

# 血凝反应法检测黄毛鼠对抗凝血杀鼠剂抗性的可行性研究

隋晶晶, 高志祥, 姚丹丹, 冯志勇, 颜世祥

广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广东 广州 510640

**摘要:** 目的 探讨血凝反应法检测黄毛鼠对抗凝血杀鼠剂抗性的可行性。方法 以杀鼠灵(warfarin)抗药性区分剂量(10 mg/kg)单次灌胃处理结合致死期食毒抗性检测法(LFP)筛选出黄毛鼠敏感种群和抗性种群,在不同时间段采集试鼠血浆,通过检测试鼠血浆的凝血酶活性(PCA)建立黄毛鼠凝血反应标准曲线,并分析抗性区分剂量处理后抗性个体与敏感个体PCA的变化差异。结果 建立了黄毛鼠的凝血反应标准曲线:  $INR(y) = 34.984/x + 0.688(x = PCA)(R^2 = 0.992)$ ;以 10 mg/kg 为区分剂量单次灌胃处理后,抗药性黄毛鼠个体的 PCA 虽有所下降,但可在 2~3 d 内恢复到正常凝血水平的 17% 左右;敏感个体的 PCA 可下降到很低,且不能恢复。结论 证实了以血凝反应法检测黄毛鼠对抗凝血剂抗药性的可行性:杀鼠灵 10 mg/kg 为区分剂量单次灌胃处理 4 d 后,以  $PCA = 16.5$  (或  $INR = 4.4$ ) 作为阈值来区分黄毛鼠抗药性与敏感性个体,是准确、简便的抗药性判定方法。

**关键词:** 黄毛鼠; 杀鼠灵; 抗性检测; 血凝反应

中图分类号: S443; S481<sup>+.4</sup> 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2013)03-0208-04

## Study on the feasibility of blood clotting response test for determining resistance to anticoagulant rodenticide in *Rattus losea*

SUI Jing-jing, GAO Zhi-xiang, YAO Dan-dan, FENG Zhi-yong, YAN Shi-xiang

Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China

Corresponding author: FENG Zhi-yong, Email: fengzhy@tom.com

Supported by the "Eleven - Five" National Science and Technology Support Program (No. 2012BAD19B02), Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. S2011010000895) and Science and Technology Plan Projects of Guangdong Province (No. 2011B031500001)

**Abstract: Objective** To investigate the feasibility of blood clotting response (BCR) test for determining the resistance to anticoagulant rodenticide in *Rattus losea*. **Methods** Sensitive and resistant populations of *R. losea* were screened out by a single gavage of warfarin at a discriminating dose of 10 mg/kg and lethal feeding period test. Plasma was collected from test rats at different time points; the standard curve of BCR was established by measuring the percentage clotting activity (PCA) of plasma, and the difference in PCA between resistant and sensitive individuals treated with a discriminating dose of warfarin was analyzed. **Results** The standard curve of BCR in *R. losea* was established as follows:  $INR(y) = 34.984/x + 0.688(x = PCA)(R^2 = 0.992)$ . After the single gavage of warfarin at a discriminating dose of 10 mg/kg, the PCA of resistant individuals decreased, but it was restored to 17% of normal level within 2-3 d; the PCA of sensitive individuals decreased dramatically and was not restored. **Conclusion** This study confirms the feasibility of BCR test for determining the resistance to anticoagulant rodenticide in *R. losea*. It is accurate and simple to differentiate resistant and sensitive individuals of *R. losea* by a single gavage of warfarin (10 mg/kg) and using  $PCA = 16.5$  (or  $INR = 4.4$ ) as the threshold 4 d later.

