemical rodent control operations. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(6), 6133-6140. doi:10.1007/s11356-018-04064-3
- Geduhn, A., Esther, A., Schenke, D., Mattes, H., & Jacob, J. (2014). Spatial and temporal exposure patterns in non-target small mammals during brodifacoum rat control. *Science of The Total Environment*, 496, 328-338. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.049>
- Goulois, J., Chapuzet, A., Lambert, V., Chatron, N., Tchertanov, L., Legros, L., . . . Lattard, V. (2016). Evidence of a target resistance to antivitamin K rodenticides in the roof rat *Rattus rattus*: identification and characterisation of a novel Y25F mutation in the *Vkorc1* gene. *Pest Management Science*, 72(3), 544-550. doi:<https://doi.org/10.1002/ps.4020>
- Gryseels, S., Leirs, H., Makundi, R., & Goüy de Bellocq, J. (2015). Polymorphism in *vkorc1* gene of natal multimammate Mice, *Mastomys natalensis*, in Tanzania. *Journal of Heredity*, 106(5), 637-643.
- Haniza, M. Z., Adams, S., Jones, E. P., MacNicol, A., Mallon, E. B., Smith, R. H., & Lambert, M. S. (2015). Large-scale structure of brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in England: effects on rodenticide resistance. *PeerJ*, 3, e1458.
- Hedrick, P. W. (2013). Adaptive introgression in animals: examples and comparison to new mutation and standing variation as sources of adaptive variation. *Molecular ecology*, 22(18), 4606-4618.
- Heiberg, A.-C., Leirs, H., & Siegismund, H. R. (2006). Reproductive success of bromadiolone-resistant rats in absence of anticoagulant pressure. *Pest Management Science*, 62(9), 862-871. doi:<https://doi.org/10.1002/ps.1249>
- Ishizuka, M., Tanikawa, T., Tanaka, K. D., Heewon, M., Okajima, F., Sakamoto, K. Q., & Fujita, S. (2008). Pesticide resistance in wild mammals-Mechanisms of anticoagulant resistance in wild rodents. *The Journal of toxicological sciences*, 33(3), 283-291.
- Jacob, J., Endepols, S., Pelz, H.-J., Kampling, E., Cooper, T. G., Yeung, C. H., . . . Schlatt, S. (2012). Vitamin K requirement and reproduction in bromadiolone-resistant Norway rats. *Pest Management Science*, 68(3), 378-385. doi:10.1002/ps.2273
- Jacob, J., & Freise, J. F. (2011). Food choice and impact of food sources from farms on blood coagulation in rodenticide resistant Norway rats. *Crop Protection*, 30(11), 1501-1507. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.06.009>
- Komen, C., & Wezenbeek, J. (2021). Particulier gebruik van rodenticiden en middelen tegen groene aanslag.
- Li, T., Chang, C.-Y., Jin, D.-Y., Lin, P.-J., Khvorova, A., & Stafford, D. W. (2004). Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature*, 427(6974), 541-544.
- Liu, K. J., Steinberg, E., Yozzo, A., Song, Y., Kohn, M. H., & Nakhleh, L. (2015). Interspecific introgressive origin of genomic diversity in the house mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(1), 196-201. doi:10.1073/pnas.1406298111

