

# 淡色库蚊抗药性测定中不同容器对测定结果的影响研究

林国松<sup>1,2</sup>, 张晓越<sup>1</sup>, 刘欣<sup>1</sup>, 孟凤霞<sup>1</sup>

1 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所媒介生物控制室, 传染病预防控制国家重点实验室, 世界卫生组织媒介生物监测与管理合作中心, 北京 102206; 2 泰山医学院公共卫生学院, 山东 泰安 271016

**摘要:** **目的** 评估淡色库蚊抗药性测定中容器类型对结果的影响, 确定能否用一次性杯子代替玻璃烧杯进行实验, 从而达到提高实验效率的目的。 **方法** 从野外采集淡色库蚊幼虫, 用WHO推荐的幼虫浸渍法, 分别测定在玻璃烧杯、一次性塑料杯或一次性纸杯3种容器类型下, 淡色库蚊幼虫对溴氰菊酯、仲丁威和双硫磷的 $LC_{50}$ 及95%可信区间(95%CI), 并比较其差异。 **结果** 在玻璃烧杯、一次性塑料杯和一次性纸杯依次作为实验容器的条件下, 淡色库蚊幼虫对溴氰菊酯的 $LC_{50}$ 及95%CI分别为0.002 009(0.001 654~0.002 449)、0.003 858(0.003 062~0.005 224)和0.005 459(0.004 051~0.008 757) mg/L, 玻璃杯与2种一次性杯子间的结果差异有统计学意义; 对仲丁威的 $LC_{50}$ 及95%CI分别为0.3470(0.3059~0.3821)、0.2575(0.2118~0.3095)和0.4844(0.4460~0.5232) mg/L, 玻璃杯与一次性塑料杯差异无统计学意义, 与一次性纸杯差异有统计学意义; 而对双硫磷的 $LC_{50}$ 及95%CI分别为0.000 955(0.000 816~0.001 094)、0.003 007(0.002 661~0.003 407)和0.003 830(0.003 450~0.004 256) mg/L, 玻璃杯与2种一次性杯子间差异均有统计学意义。用不同杯子测定蚊幼虫对杀虫剂的敏感性, 溴氰菊酯的测定结果受浓度的影响小于双硫磷; 双硫磷浓度越高杯子的影响越小。 **结论** 在对蚊幼虫的抗药性测定中, 玻璃杯是最佳选择, 而一次性杯子可能因对杀虫剂有吸附作用而使测定的结果发生偏差, 使用一次性杯子替代玻璃杯时应该特别注意现做评估。

**关键词:** 淡色库蚊; 抗药性监测; 容器类型; 杀虫剂

**中图分类号:** R384.1; S481<sup>+</sup>.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-4692(2014)05-0385-04

**DOI:** 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.05.001

## Influence of containers on insecticide resistance bioassay in *Culex pipiens pallens* larvae

LIN Guo-song<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-yue<sup>1</sup>, LIU Xin<sup>1</sup>, MENG Feng-xia<sup>1</sup>

1 WHO Collaborating Centre for Vector Surveillance and Management, State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2 College of Public Health, Taishan Medical University, Tai'an 271016, Shandong Province, China

Corresponding author: MENG Feng-xia, Email: mengfengxia@icdc.cn

Supported by the National Science and Technology Major Projects of China (No. 2012ZX10004-219)