**Key words:** *Rattus losea*; Warfarin; Determination of resistance; Blood clotting response

黄毛鼠(*Rattus losea*)是广布我国南方地区的主要农业害鼠之一,也是南方鼠疫源地的主要宿主动物<sup>[1]</sup>。20世纪80年代末,广东省引入以杀鼠灵、杀鼠

迷为代表的第一代抗凝血杀鼠剂进行农田灭鼠。抗凝血杀鼠剂配制的毒饵不易引起鼠类的拒食反应,并有特效解毒剂维生素K<sub>1</sub>,人畜误食有足够的时间抢救,是防治黄毛鼠的理想药物,引入后迅速得到广泛的应用<sup>[2-3]</sup>。然而,研究表明,在连续使用抗凝血杀鼠剂超过6年的地区,害鼠对杀鼠灵等抗凝血类杀鼠剂存在着不同程度的抗药性和交叉抗性。在珠三角地区,由于灭鼠时间长、灭鼠频次高等原因,农田黄毛鼠对杀鼠

**基金项目:**“十二五”国家科技支撑计划(2012BAD19B02);广东省自然科学基金(S2011010000895);广东省科技计划项目(2011B031500001)

**作者简介:**隋晶晶(1978-),女,硕士,助理研究员,主要从事鼠类行为生态和鼠害可持续控制技术研究。Email: viola\_sui@163.com

**通讯作者:**冯志勇, Email: fengzhy@tom.com

灵产生了大规模的抗性,部分地区抗性发生率甚至达到 36.67%<sup>[4-5]</sup>,抗药性已成为珠三角地区黄毛鼠防治中的焦点问题。

抗药性监测是指导科学用药、开展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。研究表明,鼠类抗药性相关基因 *Rw/War*、*VKORC* 等的表达,可引起其体内维生素 K 环氧化物还原酶(VKOR)构象与活性改变,进而影响到抗凝血杀鼠剂解毒剂底物——维生素 K<sub>2</sub> 的合成<sup>[6-7]</sup>。鼠类凝血反应的改变,尤其是凝血酶活力的改变可能是鼠类抗药性的指征之一。鉴于此,Prescott 和 Buckle<sup>[8]</sup>、Gill 等<sup>[9]</sup>开始利用这一特性探索鼠类抗药性检测技术。现以黄毛鼠为对象,通过研究杀鼠灵对黄毛鼠个体凝血反应的影响,探讨应用凝血反应检测黄毛鼠对第一代抗凝血杀鼠剂抗药性的可行性。

## 1 材料与方法

1.1 材料 凝血反应中所用各类药剂(包括参考血浆、PT 试剂等)均购自德国德高中国分公司广州代理处;杀鼠灵原药标准品由农业部药物检定所提供(纯度 >95%);乙二醇聚乙炔(Polyethylene glycol, PEG 400),由 Sigma 公司购置;新鲜大米购自广东省农业科学院水稻研究所。

1.2 试鼠 根据历史用药资料,选择报道杀鼠灵抗性发生率较高的广东省江门市新会区捕获黄毛鼠供试。

### 1.3 方法

1.3.1 毒饵配制 按照 OEPP/EPPO<sup>[10]</sup>推荐的方法,将杀鼠灵用 PEG 400 作溶剂溶解成母液,以新鲜大米为基饵配制 0.002% 的杀鼠灵毒饵,晾干备用;以 PEG 400 为溶剂,配制 0.03% 的杀鼠灵母液,密封备用。

1.3.2 黄毛鼠敏感及抗药性种群的确定 将黄毛鼠单笼(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、鉴定性别后作为试鼠。对试鼠以 10 mg/kg 单次攻毒并采集血浆(方法见 1.3.3),对观察期内死亡的试鼠进行剖检,有明显出血体征者判为杀鼠灵敏感鼠;对存活试鼠正常饲养 30 d 后,以 0.002% 杀鼠灵毒饵连续无选择性饱和饲喂攻毒 9 d,每天更换新毒饵并称量消耗量,之后改换无毒饵料正常观察饲喂 21 d,观察期结束后存活且食毒量 ≥10 mg/kg 者为抗性个体,对死亡试鼠剖检,明显死于抗凝血杀鼠剂中毒者为敏感个体(有出血体征)。

1.3.3 黄毛鼠凝血反应标准曲线的建立 按 1.3.2 选择试鼠,以乙醚轻度麻醉至针刺无反应,眼眶静脉丛取静脉血 0.5 ml 并立即按 9:1 比例加入含 0.109 mol/L 的枸橼酸钠的塑料试管中,轻轻混匀后 2500 r/min 离心

