



GOBIERNO  
DE ESPAÑA

MINISTERIO  
PARA LA TRANSICIÓN ECOLÓGICA



GOBIERNO  
DE ESPAÑA

MINISTERIO  
DE CIENCIA, INNOVACIÓN  
Y UNIVERSIDADES



INIA  
Instituto Nacional de Investigación  
y Tecnología Agraria y Alimentaria

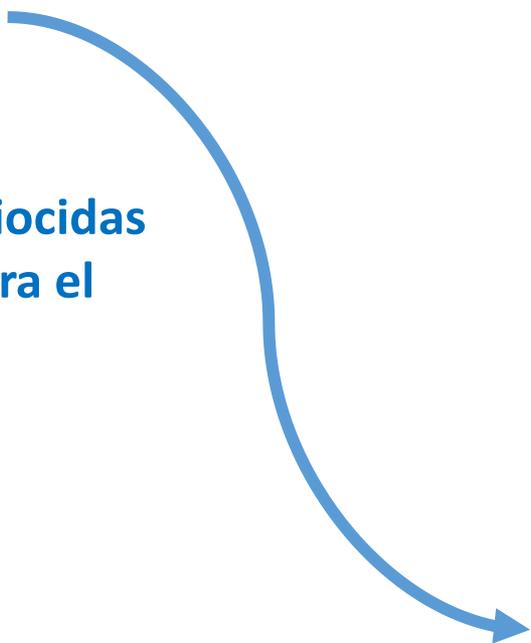
# Estudio sobre las resistencias a rodenticidas anticoagulantes en España

Azucena Bermejo-Nogales y José María Navas



**Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental y Medio Natural**

**Monitorización de sustancias biocidas para disminuir sus riesgos para el medio ambiente**



**INIA**

**Departamento de Medio Ambiente**

**Grupo de Disrupción Endocrina y Toxicidad de Contaminantes**



# Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria O.A., M.P.

## Estructura del INIA





## SUBDIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA (SGIT)





# Programa de monitorización de sustancias biocidas

## Fases:

1. Elección de sustancias activas biocidas de especial preocupación
2. Establecimiento de sistema de seguimiento para determinar presencia en zonas de interés
3. Estudio de aparición de posibles resistencias.

# Programa de monitorización de sustancias biocidas

## Fase 1. Elección de sustancias activas biocidas de especial preocupación:

Roedores: (Plaga con) efectos nocivos

Salud Pública  
Agricultura

Control

Rodenticidas anticoagulantes

Rata gris  
(*Rattus norvegicus*)



Rata negra  
(*Rattus rattus*)



Ratón  
(*Mus musculus*)

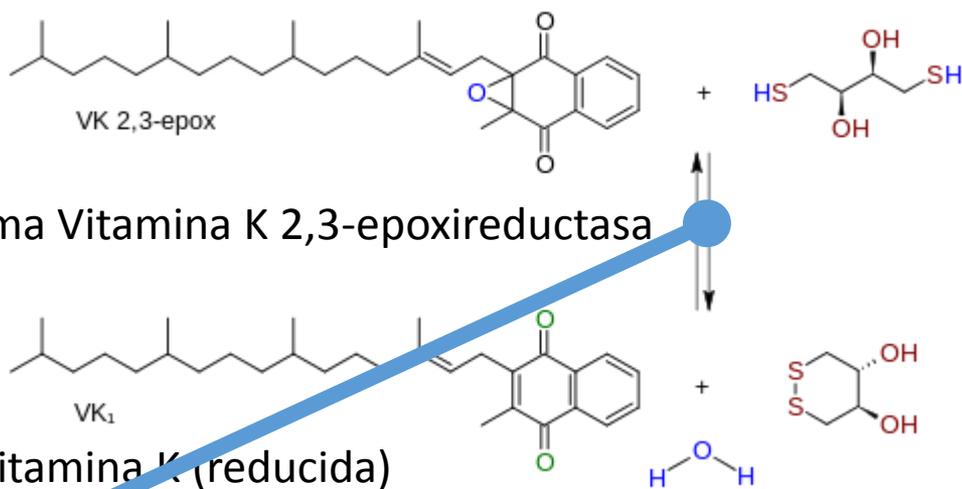


## Mecanismo de acción de los rodenticidas anticoagulantes




 Factores de Coagulación (II, VII, IX, X)