- Marquez, A., Abi Khalil, R., Fourel, I., Ovarbury, T., Pinot, A., Rosine, A., . . . Benoit, E. (2019). Resistance to anticoagulant rodenticides in Martinique could lead to inefficient rodent control in a context of endemic leptospirosis. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- McGee, C. F., McGilloway, D. A., & Buckle, A. P. (2020). Anticoagulant rodenticides and resistance development in rodent pest species – A comprehensive review. *Journal of Stored Products Research*, 88, 101688. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ispr.2020.101688>
- Meerburg, B. G., van Gent-Pelzer, M. P., Schoelitsz, B., & van der Lee, T. A. (2014). Distribution of anticoagulant rodenticide resistance in *Rattus norvegicus* in the Netherlands according to Vkorc1 mutations. *Pest Management Science*, 70(11), 1761-1766.
- Mooney, J., Lynch, M. R., Prescott, C. V., Clegg, T., Loughlin, M., Hannon, B., . . . Faulkner, R. (2018). VKORC1 sequence variants associated with resistance to anticoagulant rodenticides in Irish populations of *Rattus norvegicus* and *Mus musculus domesticus*. *Scientific reports*, 8(1), 1-6.
- Oldenburg, J., Bevans, C. G., Fregin, A., Geisen, C., Müller-Reible, C., & Watzka, M. (2007). Current pharmacogenetic developments in oral anticoagulation therapy: the influence of variant VKORC1 and CYP2C9 alleles. *Thrombosis and haemostasis*, 98(09), 570-578.
- Pelz, H.-J., Rost, S., Hünerberg, M., Fregin, A., Heiberg, A.-C., Baert, K., . . . Oldenburg, J. (2005). The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*, 170(4), 1839-1847.
- Pelz, H. J., Rost, S., Müller, E., Esther, A., Ulrich, R. G., & Müller, C. R. (2012). Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. *Pest Management Science*, 68(2), 254-259.
- Rost, S., Pelz, H.-J., Menzel, S., MacNicoll, A. D., León, V., Song, K.-J., . . . Müller, C. R. (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(1), 1-9.
- Sanyaolu, A. O., Oremosu, A. A., Osinubi, A. A., Vermeer, C., & Daramola, A. O. (2019). Warfarin-induced vitamin K deficiency affects spermatogenesis in Sprague-Dawley rats. *Andrologia*, 51(10), e13416. doi:<https://doi.org/10.1111/and.13416>
- Song, Y., Endepols, S., Klemann, N., Richter, D., Matuschka, F.-R., Shih, C.-H., . . . Kohn, M. H. (2011). Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between old world mice. *Current Biology*, 21(15), 1296-1301.
- Takeda, K., Ikenaka, Y., Tanikawa, T., Tanaka, K. D., Nakayama, S. M., Mizukawa, H., & Ishizuka, M. (2016). Novel revelation of warfarin resistant mechanism in roof rats (*Rattus rattus*) using pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 134, 1-7.
- Tanaka, K. D., Kawai, Y. K., Ikenaka, Y., Harunari, T., Tanikawa, T., Ando, S., . . . Ishizuka, M. (2012). The genetic mechanisms of warfarin resistance in *Rattus rattus* found in the wild in Japan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(2), 144-151.
- Tosh, D. G., McDonald, R. A., Bearhop, S., Llewellyn, N. R., Ian Montgomery, W., & Shore, R. F. (2012). Rodenticide exposure in wood mouse and house mouse populations on farms and potential secondary risk to predators. *Ecotoxicology*, 21(5), 1325-1332. doi:10.1007/s10646-012-0886-3
- van Blaaderen, H., & Bode, A. (1989). Resistentie tegen anticoagulantia bij de bruine rat in Twente. *Rat en Muis*, 37, 1-37.
- Walther, B., Geduhn, A., Schenke, D., Schlötelburg, A., & Jacob, J. (2021). Baiting location affects anticoagulant rodenticide exposure of non-target small mammals on farms. *Pest Management Science*, 77(2), 611-619. doi:<https://doi.org/10.1002/ps.5987>
- Wilms, E., Veldkamp, R., Van Meegen, E., & Touw, D. (2006). Partiële acenocoumarol-en fenprocoumonresistentie door enzym polymorfisme. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, 150(38), 2095-2098.
- Zhelev, G. G., Koev, K. P., Dimitrov, V. D., & Petrov, V. S. (2019). Anticoagulant resistance in synanthropic rodents in the Stara Zagora region, Bulgaria. *Macedonian Veterinary Review*, 42(1), 61-70.

Bijlage 1.

Overzicht van het aantal onderzochte huismuizen per driecijferig postcodegebied en het voorkomen van de verschillende mutaties. Verklaring: tyr-cys = Duitse mutatie heterozygoot, cys-cys = Duitse mutatie homozygoot.

