

应用凝血反应检测杀鼠灵抗药性 褐家鼠的可行性研究

孙毅 郭天宇 董天义 赵彤言

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室 2004DAV00214, 北京, 100071)

摘要: 为探讨凝血反应在鼠类抗药性检测中的应用前景, 以褐家鼠为对象, 在摄食实验基础上筛选抗药性褐家鼠, 并在区分剂量 12 mg/kg 作用下分析抗药性和敏感性褐家鼠的凝血能力的变化情况。结果显示, 抗药性个体在区分剂量作用下, 凝血酶活动度虽有所下降, 下降幅度可达正常水平的 17%, 但在 2~3 d 内可恢复到正常凝血水平; 而敏感性褐家鼠的凝血酶下降到很低, 且在随后不能恢复。另外, 对褐家鼠凝血酶活动度的分布及其存活的关系研究也提示, 区分剂量可促使凝血酶活动度的种群分布从单峰型向双峰型分化, 其中敏感个体的凝血酶活动度在 0~3.16 之间, 而抗药性个体则在 17~100 之间。并发现用药 4 d 后的凝血酶活动度基本上可代表其未来的存活率, 这提示了凝血反应与摄食实验结果的一致性。因此, 以施药后 4 d 凝血酶活动度 PCA = 17 或 INR = 5.0 作为阈值来区分抗药性和敏感性个体的凝血反应状况, 进行家栖鼠抗药性测定是可行的。

关键词: 凝血反应; 褐家鼠; 抗药性; 杀鼠灵; 检测

中图分类号: Q494

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050(2006)02-0176-07

Feasibility of blood clotting response (BCR) to discriminate the warfarin-resistant and susceptible *Rattus norvegicus* (Berk)

SUN Yi, GUO Tianyu, DONG Tianyi, ZHAO Tongyan

(State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity 2004DAV00214, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100071, China)

Abstract: To determine the feasibility of a blood clotting response (BCR) method for monitoring the resistance of commensal rodents, *Rattus norvegicus* were sampled from suburbs of Beijing and discriminated into resistant and susceptible individuals by non-alternative feed test appraised by World Health Organization. When administered with a discrimination dose of Warfarin (12 mg/kg body weight), both resistant and susceptible *R. norvegicus* individuals decreased their percentage clotting activity (PCA) the following day. While PCA of resistant individuals only decreased to 17% of normal level and soon increased to normal level within 2-3 days. In contrast the PCA of susceptible individuals decreased dramatically and no subsequent increase was observed. As a whole population, the distribution pattern of PCA four days of post-treatment *R. norvegicus* also changes from one peak type of pre-treatment population into double peaks type, one peak stands for resistant individuals and the other for resistance individuals. The peak of the resistant covers PCA range from 0 to 3.16 and that of susceptible individuals PCA ranges from 17 to 100. In the same time, PCA four days post-treatment also was found to be related to survival of *R. norvegicus* and can predict survival in subsequent feed test which indicate the consistency of BCR method and non-alternative feed test in monitoring the resistance of *R. norvegicus*. Therefore, PCA = 17 (INR = 5.0) should be a threshold in determining "responders" to discriminate the resistant and susceptible rodent. So BCR might be an applicable method to monitor the resistance against anticoagulant rodenticides of commensal rodents

Key words: Blood clotting response; *Rattus norvegicus*; Resistan; Warfarin

褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 是广泛分布于我国的有害鼠种之一, 它不仅糟蹋粮食, 污染食品, 更主要是传播疾病, 如鼠疫和出血热等, 而且能够咬坏电线, 破坏通讯设备, 引起火灾等重大事故。目

前控制褐家鼠危害的主要手段是使用化学杀鼠剂。其中, 抗凝血灭鼠剂的问世成为鼠防工作划时代的进展, 它通过干扰维生素 K 代谢, 破坏正常的凝血功能而导致死亡。由它配制的毒饵, 不会引起老

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270882)

作者简介: 孙毅 (1973-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事媒介生物医学研究工作. sunyi@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2005-04-13; 修回日期: 2005-10-12