**Abstract: Objective** To investigate the influence of containers on the insecticide resistance bioassay among *Culex pipiens pallens* larvae, and to determine whether disposable cups can replace glass beakers in these tests with the purpose of increasing experimental efficiency. **Methods** Using wild *Cx. pipiens pallens* larvae, the susceptibility of larvae ( $LC_{50}$  with 95% CI) to deltamethrin, temephos, and BMPC was determined using the glass beaker, disposable plastic cup, or disposable paper cup, with impregnation method as recommended by WHO, and the  $LC_{50}$  values measured using different containers were compared. **Results** The  $LC_{50}$  (95% CI) values of *Cx. pipiens pallens* larvae to deltamethrin measured using the glass beaker, disposable plastic cup, and disposable paper cup were 0.002 009 (0.001 654-0.002 449), 0.003 858 (0.003 062-0.005 224), and 0.005 459 (0.004 051-0.008 757) mg/L, respectively; there were significant differences in  $LC_{50}$  value between the glass beaker group and the other two groups. To temephos, the  $LC_{50}$  (95% CI) values were 0.000 955 (0.000 816-0.001 094), 0.003 007 (0.002 661-0.003 407), and 0.003 830 (0.003 450-0.004 256) mg/L, respectively; there were significant differences between the glass beaker group and the other two groups. To BMPC, the  $LC_{50}$  (95% CI) values were 0.3470 (0.3059-0.3821), 0.2575 (0.2118-0.3095), and 0.4844 (0.4460-0.5232) mg/L, respectively; there was a significant difference between the glass beaker group and disposable paper cup group, but no significant difference was found between the glass beaker group and disposable plastic cup group. The

**基金项目:** 国家科技重大专项课题(2012ZX10004-219)

**作者简介:** 林国松, 男, 主要从事传染病媒介蚊虫的控制技术研究, Email: linguosong90@163.com

**通讯作者:** 孟凤霞, Email: mengfengxia@icdc.cn

susceptibility of *Cx. pipiens pallens* larvae to deltamethrin was less concentration-dependent as compared with that to temephos; with increasing temephos concentration, susceptibility became less dependent on different types of containers. **Conclusion** In the bioassay of *Cx. pipiens pallens* larvae's resistance to insecticide, glass beaker is the best choice. Disposable cups may affect the results due to adsorption of pesticides. Special attention should be paid when using disposable cups instead of the glass beaker, and evaluation should be performed in these situations.

**Key words:** *Culex pipiens pallens*; Insecticide resistance monitoring; Container type; Insecticide

蚊虫是我国重要的传染病传播媒介,能引起登革热、疟疾、流行性乙型脑炎(乙脑)的暴发流行;同时也是重要的骚扰性害虫,为控制其危害,全国每年都生产和使用大量的化学杀虫剂<sup>[1]</sup>。而长期大量地使用杀虫剂,使很多区域的蚊虫对多数杀虫剂已产生不同程度的抗药性<sup>[2-4]</sup>。为了评价蚊虫的抗药性以便指导杀虫剂的合理使用,全国各地每年都会进行大量的蚊虫抗药性实验。而实验方法也从针对蚊幼虫的幼虫浸渍法、成虫的接触筒法和点滴法发展到蚊虫的分子生物学检测和生化检测<sup>[5]</sup>。然而实验过程费时费力,为了尽可能地提高实验效率,需要从可行的步骤中节省时间。由于国内外尚无能不用一次性杯子代替玻璃烧杯进行实验的理论依据的相关报道,但地方省(市)疾控人员为了节省时间有的在用一次性杯子进行实验,因此为了保证抗药性监测数据的可比性,展开玻璃烧杯能否被市售一次性杯子替代的相关研究尤其重要。

淡色库蚊(*Culex pipiens pallens*)广泛分布于北纬 32°以北的各省,常孳生于污水沟、污水坑、水塘、容器积水等处,为我国北方和南方班氏丝虫病的主要传播媒介。此外,淡色库蚊还被认为是乙脑病毒的可能传播媒介<sup>[6]</sup>。本研究以淡色库蚊为例,分别测定在 3 种容器类型下其对 3 类常用杀虫剂的敏感性,期望得出玻璃烧杯在何种情况下可以进行替代的理论依据,现将结果报告如下。

## 1 材料与方 法

1.1 供试药剂 94.62% 溴氰菊酯、94.18% 仲丁威、95.10% 双硫磷,均由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所媒介生物室提供。