Postcode (3cijfers)	# monsters	wildtype	tyr-cys	cys-cys
101	4	4		
104	2	2		
106	1	1		
107	4	4		
109	1	1		
109	5	5		
111	21	21		
117	3	2	1	
121	3	3		
131	3		2	1
131	22	14	8	
132	1		1	
133	2	1		1
135	3	3		
135	4	1	3	
135	1	1		
150	1		1	
154	1	1		
179	14		5	9
181	1	1		
194	1	1		
202	3		2	1
224	1			1
241	2	2		
280	9	9		
301	2		1	1
303	4	3		1
305	2	1	1	
306	1	1		
308	5	3	2	
325	2	2		
329	2	1	1	
335	1	1		
351	82	66	16	

Postcode (3cijfers)	# monsters	wildtype	tyr-cys	cys-cys
353	7	6	1	
354	1	1		
356	4	4		
358	63	20	30	13
370	1	1		
373	1	1		
376	1	1		
377	4	1	3	
378	3			3
381	10	10		
382	1	1		
386	7	4	2	1
419	1			1
432	1		1	
452	1	1		
461	2			2
481	5	2	3	
483	1		1	
492	1	1		
503	1		1	
522	3	1		2
528	1	1		
546	1	1		
552	7	5	2	
561	2	1		1
562	2	1	1	
563	1	1		
616	2	2		
621	2		2	
622	1	1		
626	1			1
641	1	1		
644	4	4		
652	1			1
670	1	1		
671	1	1		
674	1		1	
681	4	3		1
772	1	1		
788	1		1	
822	1			1

Postcode (3cijfers)	# monsters	wildtype	tyr-cys	cys-cys
822	4	1	2	1
830	6	3	3	
831	1	1		
832	5		2	3
834	1	1		
871	1		1	
936	3	2	1	
944	1	1		
950	1		1	
966	1	1		
967	3	1	2	
972	1	1		
Totaal	397	246	105	46

Bijlage 2.

Overzicht van het aantal onderzochte bruine ratten per driecijferig postcodegebied en het voorkomen van de verschillende mutaties. Verklaring: tyr-cys = Duitse mutatie heterozygoot, cys-cys = Duitse mutatie homozygoot, tyr-phe = Franse mutatie heterozygoot, phe-phe = Franse mutatie homozygoot.

Postcode (3cijfers)	# monsters	wildtype	tyr-cys	tyr-phe	cys-cys	phe-phe
103	1	1				
105	52	52				
107	63	63				
109	6	6				
101	15	15				
104	4	4				
106	11	11				
117	1	1				
132	1	1				
135	6	6				
139	1	1				
150	1	1				
160	1	1				
174	1		1			
179	23	23				
181	197	174	21	1	1	
184	1	1				
191	1	1				
201	1	1				
224	1	1				
233	1	1				
290	1	1				
296	4	4				
297	1	1				
298	14	7	5		2	
301	13	12	1			
302	12	10	2			
303	8	8				
304	3	2	1			
306	29	25	3		1	
307	34	23	8		3	
308	2		2			
319	2	1	1			
322	12	11	1			

