

中华按蚊对常用杀虫剂相对敏感基线 和诊断剂量研究

范明秋, 周毅彬, 刘曜, 冷培恩

上海市疾病预防控制中心病媒生物防治科, 上海 200336

摘要: **目的** 建立中华按蚊对常用杀虫剂的相对敏感基线。**方法** 中华按蚊引自中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 室内饲养 50 年以上, 未接触任何杀虫剂。分别采用药液浸渍法和滤纸接触法测定幼虫和成蚊对常用杀虫剂的敏感度。**结果** 用药液浸渍法建立了溴氰菊酯、高效氯氰菊酯、氯菊酯、敌敌畏、仲丁威、杀螟硫磷和双硫磷 7 种杀虫剂对幼虫的敏感毒力基线, 其结果分别为 $y=13.0586+3.8987x$ 、 $y=9.2950+2.1510x$ 、 $y=10.3449+4.4594x$ 、 $y=4.3319+8.7669x$ 、 $y=11.3541+11.2014x$ 、 $y=11.5447+6.9681x$ 、 $y=10.8033+4.6466x$ 。用滤纸接触法建立了溴氰菊酯、高效氯氰菊酯、氯菊酯和仲丁威 4 种杀虫剂对成蚊的敏感毒力基线, 其结果分别为 $y=12.5204+3.6871x$ 、 $y=10.2596+3.0291x$ 、 $y=8.4266+2.6610x$ 和 $y=13.8210+5.0963x$ 。**结论** 建立了 7 种常用杀虫剂对中华按蚊幼虫和 4 种常用杀虫剂对中华按蚊成蚊的敏感毒力基线, 测定结果可以作为我国中华按蚊幼虫和成蚊区分剂量的参考值。

关键词: 中华按蚊; 敏感品系; 区分剂量; 抗药性监测

中图分类号: R384.1; S481*.4 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2014)01-0008-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.01.002

Establishment of susceptibility baselines of *Anopheles sinensis* to various insecticides and their diagnostic doses

FAN Ming-qiu, ZHOU Yi-bin, LIU Yao, LENG Pei-en

Shanghai Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China

Corresponding author: LENG Pei-en, Email: peleng@scdc.sh.cn

Supported by the Major National Science and Technology Projects of China (No. 2008ZX10004-010)

Abstract: Objective To establish the susceptibility baselines of *Anopheles sinensis* to commonly used insecticides. **Methods** The *An. sinensis* was provided by the National Institute of Parasitic Diseases Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, which was reared in the laboratory for more than 50 years without exposure to any pesticides. Impregnation method and filter paper contact method were used to determine the susceptibility to commonly used insecticides for the larvae and adults of *An. sinensis*. **Results** The susceptibility baselines of *An. sinensis* larvae to deltamethrin, beta-cypermethrin, permethrin, dichlorvos, BPMC, fenitrothion, and temephos were established by impregnation method; the results were described as $y=13.0586+3.8987x$, $y=9.2950+2.1510x$, $y=10.3449+4.4594x$, $y=4.3319+8.7669x$, $y=11.3541+11.2014x$, $y=11.5447+6.9681x$, and $y=10.8033+4.6466x$, respectively. The susceptibility baselines of adult *An. sinensis* to deltamethrin, beta-cypermethrin, permethrin, and BPMC were established by filter paper contact method; the results were described as $y=12.5204+3.6871x$, $y=10.2596+3.0291x$, $y=8.4266+2.6610x$, and $y=13.8210+5.0963x$, respectively. **Conclusion** The susceptibility baselines of *An. sinensis* larvae to seven insecticides and those of adult *An. sinensis* to four insecticides have been established. The results can be used as the reference for the discriminating doses for the larvae and adults of *An. sinensis* in China.

Key words: *Anopheles sinensis*; Susceptible strain; Discriminating dose; Resistance monitoring

敏感毒力基线是获得某个敏感纯合子的昆虫种群对某种杀虫剂的毒力回归线^[1]。毒力回归线又称剂量对数死亡概率值回归直线(LD-p 线)。可用 $y=a+bx$ 来表示, 其中 y 为概率值, x 为浓度对数, a 值是截距, b

值是回归直线的坡度(slope), b 值也是分散程度的代表数值。 b 值越大, 则分散程度越小, 即这一群体对杀虫剂的反应较为均匀。反之, b 值越小, 分散程度越大, 这一群体有更大的异质性, 其抗药性之间的差异较大^[1]。任何一种抗性监测方法在推广应用前, 必须建立可靠的敏感毒力基线, 只有具备了敏感基线, 才能确定区分剂量, 才能准确地判断媒介害虫种群是否已经产生抗药性及抗药的程度和范围^[2]。

基金项目: 国家科技重大专项课题(2008ZX10004-010)

作者简介: 范明秋, 女, 主管医师, 从事病媒生物防治及研究。

Email: mqfan@scdc.sh.cn

通讯作者: 冷培恩, Email: peleng@scdc.sh.cn

诊断剂量也称区分剂量,为用来杀死一种昆虫群体中所有敏感个体,而几乎不杀死该群体中表现型抗性个体(包括抗性杂合子和抗性纯合子个体)的某一杀虫剂的剂量^[3]。依据 WHO 以及蚊虫抗药性检测方法国家标准,一般以 2 倍 LC_{99} 或 $LC_{99.9}$ 值区别抗性和敏感种群^[4-5]。 LC_{99} 或 $LC_{99.9}$ 是由敏感品系的敏感基线计算得到的与死亡率 99% 或 99.9% 相对应的杀虫药剂剂量值。诊断剂量法是联合国粮食及农业组织建议用于害虫抗性田间监测的方法,它可以区分种群抗性个体和敏感个体,能监测种群中抗性个体频率的微小变化,无论是用于早期诊断还是抗性治理措施的效果评估,都比致死中浓度(LC_{50})或致死中量(LD_{50})更灵敏、准确^[6]。目前,库蚊抗药性的监测和研究报道较多^[7-10],但有关按蚊抗药性的监测和研究较少^[10-13]。由于缺乏中华按蚊(*Anopheles sinensis*)的实验室敏感品系,且实验室驯化困难,影响了我国相关抗药性监测工作的开展和有关研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 供试中华按蚊,引自中国疾病预防控制中心(CDC)寄生虫病预防控制所,1960 年代饲养至今,未接触过任何杀虫剂,在本实验室饲养至第 6 代后作为供试虫种。