**Hemorragia Interna**  
 clotting protein



Rodenticidas anticoagulantes

## Programa de monitorización de sustancias biocidas

### Fase 1. Elección de sustancias activas biocidas de especial preocupación:

#### Rodenticidas anticoagulantes

##### Primera generación (varios días para ejercer efecto)

- Warfarina
- Clorofencinona
- Cumatretalina

##### Segunda generación (efecto en 24 h)

- Bromadiolona
- Difenacum
- Brodifacum
- Difetialona

# Programa de monitorización de sustancias biocidas

## Fase 2. Establecimiento de programa de seguimiento

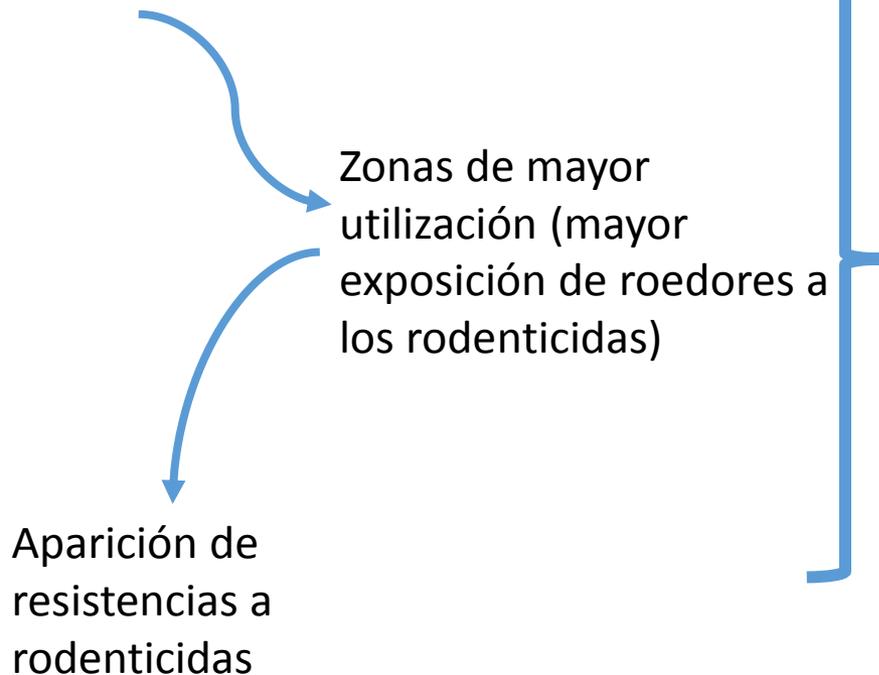
### Monitorización del uso de rodenticidas anticoagulantes

- Información de volumen de uso en determinados puntos
  - ¿Información del volumen de venta?
  - Información de uso en puntos concretos (aplicadores)
- Análisis químico de muestras ambientales
  - Puesta a punto de método de análisis multi-residuo.  
(Varios biocidas analizados simultáneamente en la muestra)  
LC-MS/MS

## Programa de monitorización de sustancias biocidas

### Fase 3. Estudio de la aparición de posibles resistencias a rodenticidas anticoagulantes

Monitorización del uso  
(a nivel de España)



Incidencia directa:

Estrategias de aplicación

Estrategias de mercado

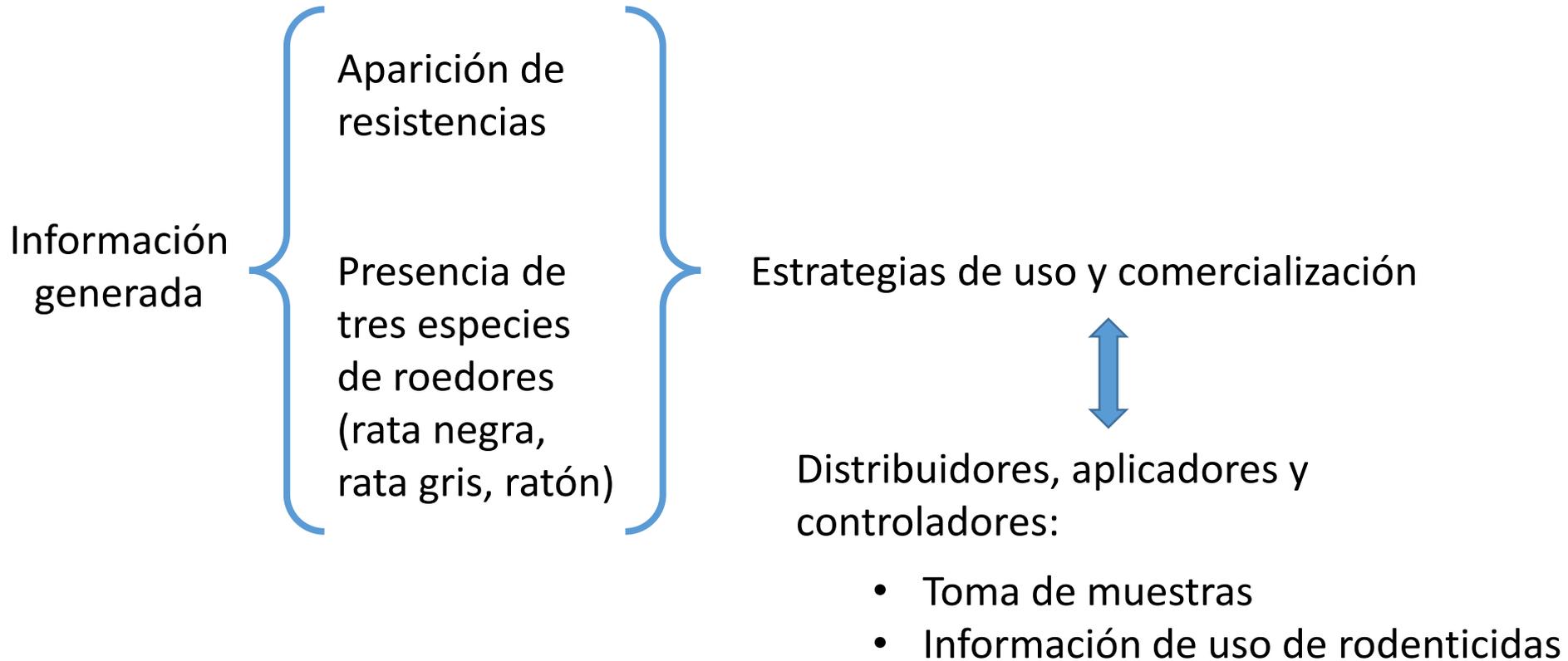
## Programa de monitorización de sustancias biocidas

### Fase 3. Estudio de la aparición de resistencias a rodenticidas anticoagulantes

Toma de muestras biológicas para estudiar las resistencias

- Global (España) **ANECPLA**
  - Información global, poco detallada para cada zona
  - Muestras recogidas por aplicadores, enviadas al INIA (ANECPLA)
- Local. Estudio centrado en zonas sospechosas por uso intensivo de rodenticidas
  - Información detallada para cada zona
  - Alto número de muestras recogidas por aplicador o por entidades a cargo del control de plagas

## Estudio de la aparición de posibles resistencias a rodenticidas anticoagulantes





# ESTUDIO TÉCNICO



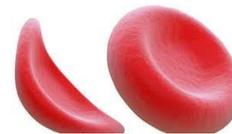
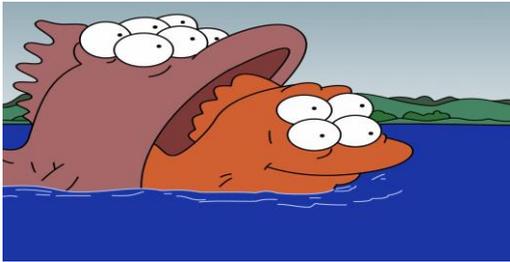


# RESISTENCIA

La capacidad desarrollada por una población para tolerar dosis de compuestos tóxicos que serían letales para la mayor parte de los individuos de una población normal de la misma especie.