15 min(离心半径 13.5 cm),取血浆备用;对所得敏感试鼠血浆用磷酸盐缓冲液(PBS pH 7.2)梯度稀释为 100%、50%、25%、18.75% 和 12.50% 计 5 个浓度梯度,用 TECO 400 型半自动凝血仪测定各浓度血浆凝血酶原时间(PT)[以国际标准化比值(international normalized ratio, INR)报告]<sup>[11]</sup>;凝血仪自动设定最大 PT 测定值为 300 s。以敏感个体的血浆稀释浓度与所测得的国际标准化比值,分别作为纵、横坐标建立黄毛鼠敏感种群的凝血反应标准曲线。其中以稀释浓度代表凝血酶活度(percentage coagulation activity, PCA)。用药后的 PCA 参照此标准曲线换算。以无毒饵料和未经采血的黄毛鼠为实验对照,重复 4 次。

1.3.4 杀鼠灵区分剂量对黄毛鼠 PCA 的影响 按 1.3.2 选择试鼠,以 0.03% 杀鼠灵抗性区分剂量单次攻毒 10 mg/kg,随后间隔 24 h 连续 5 d 进行血浆采集(方法见 1.3.3),记录 PCA 变化,同时观察试鼠存活状况直至停药后 21 d。实验以无毒饲料为对照进行。

1.3.5 数据处理与分析 所取得数据差异有无统计学意义、logistic 曲线拟合等均在 SPSS 11.5 软件平台完成。

## 2 结果

2.1 黄毛鼠敏感种群凝血反应标准曲线的建立 以“单次抗性剂量攻毒观察期内死亡”及“累计摄药剂量达到 10 mg/kg,且 21 d 后存活”为标准从 54 只试鼠中筛选到抗性黄毛鼠个体 19 只(9 ♂, 10 ♀),敏感个体 35 只(19 ♂, 16 ♀)。将敏感鼠个体随机分为 7 组,每组 5 只,组内混匀血浆后测定 PCA 作定标曲线。实验过程中所有无毒饲料对照组试鼠均正常摄食并存活良好,无因取血发生个体死亡。

利用事先测得的凝血反应 INR 与稀释倍数(代表 PCA)的关系,分析黄毛鼠敏感种群 PCA 与 INR 之间的关系。结果发现,相同稀释浓度下黄毛鼠雄性和雌性血浆所测得的 INR 差异均无统计学意义( $\chi^2=2.33$ ,  $df=34$ )。将雌雄合并,得到敏感黄毛鼠正常 PT 平均为(8.88±0.57)(8.30~9.53)s,以 INR 和对应的 PCA 分别为纵、横坐标,得到黄毛鼠 PCA 标准曲线。直线回归分析结果显示,测得的 INR 与相应的 PCA 的倒数呈直线关系,回归曲线为:INR( $y$ )=34.984/ $x$ +0.688( $x$ =PCA)( $R^2=0.992$ ) (图 1)。

2.2 区分剂量作用下黄毛鼠 PT 指标的变化情况 以 10 mg/kg 标准对黄毛鼠个体单次灌胃处理,对观察期后仍存活个体进行抗性检测法(LFP)复检,筛选出抗性种群和敏感种群。分析结果显示,敏感与抗性黄毛鼠血浆的 PCA 值均迅速下降,24 h 后部分敏感试鼠的血浆由于无法凝固,其 PCA 值降至无穷小;抗性鼠也

有 2 只 PCA 值降至无穷小,可测 PCA 值平均为 2.44, 48 h 后敏感个体开始死亡;72 h 后敏感个体的 PCA 值继续下降,敏感鼠规模性死亡,而抗性个体只有 1 只仍在下降,其余个体 PCA 值开始回升,至 96 h 后,抗性个体 PCA 平均值升至 19.37(图 2)。

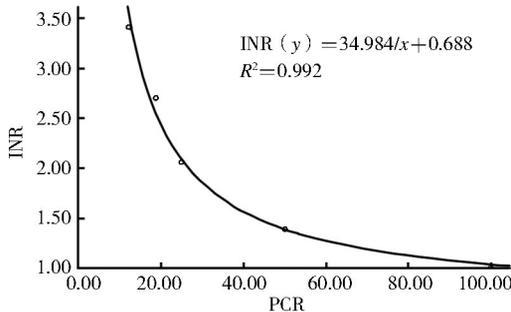
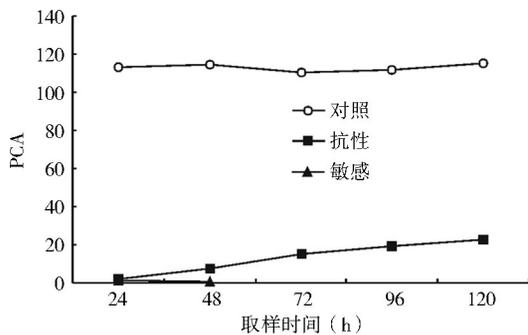