鼠的拒食反应; 人畜误食也有足够的时间抢救, 并有特效的解毒剂维生素 K_1 , 是防制褐家鼠的理想鼠药 (邓址和潘凤庚, 1983; 董天义, 1991, 2001)。因此, 世界各个国家都在推广应用, 我国也于上世纪 80 年代初开始大规模推广应用, 取得了满意的效果。但随着这类灭鼠剂的长期使用, 20 世纪 60 年代首先在英国发现褐家鼠对抗凝血灭鼠剂产生了抗药性, 此后近 40 年内几乎所有使用这类鼠药的国家 and 地区都报告了家栖鼠的抗药性 (WHO, 1982)。1985 年我国鼠类抗药性监测协作组, 在全国范围经过 10 多年的抗药性调查监测, 也发现在连续使用抗凝血灭鼠剂超过 6 年的地区, 家栖鼠对杀鼠灵等灭鼠剂存在着不同程度的抗药性和交互抗性 (郑智民, 1981; 詹邵琛和吴良德, 1983; 鼠类抗药性监测协作组, 1993), 严重影响这类杀鼠剂的应用, 使鼠害控制更加困难。

抗药性种群的监测, 是指导科学用药、开展褐家鼠鼠害防治的重要环节, 许多国家和地区都开展了抗药性检测方法的探索。Drummond 和 Wilson (1968) 开始采用摄食实验检测抗药性, 我国自 1985 年以来, 也建立了一套摄食实验抗药性检验的方法并基本明确了我国褐家鼠的抗性情况 (董天义, 2001)。但是由于摄食实验中影响因素较多, 并且只能依赖存活情况进行判定, 一些抗药性个体极可能在日常防制中足以耐受区分剂量的作用, 却死于摄食实验中被作为敏感鼠。另外, 摄食实验不仅需要大量的人力和物力, 且耗时长 (一般需要 30 d 左右)。因此, 国内外一直致力于可替代的抗药性检测技术研究。

研究发现, 鼠类抗药性基因 R_w/War 的表达, 引起其体内维生素 K 环氧化物还原酶的构象与活性改变, 从而影响抗凝血灭鼠剂解毒剂底物——维生素 K_2 的合成 (MacNicoll, 1988; MacNicoll and Gill, 1993)。鼠类的凝血反应改变、尤其是凝血酶活力的改变可能是鼠类抗药性的指征之一。因此, 一些学者开始利用这一特性研究鼠类抗药性检测技术。基于维生素 K 依赖性凝血因子作用基础的凝血反应是一项应用于病人抗凝血治疗的检测技术, 由于该技术可定量分析出凝血酶的活动情况, 可望被应用到鼠类的抗药性检测。本文以褐家鼠为对象, 通过研究杀鼠灵对褐家鼠敏感种群和抗性种群的凝血反应以及存活的影响, 探讨应用凝血反应检测褐家鼠抗药性的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

大白鼠 *R. norvegicus albino* (Wistar 品系), 由军事医学科学院实验动物中心提供, SPF 级。褐家鼠采自北京市门头沟区齐家庄。杀鼠灵 (Warfarin) 标准品由军事医学科学院微生物流行病学研究所合成, 纯度 99.9999%。

1.2 方法

1.2.1 大白鼠、褐家鼠凝血反应标准曲线的建立

1.2.1.1 大白鼠凝血反应标准曲线的建立

将大白鼠单笼 (15 cm × 25 cm × 35 cm) 饲养适应 1 周, 选择成年、健康、非孕和无外伤的个体, 测量体重并鉴定性别后作为试鼠 (鼠类抗药性监测协作组, 1991)。将试鼠用 CO_2 轻度麻醉至针刺无反应, 抽取心血 0.5 ml, 按 9:1 比例加入含 0.109 M 的枸橼酸钠的塑料试管中, 轻轻混匀。1 500 g 离心 15 min, 取血清。然后用磷酸缓冲液 (PBS pH7.2) 按 4:1、2:1、1:1、2:3、1:4 和 1:9 进行梯度稀释 (MacNicoll and Gill, 1993), 稀释后用 C-500 型自动凝血仪, 测定其凝血酶原时间 (PT) [以国际标准化比值 International normalized ratio, INR 报告 (Prescott, 2003)], 测试设定最大 PT 值为 999 s (MacNicoll and Gill, 1993)。实验设置重复 3 次, 每次 3 只。根据 OEPP (1995) 以稀释浓度代表凝血酶活动度 (Percentage coagulation activity, PCA), 并以其与对应国际标准化比值建立凝血酶活动度标准曲线。

1.2.1.2 褐家鼠敏感种群的确认和凝血反应标准曲线建立

按 1.2.1.1 中大白鼠的方法选择褐家鼠, 取心血并测定梯度稀释后的凝血酶原时间; 采心血后, 褐家鼠单个笼养 1 周, 然后按照董天义 (2001) 的方法进行杀鼠灵摄食实验测定, 以摄药剂量达到 12 mg/kg 的存活个体为抗药性个体, 其余作为敏感性个体 (U. S. Environmental Protection Agency, 1981; 董天义, 2001)。将确认为敏感性个体的凝血酶原时间 (以 INR 报告) 和稀释浓度分别作为纵、横坐标建立褐家鼠敏感种群的凝血反应标准曲线。试验以采血正常饵料组和未采血杀鼠灵摄食组为对照, 重复 3 次。