# MUTACIONES



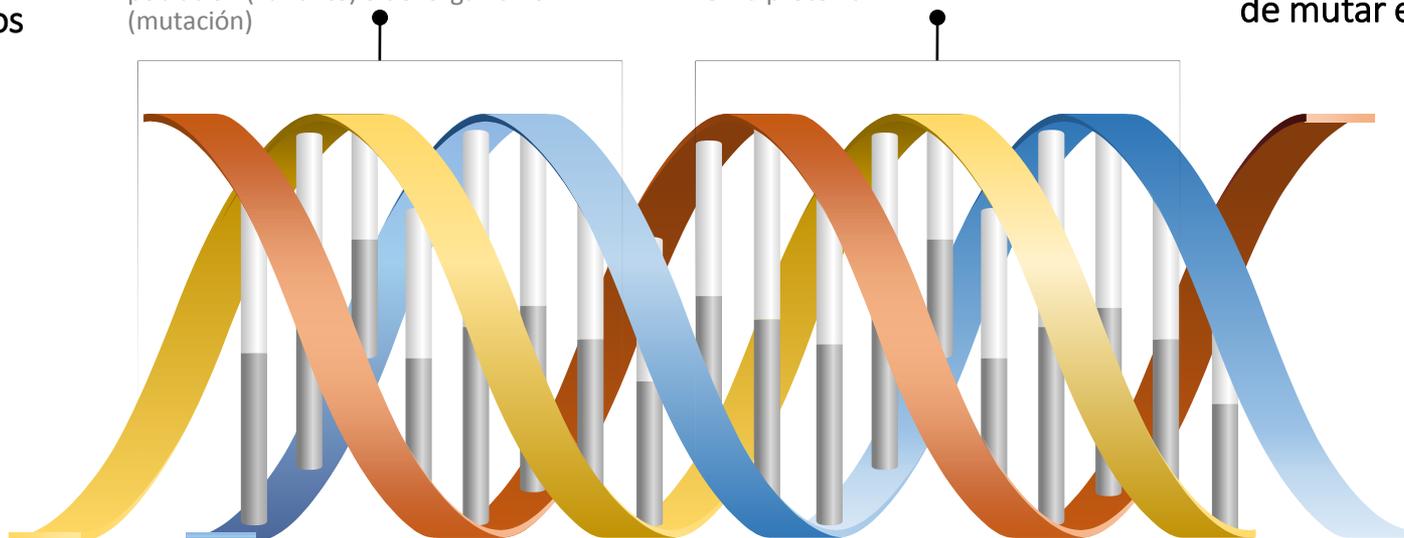
## DEFINICIÓN DE MUTACIÓN

Acción de mutágenos

Presente en una pequeña proporción de la población (variante) o del organismo (mutación)

Resultar la sustitución de aminoácidos en la proteína.

La unidad genética capaz de mutar es el gen



Una mutación es el cambio en la secuencia de un nucleótido o en la organización del ADN (genotipo) de un ser vivo, que produce una variación en las características de este y que no necesariamente se transmite a la descendencia.

# GEN ORIGEN DE LA RESISTENCIA

- El gen de la subunidad 1 del complejo de la vitamina K epóxido reductasa **VKORC1 (Vitamina K1 Epoxi Reductasa)**
- La proteína se encarga de reducir a la vitamina K y mantener el equilibrio entre las formas oxidada y la reducida. La inhibición de VKORC1 impide la activación de los factores de coagulación produciendo la muerte por el cúmulo de hemorragias internas.
- Los polimorfismos del VKORC1 originan las distintas resistencias detectadas hasta el presente.



Ingrediente activo	Efectividad de los ingredientes activos rodenticidas frente a distintos tipos de mutaciones (resistencias) para <i>Rattus norvegicus</i>				
	L128Q	Y139S	Y139C	L120Q	Y139F
warfarina	X	X	X	X	X
clorofacinona	X	X	X	X	X
coumatetralilo	X	X	X	X	X
difenacoum	✓	✓	X	X	?
bromadiolona	✓	✓	X	X	X
brodifacoum	✓	✓	✓	✓	✓
flocoumafen	✓	✓	✓	✓	✓
difetialona	✓	✓	?	?	✓

X = no efectivo, ✓ = efectivo, ? = se desconoce.