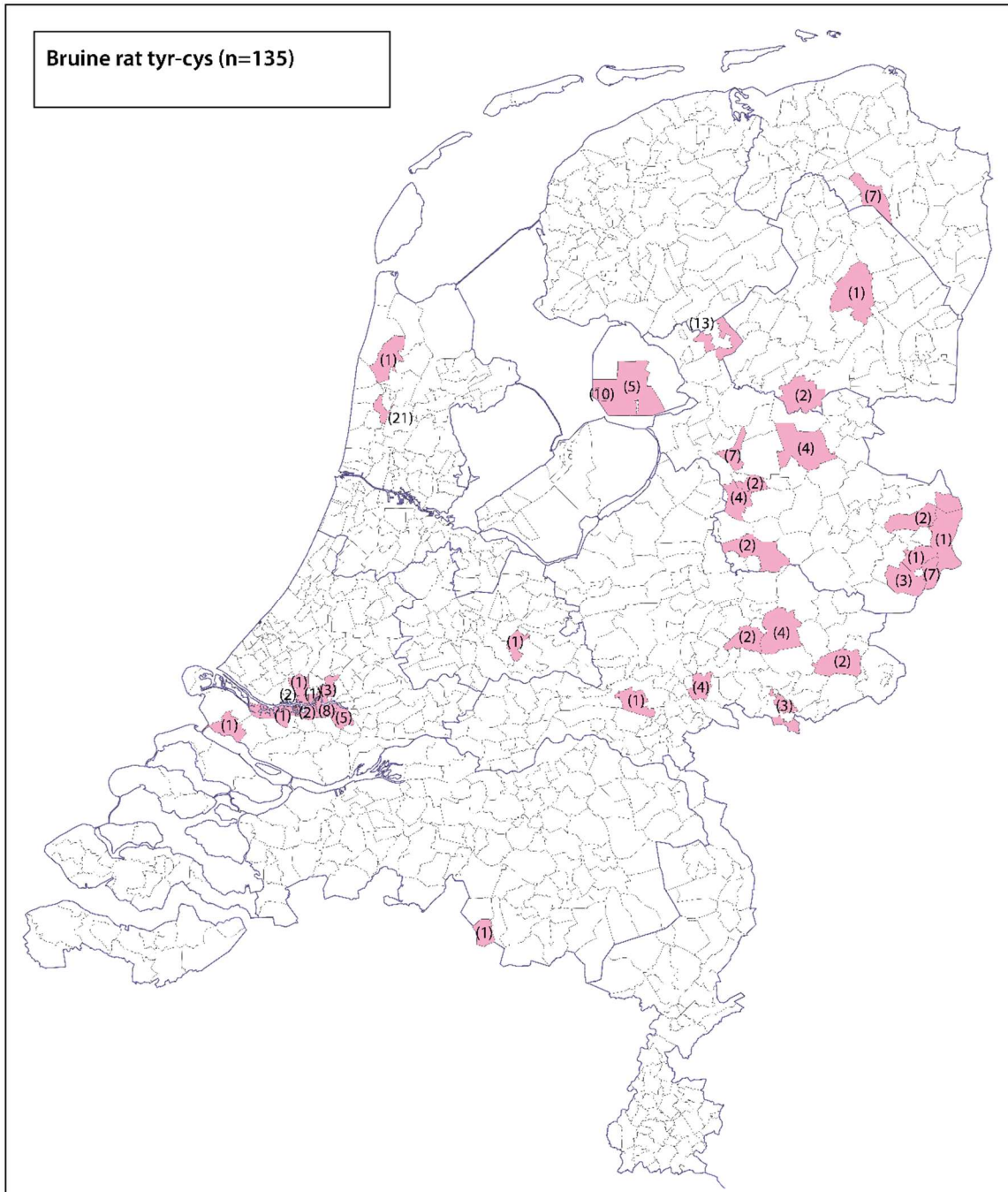
Postcode (3cijfers)	# monsters	wildtype	tyr-cys	tyr-phe	cys-cys	phe-phe
325	9	9				
326	16	16				
332	4	4				
354	1	1				
381	2	2				
388	7	7				
390	35	35				
394	11	11				
395	1	1				
397	4	3	1			
398	1	1				
400	2	2				
401	1	1				
402	3	3				
403	1	1				
406	1	1				
420	1	1				
424	4	4				
430	10	10				
432	3	3				
435	15	15				
436	7	7				
443	60	60				
444	4	4				
445	37	37				
447	1	1				
452	4	4				
453	4	4				
454	45	44		1		
456	10	10				
461	1	1				
471	2	2				
480	2	2				
481	6	6				
482	0					
483	1			1		
484	0					
488	1	1				
490	0					
505	1	1				
532	1	1				

Postcode (3cijfers)	# monsters	wildtype	tyr-cys	tyr-phe	cys-cys	phe-phe
543	2	2				
552	17	7		7		3
554	1		1			
573	1	1				
598	4	1		3		
599	1			1		
601	4	1		3		
604	1	1				
608	22	2		6		14
609	5	1		1		3
615	3	3				
616	1	1				
622	6	6				
641	2	2				
643	2	2				
652	3	3				
653	16	16				
654	21	21				
656	2	2				
662	7	7				
665	2	2				
666	20	15		5		
667	4	3	1			
670	9	7		2		
671	3	3				
692	8	3	4		1	
707	6	3	3			
713	6	1	2		3	
715	1	1				
722	2		2			
725	5	1	4			
743	2		2			
745	1				1	
748	4				4	
751	1	1				
752	3	2	1			
753	14	6	7		1	
754	8	5	3			
758	4	1	1		2	
759	7	5	2			
765	5	3			2	