1.2.2 抗药性区分剂量对褐家鼠凝血反应的影响

1.2.2.1 区分剂量对褐家鼠凝血反应的影响

按 1.2.1.1 中大白鼠的方法选择褐家鼠, 测量

体重并鉴定性别后随机分为4组, 每组40只。然后以12 mg/kg的杀鼠灵毒粉对褐家鼠进行灌胃, 灌胃后第1、2、3、4组分别于攻毒后1 d、2 d、3 d、4 d采心血, 按1.2.1.1方法测定其凝血酶原时间(PT)。采血完成后, 以正常饵料饲养, 继续观察试鼠的存活状况至第20 d, 将20 d后仍旧存活的个体作为抗药性个体, 其余均作为敏感性个体。敏感性试鼠死亡后解剖检查死因。实验以不采血组为对照, 重复3次。

1.2.2.2 区分剂量条件下褐家鼠凝血酶活动度及其存活的关系

按1.2.1.1中大白鼠的方法选择褐家鼠, 测量体重并鉴定性别后, 以12 mg/kg的杀鼠灵毒粉对褐家鼠进行灌胃, 4 d后采心血, 按1.2.1.1方法测定其凝血酶原时间(PT)。采血完成后, 以正常饵料饲养, 继续观察试鼠的存活状况至第20 d。

1.2.3 数据处理与分析

所得数据的差异显著性检验、标准曲线和 Logistic 曲线拟合, 采用 SPSS 12.0 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 大白鼠凝血反应标准曲线

将大白鼠血浆的不同浓度稀释后, 以稀释浓度代表凝血酶活动度(PCA), 测量其凝血反应国际标准化比值(INR), 结果显示, 相同稀释浓度条件下, 雄性和雌性大白鼠之间所测结果无显著差异($\chi^2 = 1.89$, $df = 8$), 然后将雌雄合并, 以 INR 平

均值和对应 PCA 分别为纵、横坐标, 得到大白鼠凝血酶活动标准曲线(图1,a)。直线回归分析结果显示, 国际标准化比值与相应的 PCA 的倒数成直线关系, 回归曲线为 $INR(Y) = 102.217/X - 0.619$ ($X = PCA$), $R^2 = 0.95358$ 。

2.2 褐家鼠凝血反应标准曲线

用摄食实验方法, 从76只(40♂, 36♀)中剔除抗性鼠后获得敏感性褐家鼠21只(10♂, 11♀)。正常饲料对照组, 所有试鼠均正常摄食并存活良好, 无因取血死亡个体; 采血1周后进行摄食实验, 褐家鼠对杀鼠灵摄食情况与存活状态不受影响, 与未采血杀鼠灵摄食组差异不显著(表1)。利用事先测得的凝血反应国际标准化比值(INR)与稀释倍数(代表凝血酶活动度 PCA)的关系, 分析褐家鼠敏感种群的 PCA 与 INR 之间的关系。结果发现, 相同稀释浓度下所测得的褐家鼠雄性和雌性血浆国际标准化比值均无显著差异($\chi^2 = 1.29$, $df = 9$), 然后将雌雄合并, 以 INR 平均值和对应的 PCA 分别为纵、横坐标, 得到褐家鼠凝血酶活动标准曲线(图1,b)。直线回归分析结果显示, 国际标准化比值与相应的 PCA 的倒数成直线关系, 回归曲线为 $INR(Y) = 102.169/X - 0.594$ ($X = PCA$) ($R^2 = 0.98658$), 从获得的拟合参数来看, 褐家鼠和大白鼠的凝血酶活动度和凝血酶原的国际标准化比值的的关系是一致的, 两者无显著性差异, 可用大白鼠标准曲线进行 INR 和凝血酶活动度换算。