图 1 黄毛鼠凝血反应标准曲线

Figure 1 Standard curve of BCR in *R. losea*

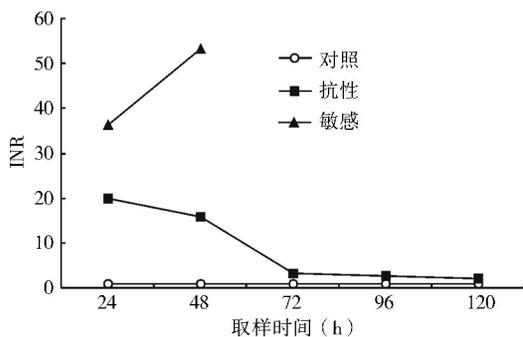


注:为做图方便,将无法凝固的血浆 PT 值均设定为 300 s,对应 PCA 值为 0.66。

图 2 抗性区分剂量下黄毛鼠个体 PCA 指标变化

Figure 2 Difference in PCA between *R. losea* individuals treated with a discriminating dose of warfarin

从 INR 指标看,抗性组试鼠在抗性区分剂量灌胃后,鼠个体的 INR 平均值在 24 h 后达到峰值,随后开始下降,部分试鼠在 48 h 左右达到峰值,随后快速下降;72 h 后抗性试鼠 INR 平均值最低降至 3.22,96 h 后则降至 2.53,120 h 后降至 2.19(图 3)。



注:为做图方便,将无法凝固的血浆 PT 值均设定为 300 s,对应 INR 值为 53.37。

图 3 抗性区分剂量下黄毛鼠个体 INR 指标变化

Figure 3 Difference in INR between *R. losea* individuals treated with a discriminating dose of warfarin

综合上述结果分析可见,区分剂量处理 4 d 后,试鼠的 PCA 基本能代表试鼠的存活状况,PCA < 16.5 的个体或者经两次筛选后全部死亡,证明为敏感鼠个体;PCA ≥ 16.5 的鼠个体由 LFP 检测后最终仍存活,被证明为抗性鼠个体;从 INR 指标看,区分剂量处理后,INR 值 > 4.4 的个体为敏感鼠,反之为抗性鼠。

### 3 讨论

鼠类体内的凝血活动主要决定于维生素 K 依赖性凝血因子的作用,抗凝血杀鼠剂的杀灭能力决定于这些因子的敏感程度,敏感性下降将导致抗药性的产生,而这些因子活性状况综合体现为凝血反应能力<sup>[12]</sup>。因此,通过分析抗凝血杀鼠剂对抗性和敏感害鼠凝血能力的影响情况,将有助于明确害鼠抗药性产生的内在生理机制,探讨科学、合理的鼠害控制策略。

由于鼠类的生存适应性,有些鼠会在食毒期降低取食量得以存活,这种存活个体显然食入药量不足,不能按照抗性个体对待。根据历史实验数据并参考有关资料<sup>[4, 13]</sup>,本实验中采用 10 mg/kg 作为抗药性区分剂量。使用 10 mg/kg 剂量标准的杀鼠灵处理后,敏感与抗性黄毛鼠个体的凝血能力变化情况不同,具体表现药物处理 96 h 后二者凝血反应能力的恢复状况不同,抗性个体的凝血反应能力约恢复至自然种群的 16.5%,而敏感个体则不能。表明该区分剂量所获得的黄毛鼠个体之间,在凝血反应能力上存在明显差异,是本质不同的 2 个个体群。因此,以此为标准进行抗药性判定是可行的,如此则可省略 20 d 的无毒饲养观察期,提高抗药性测定的效率,还可节省大量的人力和物力,是可行的抗药性测定方法。