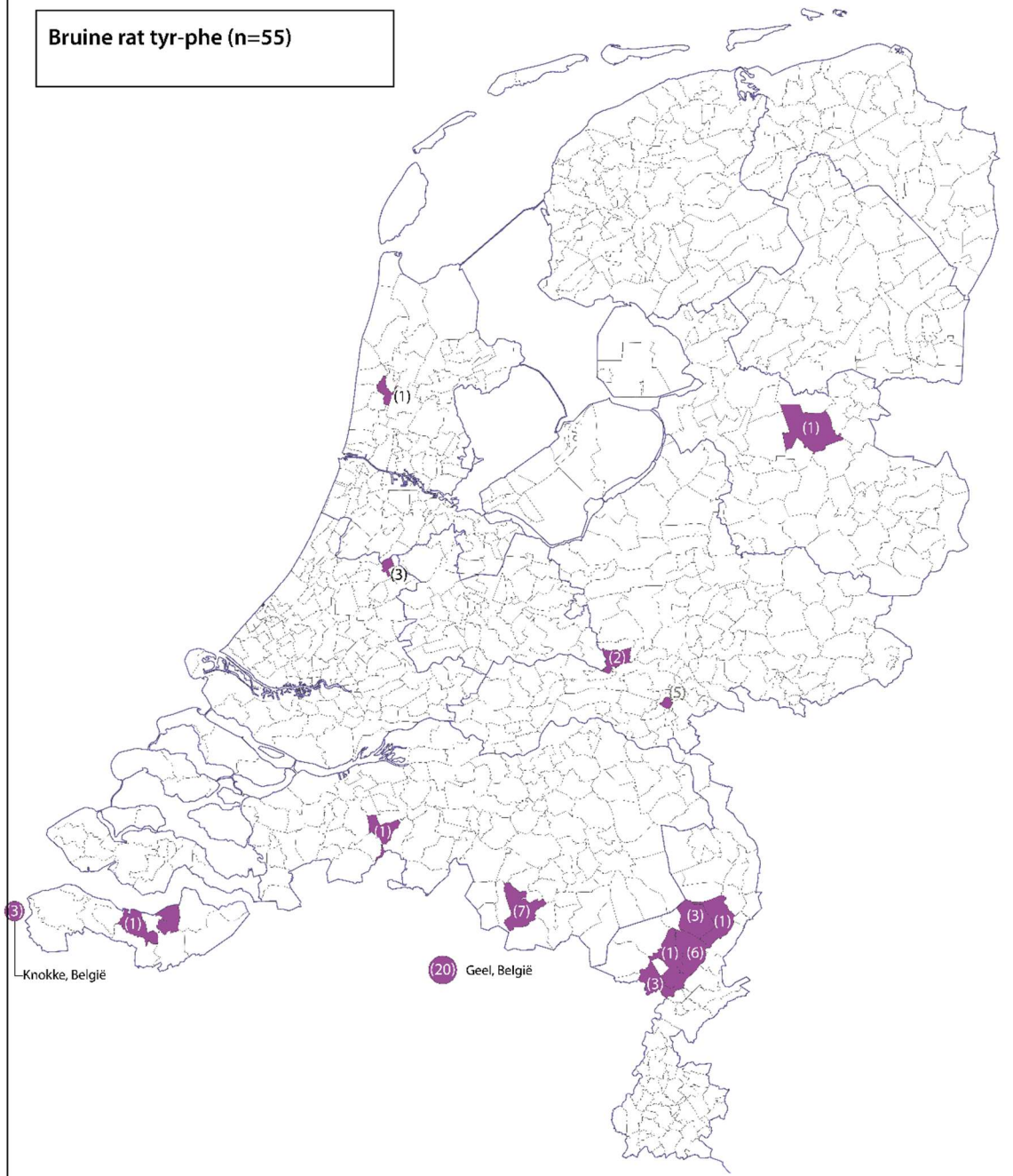
Postcode (3cijfers)	# monsters	wildtype	tyr-cys	tyr-phe	cys-cys	phe-phe
773	9	4	4	1		
776	3	3				
782	4	4				
788	2	2				
792	2		2			
801	4	4				
802	53	44	7		2	
803	2	2				
804	3	2			1	
813	5		4		1	
814	4	2	2			
821	15	15				
830	7	2	5			
831	5	5				
832	48	38	10			
834	127	113	13		1	
840	1	1				
843	2	2				
848	1	1				
853	1	1				
900	2	2				
916	1	1				
944	1		1			
945	1	1				
960	12	3	7		2	
964	1	1				
966	6	6				
967	1	1				
982	1	1				
B83 (België)	45	12		20		13
B244 (België)	26	23		3		
D498 (Duitsland)	1				1	
Totaal	1448	1200	135	52	28	33

Bijlage 3.