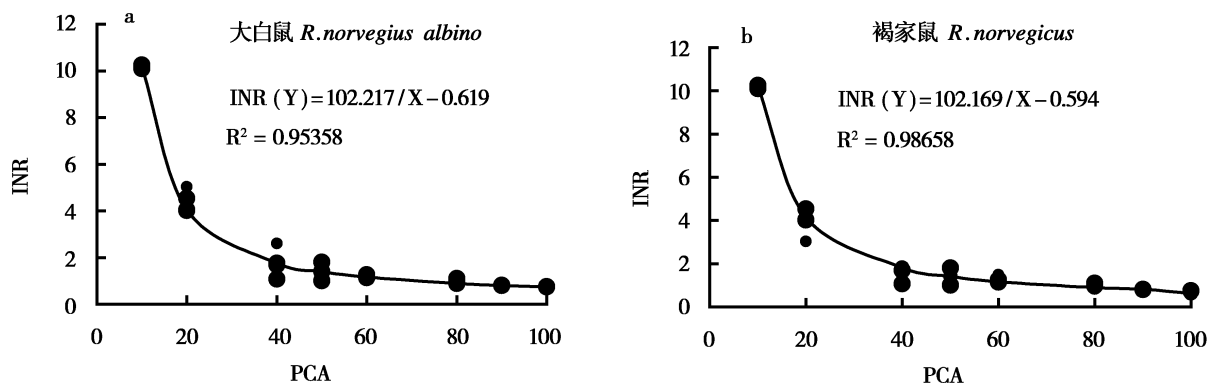


图1 大白鼠和褐家鼠凝血反应标准曲线

Fig. 1 Standard curve of PCA and INR in *R. norvegicus albino* and wild *R. norvegicus*

2.3 区分剂量对褐家鼠凝血反应的影响

不同取血时间对抗药性测定结果的影响, 在第1、2、3、4组中敏感个体比对照组死亡较快, 平均存活时间3~5 d (4.2 ± 1.8), 低于对照组5~7 d (6.25 ± 1.3); 而抗药性个体可存活20 d以

上。其抗药性比在12.5%~17.5%之间, 与对照组相比, 所有 $\chi^2 < \chi_{0.05(1)}^2 = 3.814$, 均无显著差异(表2)。可见, 不同时段采血对摄食实验筛选抗药性结果并无显著影响。

表 1 采血对褐家鼠摄食实验的影响

Table 1 Effects of blood sampling on the warfarin feeding test of *R. norvegicus*

处理 Treatment	性别 Sex	状态 Status	数量 Number	摄药剂量 (mg/kg) Dose taken (mg/kg)	存活期 (d) Duration of survival (day)
采血 Blood sampled	雄 Male	敏感 Sensitive	25	6.5 ± 2.1 ^a	4.2 ^a (2~6)
		抗性 Resistant	11	25.7 ± 3.1 ^b	25.6 ^b (22~35)
	雌 Female	敏感 Sensitive	30	8.7 ± 2.5 ^a	5.2 ^a (3~7)
		抗性 Resistant	10	37.7 ± 4.2 ^b	36.5 ^b (32~55)
未采血 Control	雄 Male	敏感 Sensitive	26	6.5 ± 1.8 ^a	4.5 ^a (2~6)
		抗性 Resistant	10	27.5 ± 1.3 ^b	25.6 ^b (22~35)
	雌 Female	敏感 Sensitive	30	9.7 ± 2.9 ^a	5.9 ^a (3~7)
		抗性 Resistant	9	36.7 ± 2.2 ^b	35.6 ^b (32~55)

表中标记相同字母者, 示在 95% 置信概率下差异不显著

Items followed by the same superscript mean no significant difference ($\alpha = 0.05$)

表 2 不同时间段采血对褐家鼠抗药性筛选的影响

Table 2 Effects of blood sampling on detection of resistant *R. norvegicus*

组别 Group	采血时间段 (d) Time of blood sample	测试鼠 Rats tested	敏感鼠数 Susceptible rats	抗性鼠数 Resistant rats	抗性比 Resistant ratio	χ^2	P 值
1	1	40	35	5	12.5	0.105	0.658
2	2	39	33	6	15.3	0.002	0.864
3	3	40	35	5	12.5	0.105	0.658
4	4	39	30	9	17.5	0.837	0.160
对照 Control	—	40	34	6	15.0	—	—

另外, 经灌胃处理后, 敏感性个体其凝血酶活动度一直很低, 主要表现为凝血酶原时间很长, INR 值大于 10, 有的个体的血浆在测试中根本不能凝结 (PCA 几乎为 0)。而抗药性个体的凝血酶活动度虽然在处理后有所下降, 最低的 PCA 值仅

为 17%, 下降幅度明显小于敏感性个体, 但随后逐渐升高, 至灌胃后第 4 d, 基本恢复到原有的 50% 左右。在抗药性种群中, 雌性个体对药物的敏感度比雄性个体低, 且恢复速度较快, 至灌胃后第 3 d 即基本恢复到原有水平 (图 2)。

