

Detección de resistencias a anticoagulantes en poblaciones de ratones urbanos

Implicaciones en la gestión



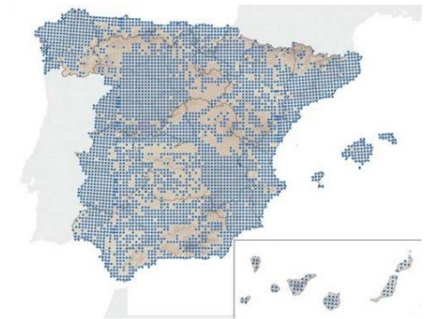
Tomás Montalvo
Agència de Salut Pública de Barcelona
 @tmontal



ANTECEDENTES



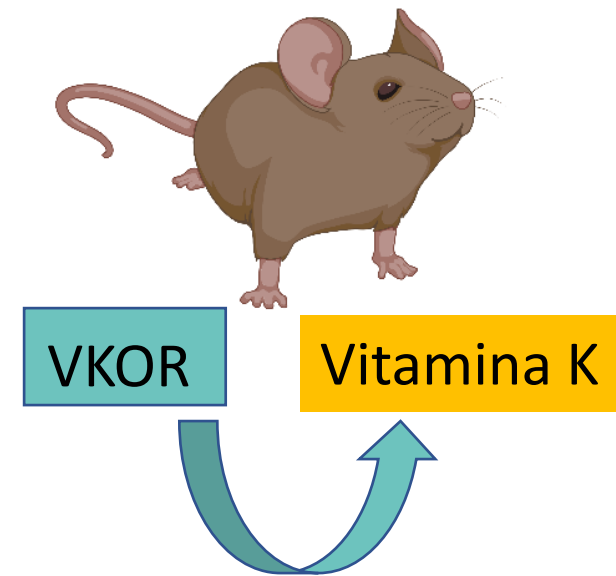
Sans-Fuentes, M. A. (2014). Ratón casero – *Mus musculus*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Barja, I. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>



ANTECEDENTES



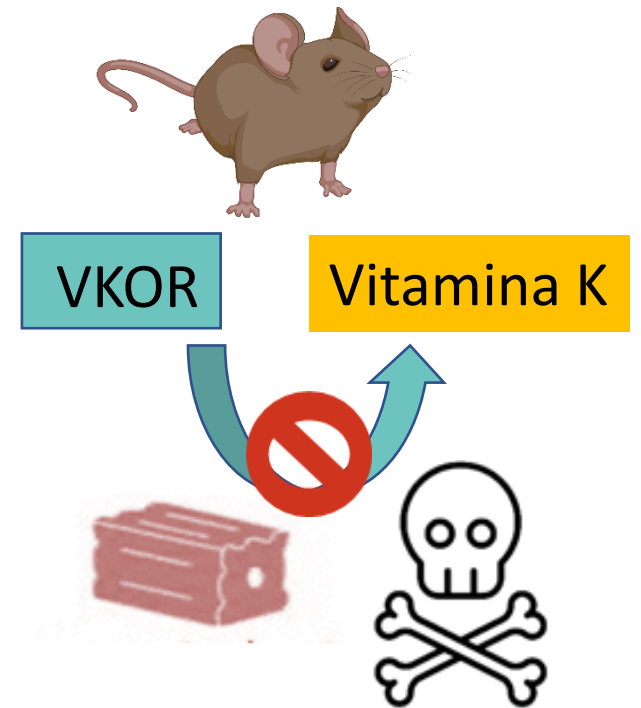
El gen VKOR interviene en el metabolismo de la vitamina K



ANTECEDENTES



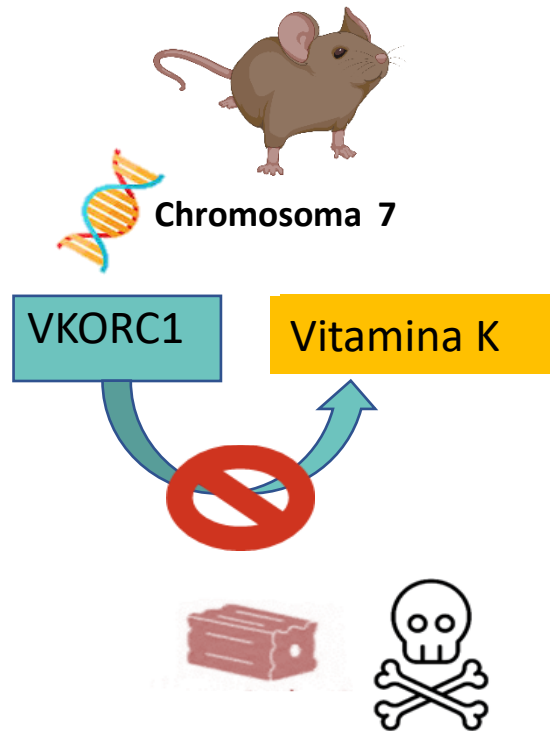
Los rodenticidas anticoagulantes son los biocidas más utilizados en todo el mundo para el control de ratones