目前,有关血凝反应法在家栖鼠抗凝血杀鼠剂抗性的研究相对较多<sup>[14]</sup>,研究结果表明,家栖鼠在区分剂量单次处理 4 d 后“PCA = 17(或 INR = 5.0)”可以作为抗性判断标准。与本结果“PCA = 16.5(或 INR = 4.4)”具有差异性,分析其原因可能为:①家栖鼠与农田害鼠在鼠种上的差异;②本研究使用的区分剂量“10 mg/kg”值高于家栖鼠中通常使用的“2 倍或 3 倍 LD<sub>50</sub> 值”,使用较高区分剂量后影响了试鼠相关凝血指标的恢复速度;此外,本研究使用的 10 mg/kg 的剂量单次处理后,敏感个体已经基本死亡,如果从对检测结果的复检操作以及检测人性化角度考虑,实际应用中可以降低区分剂量,这些细节仍有待进一步研究。

### 参考文献

[1] 黄秀清,冯志勇,颜世祥,等.珠江三角洲作物结构变动与害鼠可持续控制技术[J].广东农业科学,2004(2):31-34.

预期效果属于鼠类的行为抗性<sup>[10]</sup>,并非严格意义上的抗性。尽管在第 1 次攻毒试验中黄毛鼠对第一代抗凝血剂的抗性率超过 80%,由于存活鼠对毒饵的拒食行为明显,这些存活鼠是否具有真正意义上的抗性还有待进一步调查。

3.3 害鼠行为抗性的防控对策 行为抗性的产生主要是由于在同一区域反复使用同一种抗凝血剂进行灭鼠,而在每次灭鼠过程中,毒饵的适口性差或毒饵不够量致使部分害鼠仅食入亚致死量,导致残存鼠群产生生理病态反应而拒食摄食过的毒饵<sup>[11-12]</sup>。本研究结果表明攻毒次数越多,一种毒饵连续使用时间越长,产生病态记忆的鼠群数量越大,害鼠甚至对基饵也产生病态记忆而拒食。为防止行为抗性的产生,在实际灭鼠活动中应尽量减少灭鼠次数,充分利用防治阈值指导灭鼠工作。灭鼠时应按常规浓度配制毒饵并采用间歇式饱和投放的方法进行,保证每次的灭鼠效果达到 80% 以上,做到一役达标<sup>[13]</sup>。对已产生抗性的地区,必须更换药物,可轮换使用同一代抗凝血剂中的不同药物,必要时使用第二代抗凝血剂毒杀第一代抗性鼠,还可利用抗凝血增效剂<sup>[14]</sup>和引诱剂<sup>[15]</sup>降低杀鼠剂的使用浓度,提高毒饵的适口性和灭鼠效果,减轻行为抗性的产生。

#### 参考文献

- [1] 黄秀清,冯志勇,颜世祥,等.抗凝血灭鼠剂可持续使用技术研究[J].广东农业科学,2003(6):31-34.
- [2] 冯志勇,姚丹丹,黄立胜,等.黄毛鼠对第一代抗凝血灭鼠剂的抗药性监测[J].植物保护学报,2007,34(4):420-424.
- [3] 董天义.抗凝血灭鼠剂应用技术[M].北京:中国科学技术出版社,2001:1-17.
- [4] 付学锋,田彦林,张洪江,等.对食饵法、鼠夹法监测结果影响因子的初步探讨[J].中国媒介生物学及控制杂志,2009,20(6):519-521.
- [5] OEPP/EPPO. Guideline for the evaluation of resistance to plant protection products: testing rodents for resistance to anticoagulant rodenticides[J]. EPPO Bull, 1995, 25(3):575-593.
- [6] Greaves JH. Resistance to anticoagulant rodenticides[M]// Buckle AP, Smith RH (Eds.). Rodent Pests and Their Control. CAB International, Wallingford, Oxon, uk, 1994:197-217.
- [7] Baert K, Stuyck J, Breynne P, et al. Distribution of anticoagulant resistance in the brown rat in Belgium[J]. Belg J Zool, 2012, 142(1):39-48.
- [8] Rost S, Pelz HJ, Menzel S, et al. Novel mutations in the *VKORC1* gene of wild rats and mice—a response to 50 years of selection pressure by warfarin? [J]. BMC Genetics, 2009, 10(4). doi:10.1186/1471-2156-10-4.
- [9] Huang BH, Feng ZY, Yue LF, et al. Warfarin resistance test and polymorphism screening in the *VKORC1* gene in *Rattus flavipectus* [J]. J Pest Sci, 2011, 84:87-92.
- [10] Greaves JH, Shepherd DS, Quay R. Field trials of second-generation anticoagulants against difenacoum-resistant Norway rat populations [J]. J Hyg London, 1982, 89(2):295-301.
- [11] 刘波.第一代抗凝血灭鼠剂对家栖鼠行为抗性探讨[J].江西医学院学报,2000,40(2):121-122.
- [12] 蒋明伦,李洪卫,郭兆林,等.鼠类对灭鼠剂拒食性及防制研究[J].中国媒介生物学及控制杂志,2001,12(6):459-460.
- [13] 黄秀清,冯志勇,颜世祥.灭鼠后黄毛鼠种群数量回升动态研究[J].中国媒介生物学及控制杂志,1999,10(6):401-404.
- [14] 冯志勇,黄秀清,颜世祥,等.抗凝血灭鼠剂的增效研究[J].广东农业科学,2001(5):44-46.
- [15] 高志祥,冯志勇,郭永旺,等.新型处方灭鼠诱饵的初步研究[J].中国媒介生物学及控制杂志,2011,22(5):436-439.