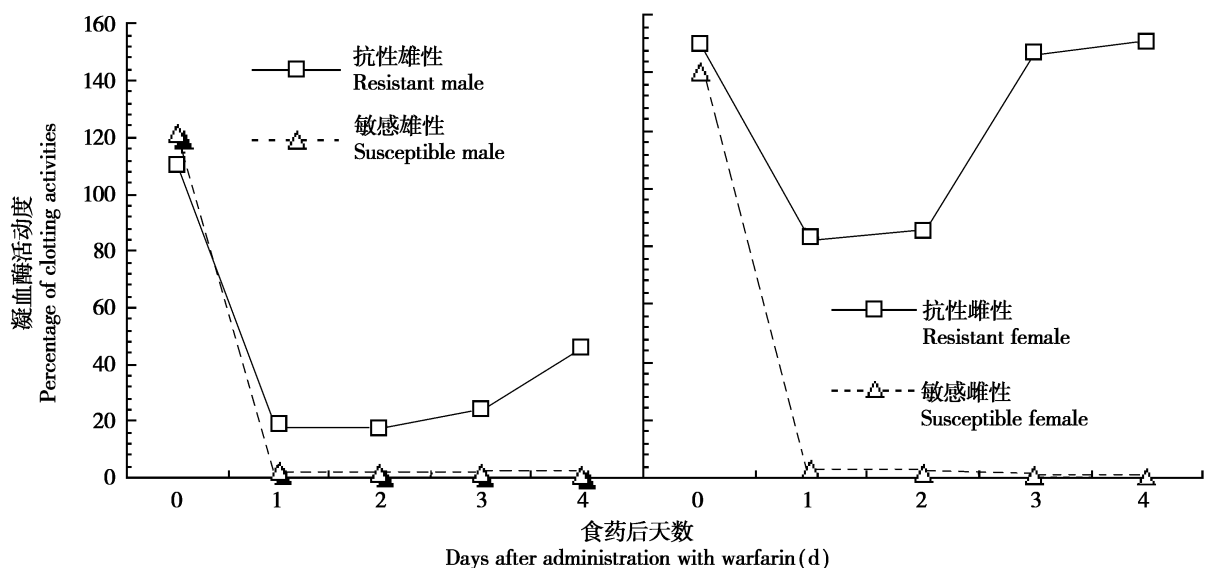


图 2 12mg/kg 区分剂量作用后褐家鼠的凝血反应的变化

Fig. 2 Changes of PCA in *R. norvegicus* after administration with 12 mg/kg warfarin

2.4 区分剂量投用后褐家鼠凝血酶活动度分布情况及其与存活的关系

从图 3、4 可以看出，野外褐家鼠用药前的凝血酶活动度呈单峰型，大多数个体的凝血酶活动度 (logPCA) 集中在 0~0.9 之间；食药 4 d 后，在灭

鼠剂区分剂量作用下，褐家鼠雌雄个体凝血酶活动度呈双峰型并两极分化，大多数个体的凝血酶活动度 (logPCA) 集中在 0~0.5 之间，另外还有一部分个体凝血酶活动度 (logPCA) 在 1.0~2.0 之间 (图 3、4)。

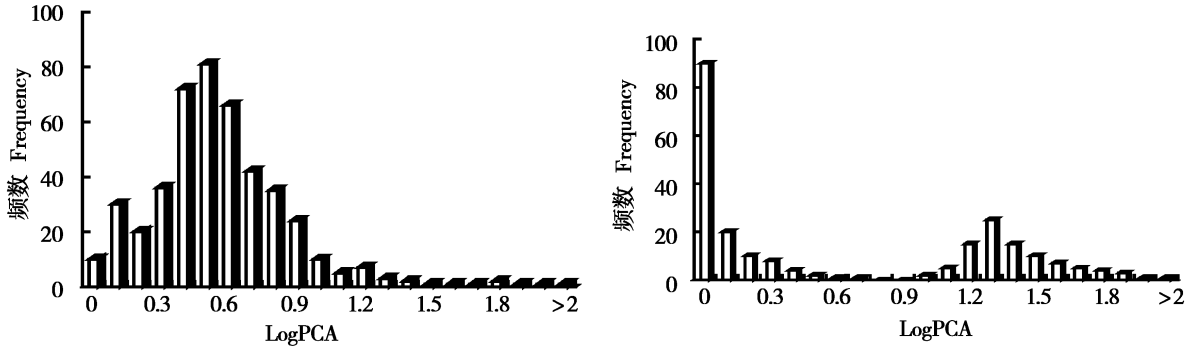


图 3 区分剂量作用对雄性褐家鼠凝血酶活动分布的影响 (左: 用药前, 右: 用药后)