1.2 测定容器 博美 BOMEX 牌 250 ml 玻璃烧杯(北京玻璃仪器厂生产)、妙洁牌 320 ml 一次性塑料杯(苏州市苏容塑料制品厂生产,材质为聚丙烯)、绿奥牌 250 ml 一次性纸杯(北京绿奥纸杯厂生产,内表面材质为聚乙烯,外层材质为纸浆)。

1.3 试虫 采集点位于昌平区百善镇(40°11.097' N, 116°18.165' E)一水沟内。采集大龄幼虫约 10 000 只,带回实验室饲养。控制饲养温度为(26±1)℃,相对湿度为(60±10)%,选取 3 龄末 4 龄初幼虫进行实验。

1.4 幼虫对杀虫剂的敏感性测定方法 以丙酮为溶

剂将原药稀释成 5~7 个浓度梯度。在 250 ml 烧杯中,分别加入 0.1 ml 待测药液和隔夜自来水(脱氯水),充分混匀的 200 ml 药液,加入 20 条健康幼虫,在温度为 26℃,相对湿度为 70%,光周期(L:D=16:8)的培养箱中饲养 24 h,记录死亡数,剔除化蛹数,计算死亡率;对照组加入相应量的丙酮,实验重复 3 次。若化蛹率>10%,对照组死亡率>20%,实验无效,需重做。然后再分别用容积为 320 ml 的一次性塑料杯和 250 ml 的一次性纸杯重复上述实验过程。

幼虫死亡判定标准<sup>[7]</sup>:用利器轻触幼虫呼吸管,不能运动或仅对刺激做微小反应(抽搐),并且不能主动逃逸避免刺激的持续发生,即为死亡。

1.5 统计与计算 用 SPSS 16.0 软件进行数据统计,记录处理试虫数。通过分析得出半数致死浓度(LC<sub>50</sub>)值及其 95% 可信区间(95%CI)、毒力回归线的斜率 *b* 值及 *s<sub>e</sub>*、 $\chi^2$  值、自由度。若 5%<对照组死亡率<20%,用 Abbott 公式校正处理死亡率。以 LC<sub>50</sub> 的 95%CI 是否重叠和重叠程度的大小判断不同容器类型对实验结果的影响差异是否有统计学意义,并以此作为玻璃烧杯能否被替代的参考依据。

$$\text{校正死亡率}(\%) = \frac{\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}}{1 - \text{对照组死亡率}} \times 100$$

## 2 结 果

2.1 容器对淡色库蚊野外种群抗药性测定结果的影响 在玻璃烧杯、一次性塑料杯和一次性纸杯分别作为盛药容器下,应用浸渍法测得的淡色库蚊对溴氰菊酯的 LC<sub>50</sub> 及其 95%CI 分别为 0.002 009(0.001 654~0.002 449)、0.003 858(0.003 062~0.005 224) 和 0.005 459(0.004 051~0.008 757) mg/L,玻璃烧杯与一次性杯子的 95%CI 没有重叠,由此可见玻璃烧杯与一次性塑料杯和纸杯差异有统计学意义,故可作为一次性塑料杯或纸杯不能代替玻璃烧杯的依据;对仲丁威的 LC<sub>50</sub> 及其 95%CI 分别为 0.3470(0.3059~0.3821)、0.2575(0.2118~0.3095) 和 0.4844(0.4460~0.5232) mg/L,玻璃烧杯与一次性塑料杯的 95%CI 有重叠而与一次性纸杯的 95%CI 没有重叠,由此可见玻璃烧杯与一次性塑料杯差异无统计学意义,而玻璃烧杯与一次性纸杯差异有统计学意义,故可以作为一次性塑料杯可替代玻璃烧杯的参考依据;对双硫磷的 LC<sub>50</sub> 及其 95%CI

分别为 0.000 955 (0.000 816~0.001 094)、0.003 007 (0.002 661~0.003 407) 和 0.003 830 (0.003 450~0.004 256) mg/L, 玻璃烧杯与一次性塑料杯和纸杯的