收稿日期:2012-12-20

(上接第 210 页)

- [2] WHO. Instruction for determining the susceptible or resistance of rodents to anticoagulant rodenticides [R]. World Health Organization Technical report; Series no 843, 1982:9.
- [3] 董天义.抗凝血灭鼠剂应用研究[M].北京:中国科学技术出版社,2001:1-2.
- [4] 冯志勇,姚丹丹,黄立胜,等.黄毛鼠对第一代抗凝血灭鼠剂的抗药性监测[J].植物保护学报,2007,34(4):420-424.
- [5] Wang JS, Feng ZY, Yao DD, et al. Warfarin resistance in *Rattus losea* in Guangdong province, China [J]. Pest Biochem Physiol, 2008, 91(2):90-95.
- [6] MacNicol AD. The role of altered vitamin K metabolism in anticoagulant resistance in rodents: In Seventeenth Steenbock symposium on current advances in vitamin research (Edited by Sutt JW.) [M]. New York: Elsevier, 1988:407-417.
- [7] MacNicol AD, Gill JE. Revised methodology for a blood clotting response test for identification of warfarin-resistant Norway rat (*Rattus norvegicus* Berk) [J]. EPPO Bulletin, 1993, 23(1):701-707.
- [8] Prescott CV, Buckle AP. Blood-clotting response tests for resistance to diphacinone and chlorophacinone in the Norway rat (*Rattus norvegicus* Berk) [J]. Crop Prot, 2000, 19(5):467-473.
- [9] Gill JE, Kerins GM, Langton SD, et al. The development of a blood clotting responses test for discriminating between difenacoum-resistant and susceptible Norway rat (*Rattus norvegicus* Berk) [J]. Comp Biochem Physiol, 1993, 104C(1):29-36.
- [10] OEPP/EPPO. Guideline for the evaluation of resistance to plant protection Products: Testing rodents for resistance to anticoagulant rodenticides[J]. EPPO Bull, 1995, 25(3):575-593.
- [11] Prescott CV. A reappraisal of blood clotting response tests for anticoagulant resistance and a proposal for standardized BCR test method [S]. RRAC Monograph No.1 Crop International, Brussels, Belgium, 2003.
- [12] Thijssen HH. Warfarin-based rodenticides: mode of action and mechanism of resistance[J]. Pestic Sci, 1995, 43(1):73-78.
- [13] 姚丹丹,冯志勇,高志祥,等.广州市黄毛鼠对抗凝血灭鼠剂的回避行为研究[M]//全国农业技术推广服务中心.科学用药,绿色防控.北京:中国农业出版社,2011:408-412.
- [14] 孙毅,梁练,易建荣,等.黄胸鼠对溴敌隆抗药性的区分剂量测定及其凝血反应的影响[J].中国媒介生物学及控制杂志,2007,18(1):4-8.

收稿日期:2012-11-27