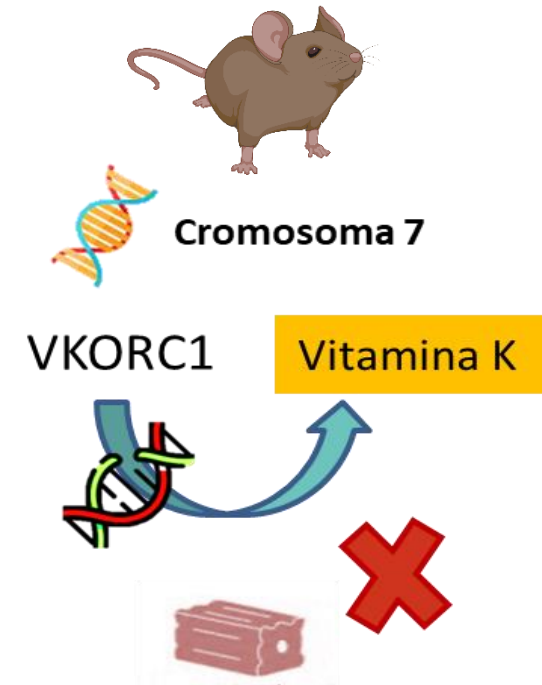
ANTECEDENTES

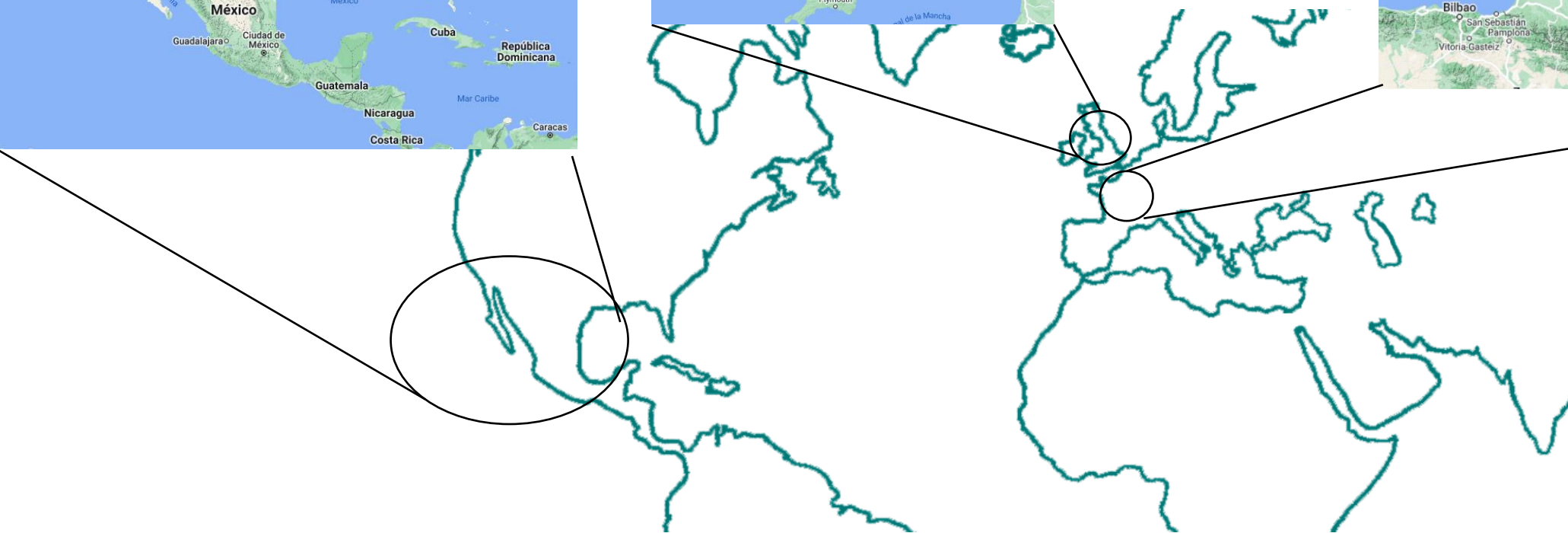
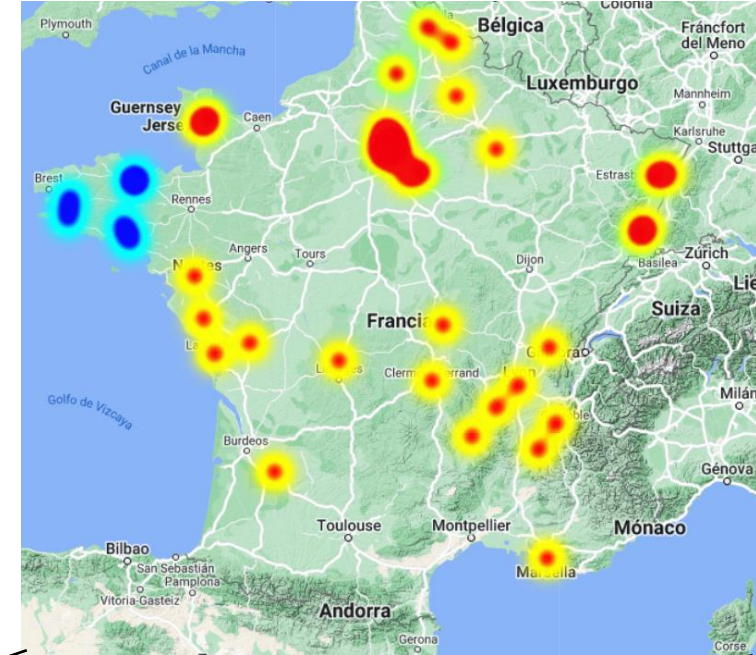
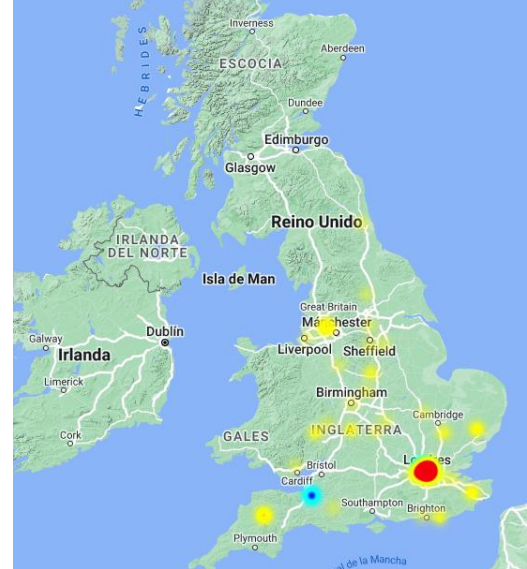
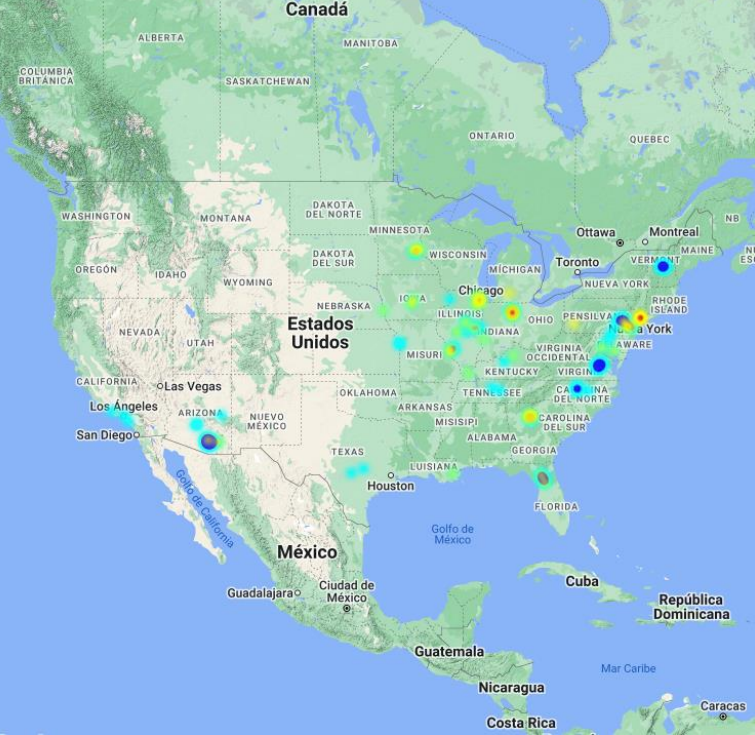