Fig. 3 Distribution pattern of PCA in male *R. norvegicus* between pre- and post administration with 12 mg/kg warfarin (left: pre-treatment; right: post-treatment)

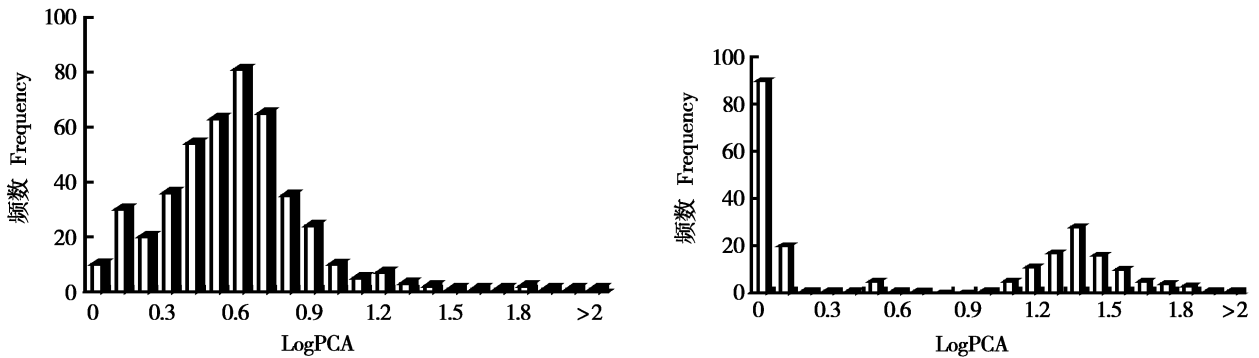


图 4 区分剂量作用对雌性褐家鼠凝血酶活动分布的影响 (左: 用药前, 右: 用药后)

Fig. 4 Distribution pattern of PCA in female *R. norvegicus* between pre- and post administration with 12 mg/kg warfarin (left: pre-treatment; right: post-treatment)

以 12 mg/kg 灌胃 4 d 后测得的凝血酶活动度同随后观察到的存活率成正相关关系 ($r_{\delta} = 0.8973, n_{\delta} = 120; r_{\sigma} = 0.9104, n_{\sigma} = 116$), 凝血酶活动度在一定程度上可代表预期的存活情况, logPCA < 1.0 的个体几乎全部死亡, 只有 logPCA > 1.0 的个体存活率较高; 可见, 区分剂量作用下凝

血酶活动度 (logPCA) 在 1.0~2.0 之间的个体就是抗药性个体。对 PCA 和存活率进行数值转换, 进行 Logistic 曲线拟合, 结果发现, 雄性和雌性褐家鼠的凝血酶活动度和存活率均很好地拟合 Logistic 曲线 (图 5), 拟合参数及显著性检验见表 3。

表 3 褐家鼠凝血酶活动度与存活率之间拟合 Logistic 曲线的参数及显著性检验

Table 3 Logistic curve fitting test between PCA and survival of *R. norvegicus*

性别 Sex	参数 Parameter	系数 Coefficient	标准差 Standard deviation	β	T	Significance
雄 Male	LogPCA	0.105	0.263	0.406	3.890	0.012
	常数 Constant	14.429	5.252			
雌 Female	LogPCA	0.004	0.003	0.410	1.516	0.014
	常数 Constant	4202.280	3694.569			