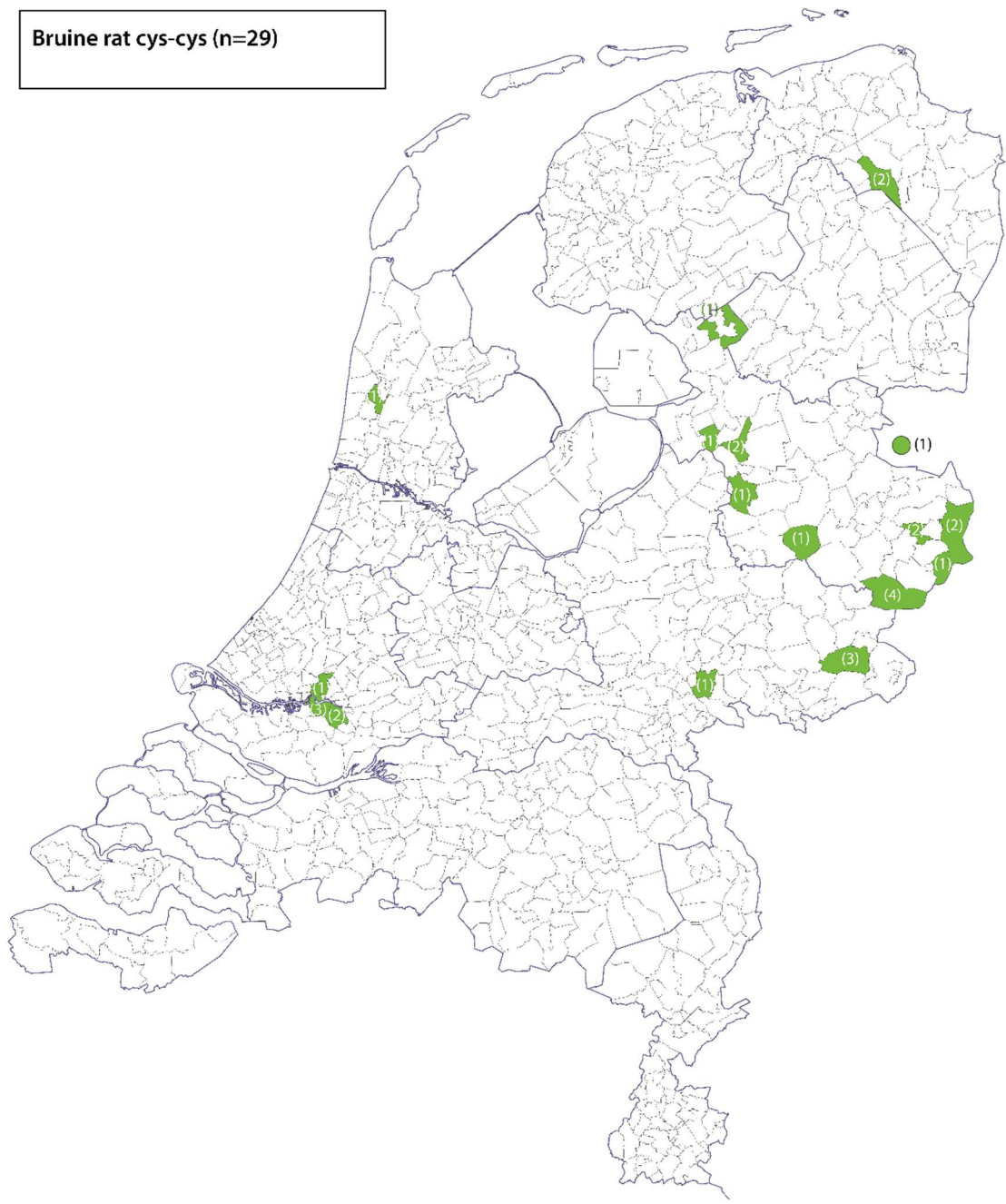
Overzicht van de mutaties bij de bruine rat op basis van driecijferige postcodegebieden. Getallen tussen haakjes geven het aantal aangetroffen mutaties van die soort binnen het tweecijferige postcodegebied.