Población salvaje



Poblaciones resistentes







¿ Que está pasando en España?

¿ Porqué es importante hacer estudios?



Caracterizar las poblaciones y sus resistencias



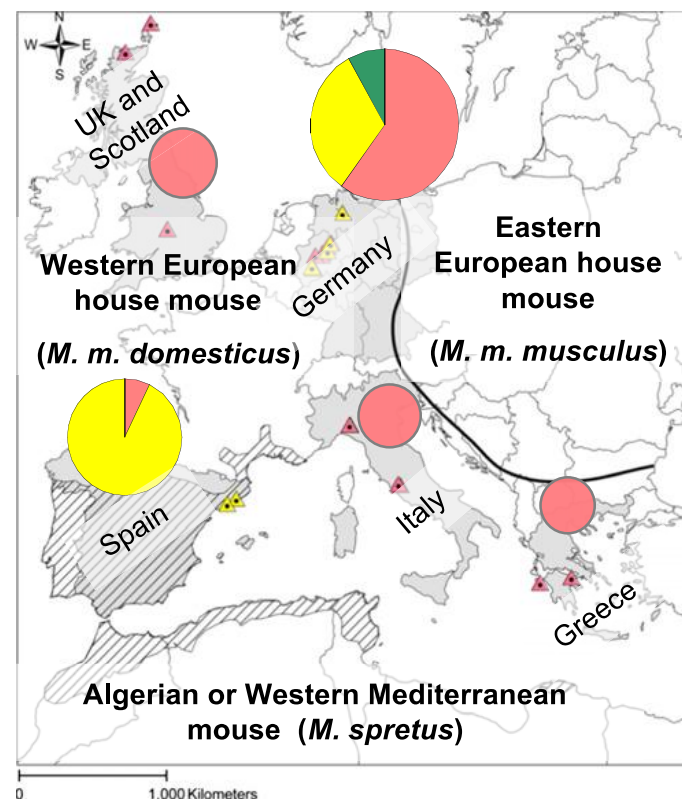
Implicaciones para la gestión

Muestras de museo de zonas rurales > 90% de individuos con mutaciones de resistencia derivadas de la introgresión con *M. spretus*

A

[illegible]

B



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.