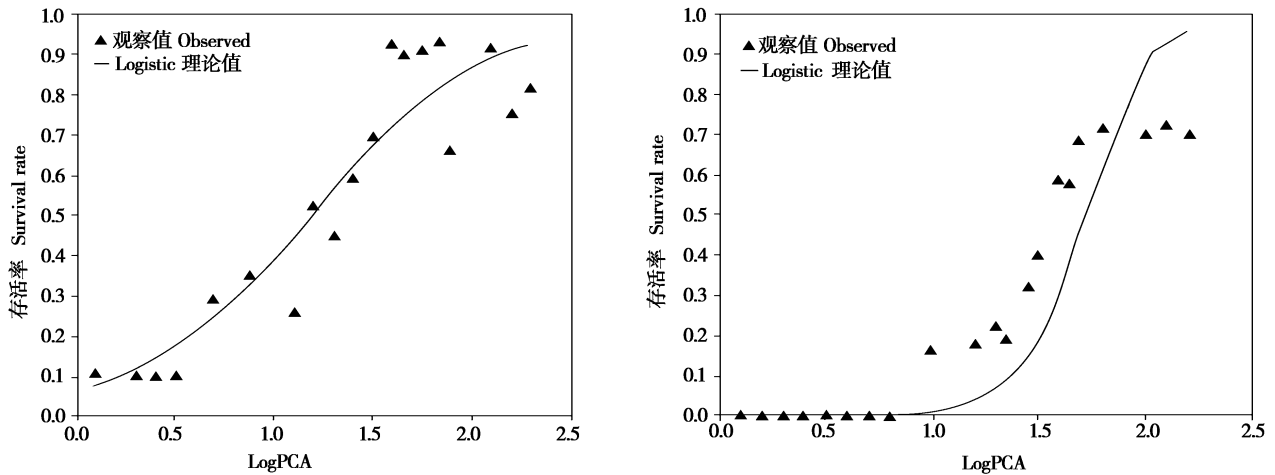


图 5 摄食实验中褐家鼠凝血酶活动度与存活的关系 (左: 雄, 右: 雌)

Fig. 5 Relationship of blood clotting activity of *R. norvegicus* and its survival in subsequently feeding test by oral administration with 12 mg/kg warfarin baits within 4 days (left, male; right, female)

3 讨论

抗凝血灭鼠剂的主要作用机制是抑制鼠类的凝血活动, 导致其体内出血难以凝固而死亡。研究表明, 鼠类体内的凝血活动主要是维生素 K 依赖性凝血因子的作用, 如 (1) Coagulation factors II 凝血素 (prothrombin), VII 血小板转移素 (proconvertin), IX 科立斯因子 (Christmas factor) 和 X 斯图亚特因子 (Stuart-Prower factor); (2) 抗凝血蛋白组分 C, S 和 Z; (3) matrix-Gla protein 和核糖体组蛋白等 (Furie, 1990; Kerins and MacNicoll, 1999)。这些蛋白受到抑制是其体内凝血反应降低的主要原因 (Thijssen, 1995)。由于鼠类抗药性基因 *Rw/War* 的表达, 引起其体内维生素 K 环氧化物还原酶的构象与活性改变, 影响了维生素 K₂ 的合成 (MacNicoll, 1988; MacNicoll and Gill, 1993)。鼠类的凝血反应改变、尤其是凝血酶活力的改变可能是抗药性出现的指征之一 (Gill, *et al.*, 1993)。而基于维生素 K 依赖性凝血因子作用基础的凝血反应是一项应用于病人抗凝血治疗的检测技术, 该技术可定量分析出凝血酶的活动情况, 因而被应用到鼠类的抗药性检测。但是, 目前国内尚未有这方面的研究。

本研究基于我国褐家鼠存在抗药性的客观现实, 在摄食实验基础上, 研究了杀鼠灵对褐家鼠抗性个体和敏感个体凝血酶活动的影响, 以及褐家鼠凝血酶活动度的分布与存活之间的关系。结果显示, 区分剂量作用下, 褐家鼠抗性个体的凝血酶活动度可在 4 d 内迅速恢复, 而敏感种群个体却不

能。因此, 可利用 4 d 后凝血酶活动度的变化情况区分抗药性与敏感性个体。另外, 褐家鼠凝血酶活动度的分布也从用药前的单峰分布变化到用药后的双峰分布, 其中一个峰代表敏感个体群, 一个峰代表抗性个体群, 两者的凝血酶活动值 PCA 分别在 0 ~ 3.19 (敏感种群)、17 ~ 100 (抗性种群), 因此, 可考虑利用用药 4 d 后 PCA = 17 (INR = 5.0) 作为阈值来区分抗药性种群和敏感种群的鼠类。

本研究结果显示, 褐家鼠敏感个体和抗性个体在杀鼠灵作用下的凝血酶活动度改变明显不同, 其原因可能是两者重新合成维生素 K 系列的能力不同所致, MacNicoll (1998) 发现, 抗性个体可利用维生素 K₃ 合成维生素 K₂, 而敏感个体则不能。维生素 K₃ 可从鼠类食物、粪便以及肠道微生物群落代谢物中获取, 是合成维生素系列的基本骨架。从本研究中也发现, 抗性鼠利用维生素 K₃ 合成维生素 K₂ 的能力较强, 即使存在抗凝血灭鼠剂 Warfarin 也能迅速恢复凝血酶活动度, 快速愈合由取心血所形成的创伤, 因此, 对摄食实验测定的抗药性结果并无显著影响。至于抗药性与敏感性个体在获得维生素 K₃ 能力方面的差异原因还有待进一步研究。