95%CI 均无重叠, 可见玻璃烧杯与一次性塑料杯和纸杯差异均有统计学意义, 故不可用一次性塑料杯或者纸杯代替玻璃烧杯(表 1)。

表 1 不同容器类型下淡色库蚊野外种群对 3 种杀虫剂的敏感性

Table 1 Comparison of the susceptibility of wild *Cx. pipiens pallens* larvae to three insecticides assayed using three types of containers

杀虫剂	容器类型	试虫数 (n)	LC <sub>50</sub> 及其 95%CI (mg/L)	斜率 b 值 (s <sub>2</sub> )	χ <sup>2</sup> 值 (df)	P 值	LC <sub>50</sub> 差异程度 <sup>a</sup>
溴氰菊酯	玻璃杯	316	0.002 009(0.001 654~0.002 449)	2.1183(0.2480)	0.9710(3)	0.8083	1.0
	塑料杯	325	0.003 858(0.003 062~0.005 224)	1.8420(0.2822)	0.6622(3)	0.8821	1.9
	纸杯	324	0.005 459(0.004 051~0.008 757)	1.5595(0.2537)	0.2397(3)	0.9709	2.7
仲丁威	玻璃杯	316	0.3470(0.3059~0.3821)	3.5017(0.5547)	0.2257(3)	0.9733	1.0
	塑料杯	291	0.2575(0.2118~0.3095)	2.0807(0.2198)	0.6133(3)	0.8934	0.7
	纸杯	313	0.4844(0.4460~0.5232)	4.4836(0.5781)	0.7717(3)	0.8562	1.4
双硫磷	玻璃杯	334	0.000 955(0.000 816~0.001 094)	3.3900(0.3908)	1.5190(3)	0.6779	1.0
	塑料杯	336	0.003 007(0.002 661~0.003 407)	3.4738(0.3099)	1.1916(3)	0.7550	3.1
	纸杯	332	0.003 830(0.003 450~0.004 256)	4.9580(0.4962)	0.5776(3)	0.9015	4.0

注: a. LC<sub>50</sub> 差异程度 = 测定组的 LC<sub>50</sub>/玻璃杯组的 LC<sub>50</sub>。

## 2.2 不同剂量杀虫剂对抗药性测定结果的影响

### 2.2.1 溴氰菊酯的敏感性测定中 3 种容器对结果的影响

由图 1 可以看出, 在相同浓度时蚊虫的死亡率由高到低均为玻璃杯 > 一次性塑料杯 > 一次性纸杯, 而且玻璃杯蚊虫死亡率与一次性杯子蚊虫死亡率之比有一个先增加后减少最后趋于 1.0 的趋势, 随着药液浓度的升高, 玻璃杯蚊虫死亡率与一次性塑料杯蚊虫死亡率之比依次为 1.0、1.5、1.8、1.5 和 1.2, 而与一次性纸杯蚊虫死亡率之比依次为 1.5、2.2、1.9、1.9 和 1.5。即玻璃杯与一次性杯子对实验结果影响的差异随实验浓度的增加先增大后减小。

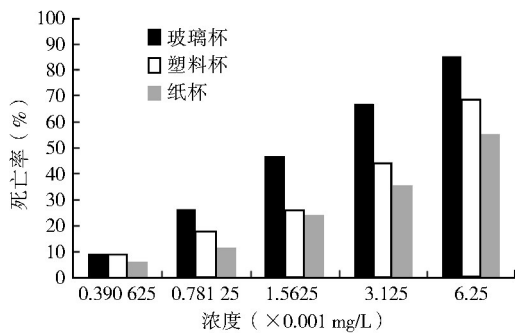


图 1 不同浓度溴氰菊酯测定淡色库蚊幼虫在 3 种容器中的死亡率

Figure 1 The mortality of *Cx. pipiens pallens* larvae exposed to different concentrations of deltamethrin measured using three types of containers