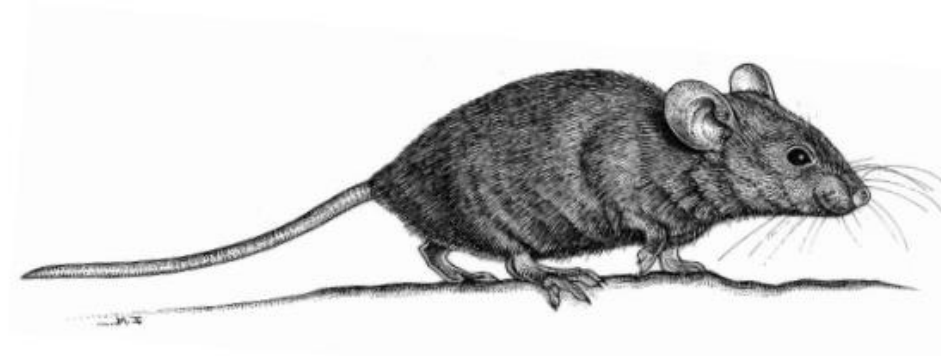
Ratón moruno

Catalán: Ratolí mediterrani | Eusquera: Landa-sagua | Gallego: Rato mouro
Alemán: Heckenhausmaus | Francés: Souris à queue courte | Inglés: Algerian mouse | Portugués: Rato-das-hortas

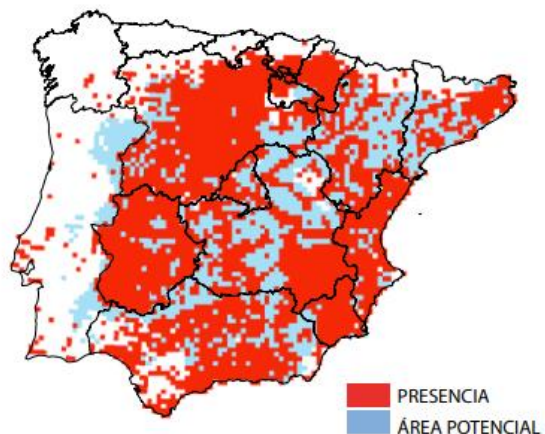


Ratón casero

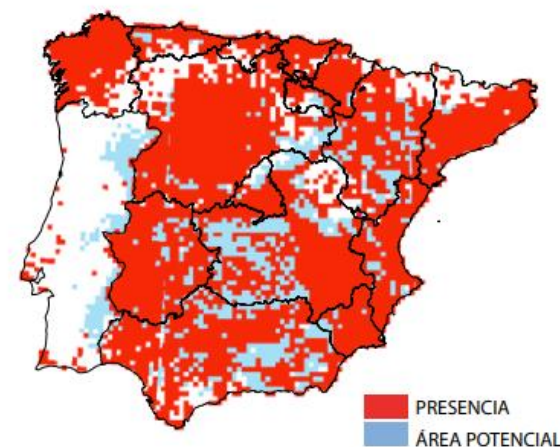
Catalán: Ratolí domèstic | Eusquera: Etxe-sagua | Gallego: Rato caseiro
Alemán: Westliche hausmaus | Francés: Souris domestique | Inglés: House mouse | Portugués: Rato-caseiro



SITUACIÓN ACTUAL



SITUACIÓN ACTUAL



Hibridación introgresiva adaptativa

Muestras de museo de zonas rurales > 90% de individuos con mutaciones de resistencia derivadas de la introgresión con *M. spretus*

A

		nucleotide position in <i>vkorc1</i>																		1	2	3	4	5	6	N=106				
		7	1	1	1	2	2	2	4	4	5	5	5	6	6	6	6	6	6	Germany (N=50)	Spain-1 (N=15)	Spain-2 (N=14)	Italy (N=9)	Greece (N=7)	United Kingdom incl. Scotland (N=11)					
		0	1	4	7	0	1	1	1	3	4	6	6	2	3	3	3	8	8											
		exon 1					exon 2		exon 3	3' UTR																				
C57BL/6J		C	G	A	G	C	G	G	T	A	A	C	A	C	C	C	A	G												
1	<i>vkorc1^{dom}</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.		14		2	9	7						
2		.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.		6					6					
3		.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		5					3					
4		.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		4										
5		.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.							2					
6		.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1											
7	?	.	.	.	.	.	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	4											
8		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	2		7								
9		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1											
10		.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			5									
11		.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	G	-	-	-	T	.	1											
12		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	G				T	.	5											
13		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	G				T	.	2											
14	<i>vkorc1^{sr}</i>	Y	K	G	A	.	.	T	.	.	.	.	.				.	.			1									
15		.	T	G	.	.	.	.	.	.	G	T	G	-	-	-	C	C		1										
16		Y	T	G	R	.	.	.	.	.	.	T	G	-	-	-	.	.		1										
17		T	T	G	A	.	.	.	.	.	.	T	G	-	-	-	T	.			1									
18		.	T	G	R	.	.	T	.	.	R	T	G	-	-	-	T	.			1									
19		Y	T	G	R	.	.	T	.	.	.	T	G	-	-	-	T	.			1									
20		T	T	G	A	.	.	T	.	.	.	T	G	-	-	-	T	.												
<i>M. spretus</i>		T	T	G	A	.	.	T	.	.	.	T	G	-	-	-	T	.	4	6										
		----- n.a. -----																												
		R12W	A26S	E37E	A48T	R58G*	W59L	R61L	L128S*	Y139C/S*																				
		amino-acid variants known to occur and/or identified																												