参考文献:

- Den Z, Pan F G. 1983. The biological evaluation of brodifacoum and difenacoum. *Acta Theriologica Sinica*, **3** (1): 93 - 98. (in Chinese)
- Drummond D C, Wilson E J. 1968. Laboratory investigation of resistance to warfarin of *Rattus norvegicus* Berk in Montgomeryshire and Shropshire. *Annual Applied Biology*, **61** (1) 303 - 312.
- Dong T Y. 1991. Researches on the resistance of rodents to anticoagulant

- rodenticides. Beijing: Chinese Science and Technology Publishing House. 1-28. (In Chinese)
- Dong T Y. 2001. Researches on the application of anticoagulant rodenticides. Beijing: Chinese Science and Technology Publishing House. 1-77. (In Chinese)
- Gill J E, Kerins G M, Langton S D, MacNicoll A D. 1993. The development of a blood clotting response test for discriminating between difenacoum-resistant and susceptible Norway rat (*Rattus norvegicus* Berk). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **104C** (1) 29-36.
- Group of resistant-rodent surveillance. 1991. Test method of resistance of comensal rodent to anticoagulant rodenticides. *Journal of Vector Biology and Control*, **2** (5): 339-340. (in Chinese)
- Group of resistant-rodent surveillance. 1993. Toxin test method of anticoagulant rodenticides in laboratory. *Journal of Vector Biology and Control*, **4** (5): 393-394. (in Chinese)
- Furie B. 1990. Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. *Blood*, **75**: 1753-1762.
- Kerins G M, MacNicoll A D. 1999. Comparison of the half-lives and regeneration rates of blood clotting factor II VII, and X in anticoagulant-resistant and susceptible Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **122C** (1) 307-316.
- MacNicoll A D, Gill J E. 1993. Revised methodology for a blood clotting response test for identification of warfarin-resistant Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk). *EPPO Bulletin*, 1993, **23**: 701-707.
- MacNicoll A D. 1998. The role of altered vitamin K metabolism in anticoagulant resistance in rodents: In: Suttie J W ed. Seventeenth steenbock symposium on current advances in vitamin research. New York: Elsevier, 407-417.
- OEPP/EPPO. 1995. Guideline for the evaluation of resistance to plant protection products: Test rodents for resistance to anticoagulant rodenticides. *EPPO Bulletin*, **25** (3): 575-593.
- Prescott C V. 2003. A reappraisal of blood clotting response tests for anticoagulant resistance and a proposal for standardized BCR test method. 2003 RRAC Monograph No. 1 Crop International, Belgium: Brussels.
- Thijssen H H. 1995. Warfarin-based rodenticides: mode of action and mechanism of resistance. *Pesticides Science*, 1995, **43**: 73-78.
- United States Environmental Protection Agency. 1981. Warfarin and Its Sodium Salt: Pesticide Registration Standard. USEPA, Office of Pesticides and Toxic Substances. Washington DC. 193. U. S.
- WHO. 1982. Instruction for detemring the susceptible or resistance of rodent to anticoagulant rodenticides. WHO/VBC, **843**: 9
- Zhan S C, Wu L D. 1983. Resistance to anticoagulants in *Rattus flavipectus*. *Acta Theriologica Sinica*, **3** (1): 91-92. (in Chinese)
- Zhen Z M. 1981. Preliminary investigation on the susceptibility and tolerance of some rodents to Diphacinone and its applied significance. *Acta Theriologica Sinica*, **1** (1): 93-99. (in Chinese)
- 邓址, 潘凤庚. 1983. 抗凝血灭鼠剂大隆和鼠得克的生物学效果评价. 兽类学报, **3** (1): 93-98.
- 董天义. 1991. 鼠类抗药性研究. 北京: 中国科学技术出版社, 1-28.
- 董天义. 2001. 抗凝血灭鼠剂应用研究. 北京: 中国科学技术出版社.
- 詹邵琛, 吴良德. 1983. 黄胸鼠对抗凝血剂抗药性初步调查. 兽类学报, **3** (1): 91-92.
- 鼠类抗药性监测协作组. 1991. 家栖鼠对抗凝血灭鼠剂抗药性检验方法. 中国媒介生物学及控制杂志, **2** (5): 339-340.
- 鼠类抗药性监测协作组. 1993. 抗凝血灭鼠剂实验室毒效比较实验方法. 中国媒介生物学及控制杂志, **4** (5): 393-394.
- 郑智民. 1981. 鼠类对敌鼠钠盐的敏感性的初步研究及其应用. 兽类学报, **1** (1): 93-99.