### 2.2.2 双硫磷的敏感性测定中 3 种容器对结果的影响

玻璃烧杯、一次性塑料杯和一次性纸杯分别作为盛药容器时, 淡色库蚊对双硫磷的药液浓度与死亡率关系见图 2。与图 1 不同之处在于玻璃杯蚊虫死亡率与一次性纸杯蚊虫死亡率之比是一个逐渐减小的趋势, 随

着药液浓度的升高, 玻璃杯蚊虫死亡率与一次性塑料杯蚊虫死亡率之比依次为 19.1、6.0、2.8、1.2 和 1.0, 而与一次性纸杯蚊虫死亡率之比依次为 42.9、5.1、1.4 和 1.0。从死亡率之比可见, 玻璃杯与一次性杯子对结果影响的差异随实验浓度的倍增而急剧减小。

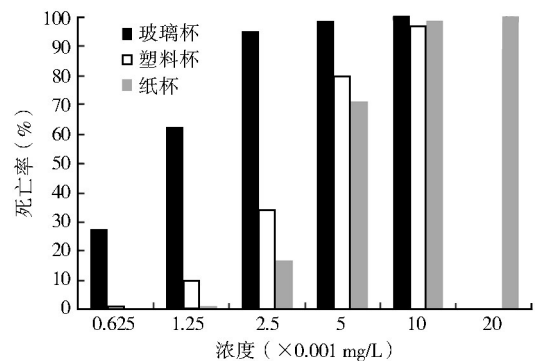


图 2 不同浓度双硫磷测定淡色库蚊幼虫在 3 种容器中的死亡率

Figure 2 The mortality of *Cx. pipiens pallens* larvae exposed to different concentrations of temephos measured using three types of containers

## 3 讨论

蚊传疾病的控制是传染病预防控制的重要内容, 每年进行及时有效的蚊虫抗药性评价, 可通过合理选择杀虫剂以减缓蚊虫抗药性的发展; 亦可以在传染病发生时通过正确使用杀虫剂控制疾病的发展与蔓延。因此, 对蚊虫的抗药性进行检测甚为重要。

本实验以玻璃烧杯作为盛药容器能否被市售一次性纸杯替代为出发点而进行, 实验发现: 在不同杯子类型和不同药液浓度下, 淡色库蚊幼虫对不同种类的杀

(下转第 392 页)



的血淋巴,是96孔酶标板法使用血淋巴量的7倍。②简单快速。分光光度计法每次只能检测1个样品,而96孔酶标板法1次可以同时检测多个样品。③稳定灵敏。分光光度计法每次检测需要人工调试,获得的重复数据间误差较大,96孔酶标板法只需将每个样品定容,全自动检测,数据稳定。总之,96孔酶标板法比分光光度计法用于检测家蝇血淋巴的黑化反应更加方便快捷。

#### 参考文献

- [1] Cerenius L, Lee BL, Soderhall K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity [J]. Trends Immunol, 2008, 29:263-271.
- [2] Tang H. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila* [J]. Fly (Austin), 2009, 3(1):105-111.
- [3] Binggeli O, Neyen C, Poidevin M, et al. Prophenoloxidase activation is required for survival to microbial infections in *Drosophila* [J]. PLoS Pathog, 2014, 10(5):e1004067.
- [4] An C, Zhang M, Chu Y, et al. Serine protease MP2 activates prophenoloxidase in the melanization immune response of *Drosophila melanogaster* [J]. PLoS One, 2013, 8(11):e79533.