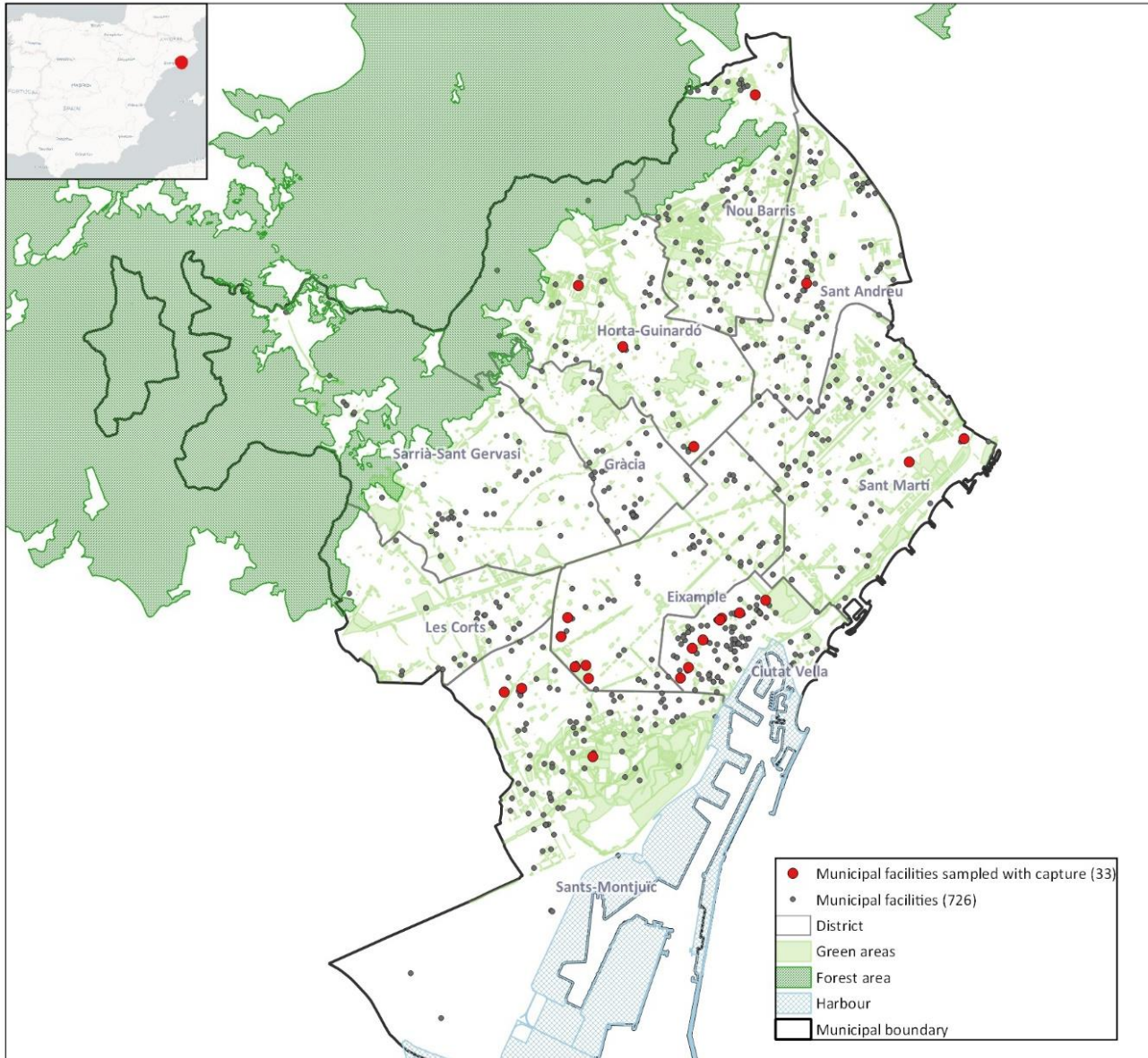
Objetivo

Identificar las mutaciones presentes en el gen *Vkorc1*

Analizar la diversidad y frecuencia asociadas en *M. musculus domesticus* en la ciudad de Barcelona



Diseño



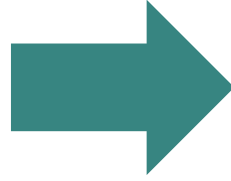
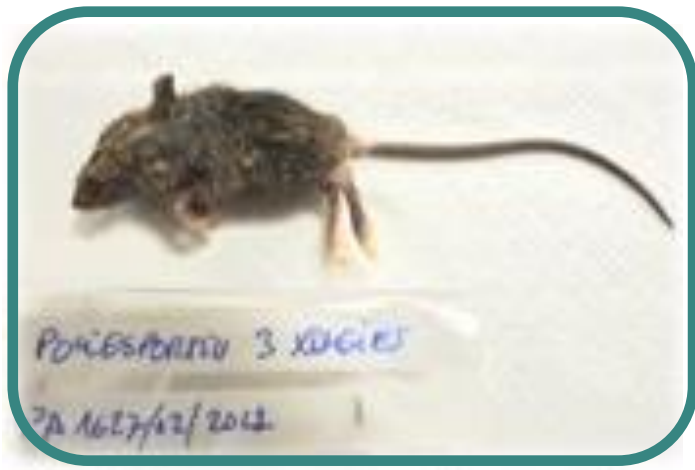
726 equipamientos municipales