# METODOLOGÍA



## Kit muestreo

- Cuestionario
- Tubo colector con condigo de barras
- Guantes y espátula



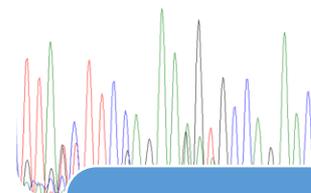
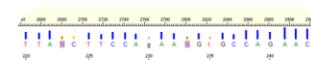
## Extracción de ADN

- 1-3 heces
- Cola



## PCR

- Cebadores específicos



## Secuenciación

- Identificación de especie
- Detección de mutaciones

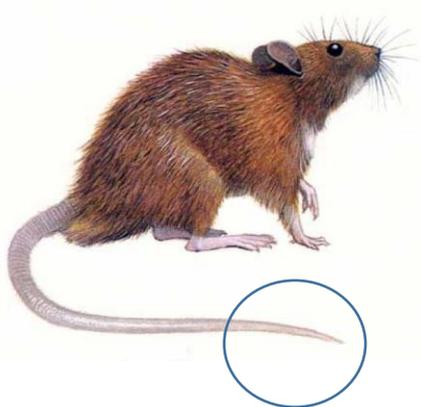
# METODOLOGÍA

## Muestras de heces



- 3 heces por tubo
- Lo más recientes posible
- Directamente al tubo de recolección
- Una única ubicación

## Tejidos: cola



- 2-3 cm
- En un tubo de recolección con etanol 70%
- Un único animal

**MANTENER LAS MUESTRAS REFRIGERADAS SI ES POSIBLE**



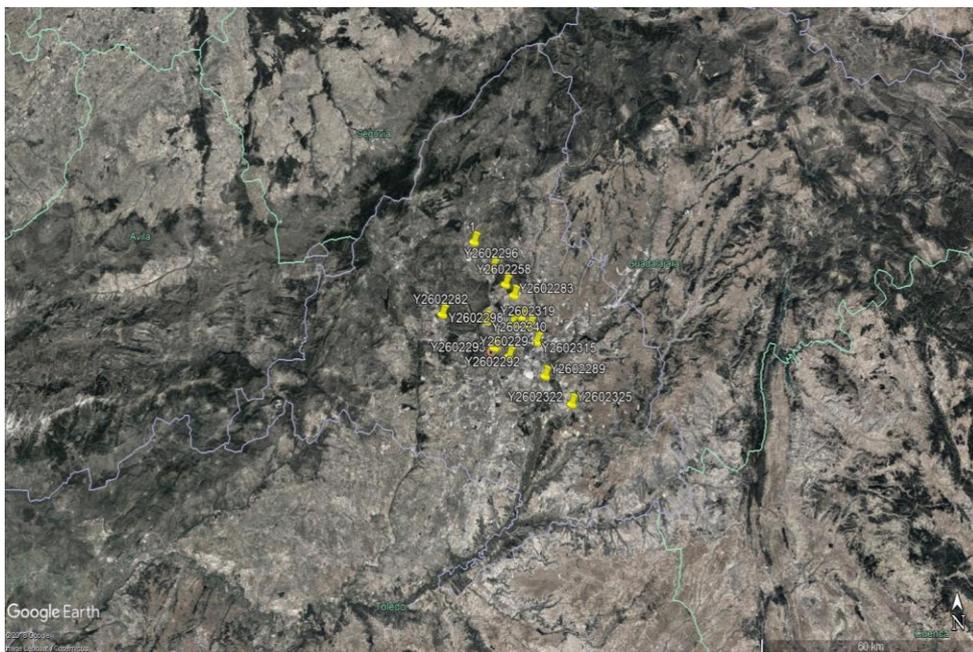
# RECOGIDA DE KITS

- **Un sobre contiene 5 kits de recogida de heces para 5 localizaciones distintas.**
- **Cada kit tiene asignado un código de barras para asegurar la trazabilidad**
- **Los aplicadores interesados pueden:**
  - **recoger sobres**
  - **solicitarlos**





# FASE PRELIMINAR



## Estudio en la Comunidad de Madrid

- 20 muestras

## Especies detectadas

- Rata gris
- Rata negra

## Distinta calidad del ADN

- Recientes
- Degradadas por humedad/hongos



## Iniciado estudio en la ciudad de Madrid



Gracias por vuestra atención