- [5] Nappi A, Poirie M, Carton Y. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps [J]. Adv Parasitol, 2009, 70:99-121.
- [6] Cerenius L, Kawabata S, Lee BL, et al. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity [J]. Trends Biochem Sci, 2010, 35(10):575-583.
- [7] Chen K, Liu C, He Y, et al. A short-type peptidoglycan recognition protein from the silkworm: expression, characterization and involvement in the prophenoloxidase activation pathway [J]. Dev Comp Immunol, 2014, 45(1):1-9.
- [8] Cao X, Zhou M, Wang C, et al. *Musca domestica* pupae Lectin improves the immunomodulatory activity of macrophages by activating nuclear factor- $\kappa$ B [J]. J Med Food, 2012, 15 (2): 145-151.
- [9] Sun SG, Liu WG, Wang JG, et al. Endonuclease activity of phenol oxidase from *Musca domestica* larvae [J]. Biol Bull, 2008, 215(1): 108-114.
- [10] 李殿香, 刘晖, 王军, 等. 家蝇对病原入侵黑化反应的研究 [J]. 中华卫生杀虫药械, 2013, 19(3):193-196.
- [11] 王秀华, 雷质文, 黄健, 等. 96孔酶标板法测定对虾血淋巴的过氧化物酶相对活性的初步研究 [J]. 海洋科学, 2001, 25(11): 55-58.

收稿日期:2014-04-24

(上接第387页)

虫剂敏感性有较大差异,比如,在对溴氰菊酯的敏感性测定中,随着药液浓度的倍增,玻璃杯与一次性塑料杯的差异最大时仅为1.8倍,玻璃杯与一次性纸杯的差异最大时也只达到2.2倍。而在对双硫磷的测定中,药液的浓度仅从0.000 625 mg/L升高到0.001 25 mg/L,玻璃杯与一次性塑料杯的差异就从19.1倍降至6.0倍;而当浓度从0.001 25 mg/L升高到0.0025 mg/L时,玻璃杯与一次性纸杯的差异竟从42.9倍降至5.1倍。可能与杯子内表面材质的不同有关,在市场上销售的一次性杯子材质大都为聚乙烯(PE)、聚苯乙烯(PS)和聚丙烯(PP),这些材质会不同程度地吸附药液,从而对结果造成影响。实验中也发现玻璃杯与一次性杯子差异会随着药液浓度的增加而减小,故可以认为在做敏感幼虫抗药性测试时,用一次性杯子作为盛药容器会对测定结果造成很大的影响,不过这种影响会随着蚊幼虫抗性的增加而减小。因此为获得准确的蚊虫抗性数据,在使用一次性杯子替代玻璃杯时现做评估尤为重要。

同样本次实验也存在局限性,此次实验是以北京市昌平区淡色库蚊幼虫作为试虫,试虫的采集地点、采

集时间以及实验所用一次性杯子的生产厂家、批次的不同均可能对结果造成影响。因此本次实验所得结论在按蚊、伊蚊以及其他库蚊中能否成立,还需进一步做相关实验。

#### 参考文献

- [1] 孟凤霞, 靳建超, 陈云, 等. 我国淡色库蚊/致倦库蚊对常用化学杀虫剂的抗药性 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2011, 22(6): 517-520, 528.
- [2] 靳建超, 孟凤霞, 苏建亚, 等. 辽宁省东港市三带喙库蚊对常用杀虫剂的抗药性 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2010, 21(3): 188-191.
- [3] 刘斯璐, 崔峰, 燕帅国, 等. 中国媒介蚊虫对有机磷类和拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性调查 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2011, 22(2):184-189.
- [4] 徐燕, 刘慧, 杨维芳, 等. 淡色库蚊对常用杀虫剂的抗性现状及治理对策 [J]. 中华卫生杀虫药械, 2010, 16(5):344-346.
- [5] 刘慧, 孟凤霞, 鲁玉杰. 蚊虫对拟除虫菊酯的抗药性检测技术研究进展 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2010, 17(1):55-60.
- [6] 汪诚信, 刘起勇, 姜志宽. 中国有害生物治理 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 339.
- [7] 陈云, 孟凤霞, 王学军, 等. 山东省历城区三带喙库蚊对常用杀虫剂的抗药性 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 23(2):89-92.

收稿日期:2014-04-30