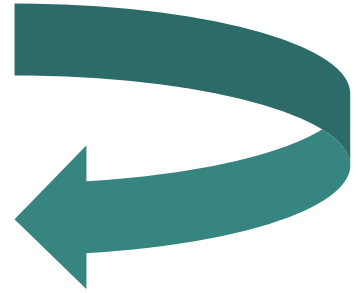
33 equipamientos con capturas



111 ejemplares capturados



**Extracción
ADN**



Confirmación biométrica y molecular de la sp mediante COI



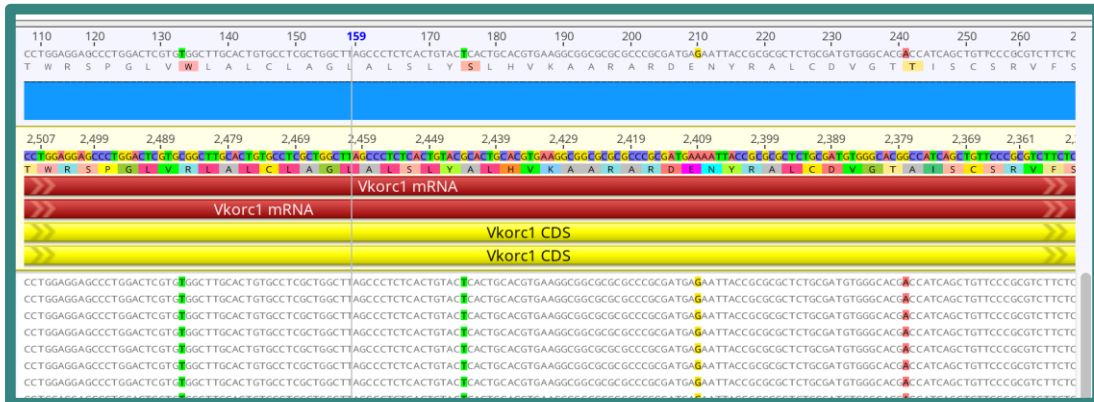
Amplificación de los exones 1, 2 y 3 del gen Vkorc1



Secuenciación



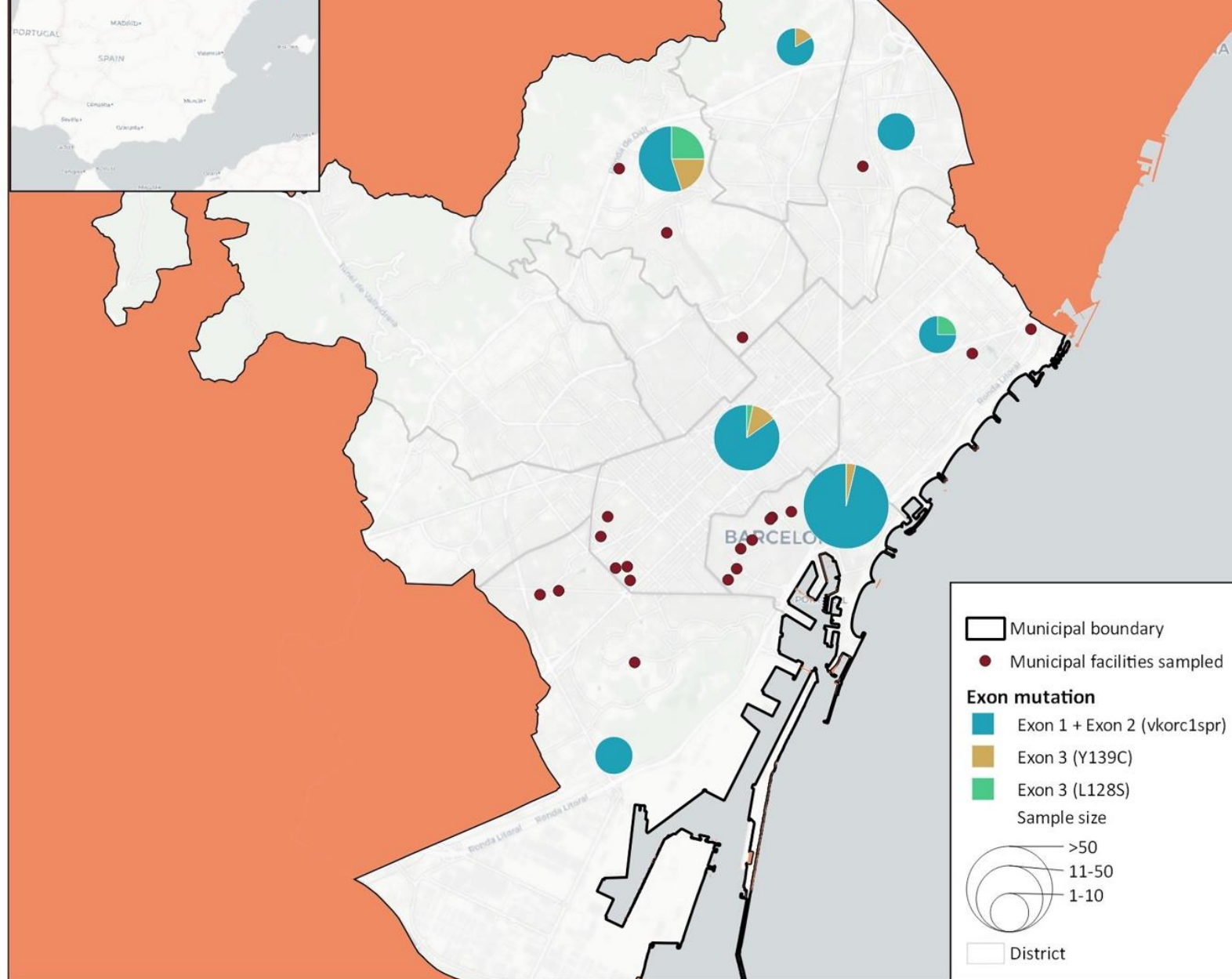
Análisis de polimorfismos



RESULTADOS

Exón	Mutaciones	Frecuencia
Exón 1	Arg12Trp	0.865
	Ala26Ser	0.901
	Glu37Glu	0.901
	Ala48Thr	0.865
Exón 2	Arg61Leu	0.856
Exón 3	Leu128Ser	0.050
	Tyr139Cys	0.086