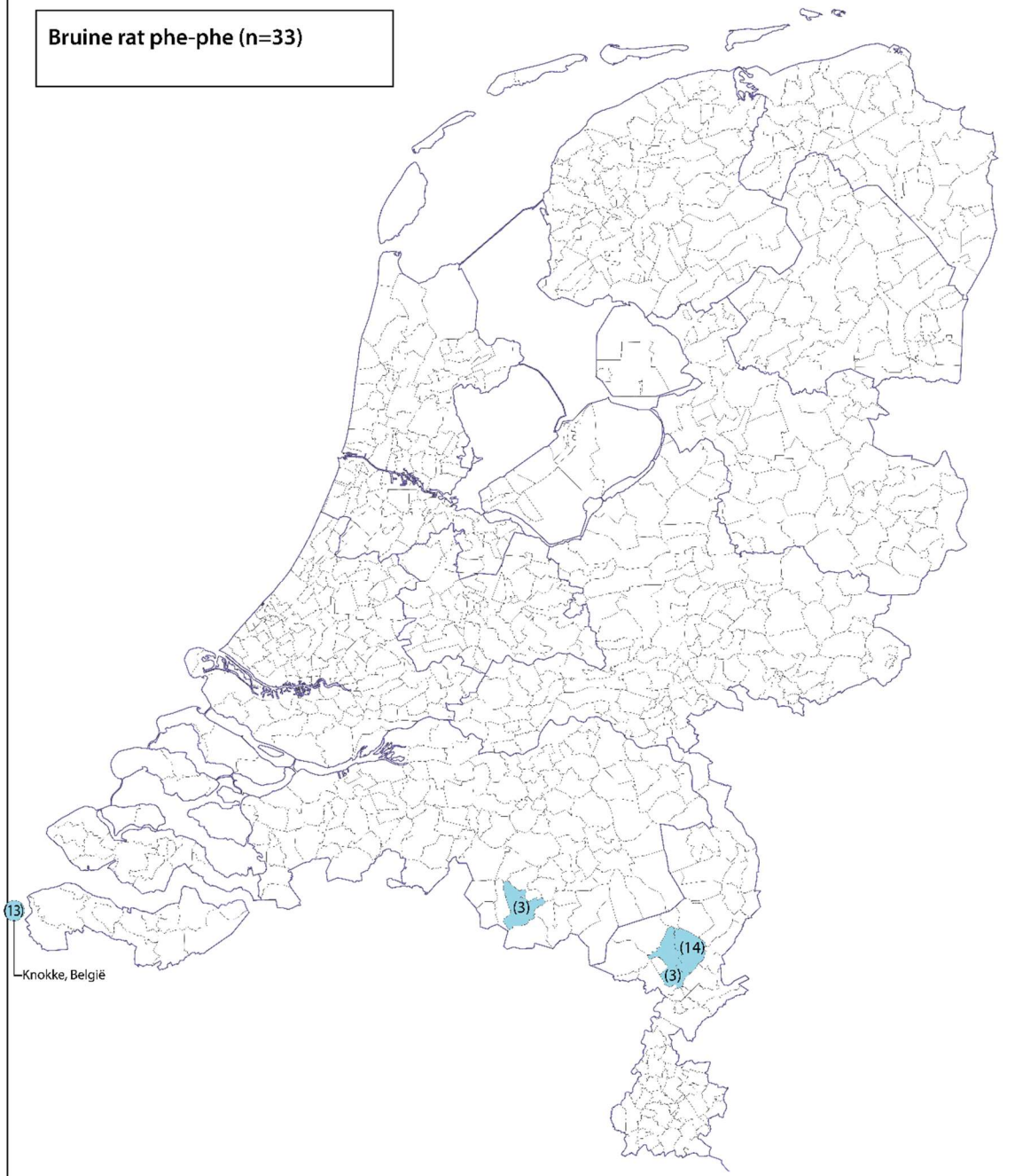
Bruine rat tyr-phe (n=55)



Bruine rat cys-cys (n=29)



Bruine rat phe-phe (n=33)



Bijlage 4.

Tabel met afkortingen van de aminozuren.

Aminozuur	3-letter afkorting	1-letter symbool
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Asparaginezuur	Asp	D
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutaminezuur	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Fenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptofaan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V