- ✓ Detectamos **7 mutaciones** diferentes:
 - 4 mutaciones en exón 1
 - 1 mutación exón 2
 - 2 mutaciones en exón 3
- ✓ La frecuencia de las mutaciones varió en función del exón:
 - 94,60 % al menos 1 mutacion en exón 1
 - 85,59 % al menos 1 mutacion en exón 2
 - 13,5 % al menos una mutacion en exón 3
- ✓ 6 de las mutaciones conducen a cambios en aminoácidos ya descritas con anterioridad, y presentan resistencias a anticoagulantes de 1ª y 2ª generacion



**94,6% llevan introgresión
en el exón 1/2
(*Vkorc1^{spr}*)**

**13,5% portan una mutación
en el exón 3**

RESULTADOS

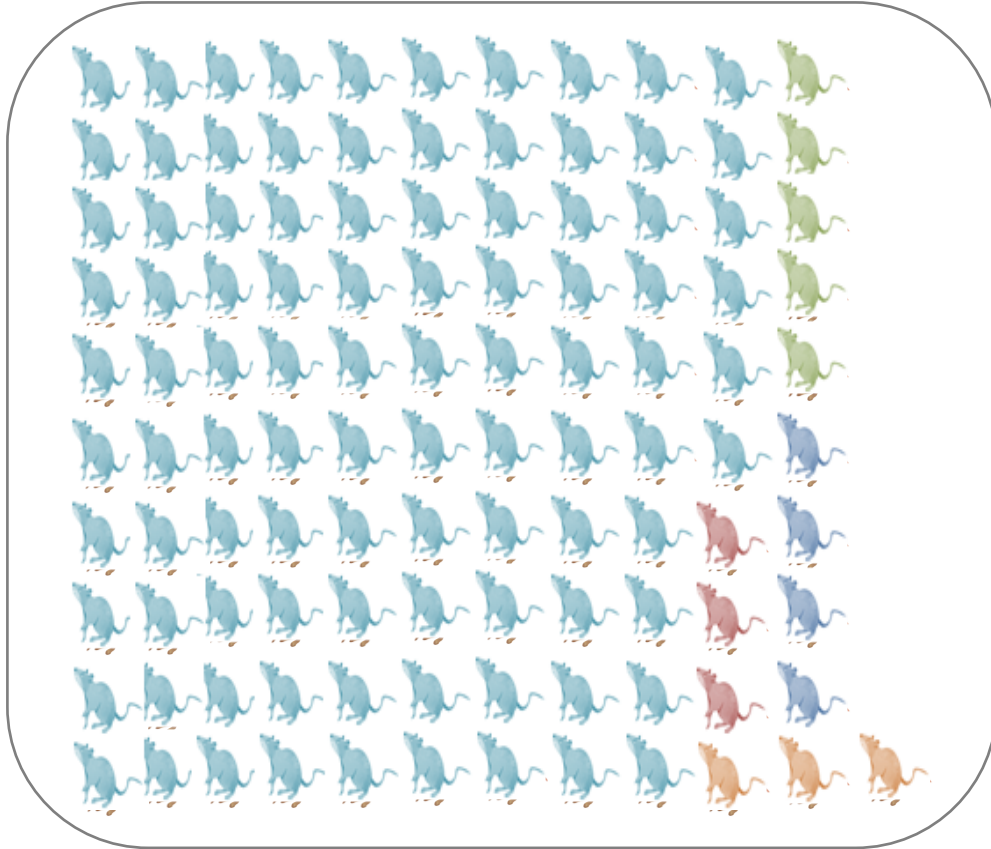
	Arg12Trp	Ala26Ser	Glu37Glu	Ala48Thr	Arg61Leu	Leu128Ser	Tyr139Cys
VkorC _{spr}	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Wild	Wild
Genotipo 2	He	He	He	He	Wild	Wild	Ho
Genotipo 3	He	He	He	He	Wild	Wild	Wild
Genotipo 4	He	He	He	He	Wild	Ho	Wild
Genotipo 5	Wild	Wild	Wild	Wild	Wild	Wild	Ho
Genotipo 6	Wild	Wild	Wild	Wild	Wild	He	He
Genotipo 7	Wild	Ho	Ho	Wild	Ho	Wild	Wild
Genotipo 8	He	Ho	Ho	He	Ho	Wild	Wild

✓ Encontramos por primera vez la combinación que incluía la introgresion y alguna mutacion en exón 3 (Leu128ser o Tyr139cys)

✓ Detectamos **8 genotipos**:

- 80 % homocigotos para las 5 mutaciones del exón 1 y 2
 - fenotipo muy resistente
 - asociados a la introgresion adaptativa

Todos los ratones tienen al menos una mutación



111 ejemplares



	96 ud	Introgresión
	3 ud	Y139C
	5 ud	Intro + Y139C
	4 ud	Intro + L128S
	3 ud	Y139C + L128S

La resistencia a varios rodenticidas está asociada a las mutaciones encontradas

	Introgresión	Bromadiolona	Difenacoum	Brodifacoum	Flocoumafen	Difetialona
	Y139C	Bromadiolona	Difenacoum	Brodifacoum	Flocoumafen	Difetialona
	Intro+Y139C	Bromadiolona	Difenacoum	Brodifacoum	Flocoumafen	Difetialona
	Intro+L128S	Bromadiolona	Difenacoum	Brodifacoum	Flocoumafen	Difetialona
	Y139C+L128S	Bromadiolona	Difenacoum	Brodifacoum	Flocoumafen	Difetialona



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Short communication

Widespread resistance to anticoagulant rodenticides in *Mus musculus domesticus* in the city of Barcelona



María José Ruiz-López^{a,d,*}, Laura Barahona^c, Josué Martínez-de la Puente^{b,d}, Marta Pepió^c, Andrea Valsecchi^c, Víctor Peracho^c, Jordi Figuerola^{a,d}, Tomas Montalvo^{c,d}

^a Estación Biológica de Doñana – CSIC, Calle Américo Vespucio 26, E-41092 Sevilla, Spain

^b Departamento de Parasitología, Universidad de Granada, Granada, Spain

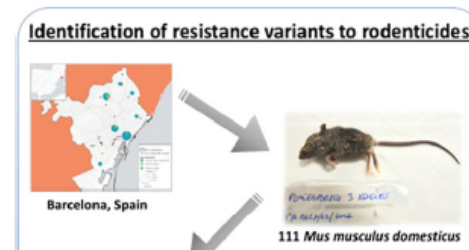
^c Agencia de Salud Pública de Barcelona, Consorci Sanitari de Barcelona, Pl. Lesseps, 1, E-08023 Barcelona, Spain

^d CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

HIGHLIGHTS

- All *Mus musculus domesticus* carried missense mutations in at least one of the exons of the *Vkorc1* gene.
- 94.60 % of individuals carried mutations in exon1 associated with past introgression events.
- Only 13.51 % of analyzed individuals presented at least one mutation in exon 3.

GRAPHICAL ABSTRACT



Implicaciones para la gestión



Utilizar alternativas a FGA, bromadiolona, difenacum, brodifacoum



Evaluar periódicamente la eficacia de los tratamientos



Estudios periódicos (cada $\frac{3}{4}$ años) de las poblaciones

Otras implicaciones



De los 366 rodenticidas autorizados en España, el 70% tienen como componente principal la bromadiolona.



Efectos colaterales: bioacumulación de rodenticida en los ratones resistentes

Alternativas

Materias activas	Número de biocidas autorizados por el Ministerio	Organismo diana	Formato
Cianuro de hidrogeno	1	rata	gas
Fosfuro de aluminio	1	rata /topillo	gas
Mazorcas de maiz en polvo	0	---	cebo
Alfacloalosa	6	ratón	cebo
Dioxido de carbono: 100%	1	ratón	gas
Colecalciferol	2	ratón/rata	cebo

Alternativas



Medidas sobre
elementos estructurales
y constructivos



Medidas higienico-
sanitarias y ambientales

**Control
integrado**



Medidas de
comportamientos y
hábitos saludables

Medidas de control directo:

- Físicos: trampas adhesivas, trampas de captura, etc
- Biológicos: no disponibles
- Químicos: biocidas autorizados



Mensaje para llevar a casa

La evaluación de la resistencia es fundamental para hacer un uso racional de los rodenticidas anticoagulantes y ayudar a proteger la salud humana, animal y medioambiental.





C S B

Consorci Sanitari
de Barcelona



Agència
de Salut Pública



Muchas gracias!



Laura Barahona
Maria Jose Ruiz-Lopez
Josué Martínez-de la Puente
Marta Pepió
Andrea Valsecchi
Victor Peracho
Jordi Figuerola
Tomas Montalvo

FGA (first generation anticoagulants): Clorofacinona, cumatetralilo, warfarina.

FGA (first generation anticoagulants): Clorofacinona, cumatetralilo, warfarina.				Exón		Mutaciones		Frecuencia	
				Exón 1					
Biocides autoritzats: Nombre de productes autoritzats:				Ut					
bromaciolona:				135	ut	cebo	Arg12Trp		0.865
brodifacum:				129	ut	cebo	Ala26Ser		0.901
difetialona:				11	ut	cebo	Glu37Glu		0.901
alfacloralosa:				6	ut	cebo	Ala48Thr		0.865
difenacum:				73	ut	cebo	Arg61Leu		0.856
Dioxido de carbono: 100%				1	ut	gas	Arg61Leu	Leu128Ser	Tyr139Cys
Cianuro de hidrogeno				1	ut	gas	Ho	Wild	Wild
Clorofacinona				3	ut	cebo	Wild	Wild	Ho
Colecalciferol				2	ut	cebo	Wild	Wild	Wild
Cumatetralilo				3	ut	cebo	Wild	Ho	Wild
Flocoumafen				3	ut	cebo	Wild	Ho	Wild
Fosfuro de aluminio				1	ut	gas	carbono		gas
				fosfuro de zinc				retirado	-
				calciferol				retirado	