1.1.2 实验室饲养条件 室温(28 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(70 ± 5)%,每天光照约为 12 h。使用脱氯水(恒温室内放置 24 h 以上的自来水)。

1.1.3 供试药剂 拟除虫菊酯类杀虫剂:98% 溴氰菊酯、97% 高效氯氰菊酯、95% 氯菊酯;有机磷类杀虫剂:95% 杀螟硫磷、91.56% 双硫磷、95% 敌敌畏;氨基甲酸酯类杀虫剂:95% 仲丁威。所有杀虫剂原药均由中国 CDC 传染病预防控制所媒介生物控制室提供。

丙酮(苏州市三杰化学品科技有限公司)、乙醚(常熟市杨园化工有限公司)、矿物白油(国药集团化学试剂公司),均为分析纯级。

1.1.4 实验仪器 CLIMACELL 系列人工气候箱(MMM Medcenter GmbH)、Sartorius 电子天平(德国赛多利斯)、海尔普通家用冰箱。

1.2 抗药性测定方法

1.2.1 幼虫测定方法 蚊幼虫的抗药性检测最常用的方法是幼虫药液浸渍法,又称兴奋度测定,为 WHO 推荐使用的生物测定方法。通过毒力回归线和区分剂量 2 种方法可以测定幼虫敏感程度,对抗药性做出评估。

测定步骤:每个药物确定 5~6 个浓度梯度,观察各浓度组死亡数,计算 LC_{50} 。每只搪瓷碗放入 199 ml

脱氯水,分别加入 1 ml 不同浓度杀虫剂丙酮液并搅拌均匀,合计成 200 ml 水溶液。再将 50 条 III 龄末 IV 龄初幼虫倒入搪瓷碗内。静置 24 h 后观察实验结果,检查死亡数。实验设置了对照组,即用 1 ml 丙酮加入到 199 ml 脱氯水中作为空白对照。实验重复 3 次。若化蛹率超过 10%,对照组死亡率 > 20%,实验无效重做。实验期间室温保持在 27°C 左右。

幼虫死亡判断标准: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)并且不能主动逃避避免刺激的持续发生,判定为死亡。

1.2.2 成蚊测定方法 滤纸接触法为 Busvine 所首创,曾被称为 Busvine-Nash 法。后又经 WHO 多次审定修改,现已被推荐为成蚊抗性测定的标准方法(WHO 法)。药纸的配制:将白油和乙醚按 1:2 比例混合作为溶剂。杀虫剂按需要量溶解其中,配成一定浓度,吸取 2.14 ml 均匀滴于 $16.0 \text{ cm} \times 12.5 \text{ cm}$ 的新华 I 号滤纸上。2 h 后,待溶剂挥发后即可使用^[7]。

测定步骤:每个药物确定 5~6 个浓度梯度,观察各浓度组死亡数,计算 LC_{50} 。吸取 25 个未吸血的雌蚊放入恢复筒内,然后抽开隔板,将恢复筒内的蚊虫吹入装有药纸的接触筒内,迅速关闭隔板,将筒放平,此时开始计算接触时间,接触 1 h 后再次抽开隔板,将蚊虫吹入恢复筒内,再将隔板关闭,取下接触筒,将恢复筒直立,用浸有 5% 糖水的棉花团置于尼龙纱网上,保持在室温 $25 \sim 30^{\circ}\text{C}$,湿度(70 ± 5)% 的环境内。记录接触药纸 1 h 击倒数,恢复饲养 24 h 后检查死亡数。同时设立空白对照,实验重复 3 次。若对照组死亡率 > 20% 时,实验无效重做。

成蚊击倒判断标准:试虫翻背,腹部向上。

成蚊死亡判断标准:身体翻转、侧歪不能运动或四肢可以轻微颤动。

1.2.3 统计与计算 用 DPS 6.5 软件进行数据统计,记录处理虫数。通过分析获得 LC_{50} 、 LC_{95} 、 LC_{99} 、95% 置信限(95%CI)、毒力回归线的斜率 b 值及其标准差、 χ^2 值、自由度。若 $5\% < \text{对照组死亡率/击倒率} < 20\%$,用 Abbott 公式校正处理死亡率/击倒率(见公式)。并以 LC_{50} 的 95%CI 是否重叠作为判断不同类型杀虫剂的毒力差异是否有统计学意义。

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

2 结果

2.1 实验室杀虫剂对中华按蚊敏感品系幼虫的相对敏感基线和区分剂量测定 实验室拟除虫菊酯类药剂溴氰菊酯、高效氯氰菊酯、氯菊酯对中华按蚊敏感品系

幼虫的相对敏感基线 LC_{50} 及其 95% CI 分别为 0.0086 (0.0066~0.0115)、0.0101 (0.0089~0.0115) 和 0.0633 (0.0541~0.0755)mg/L;有机磷类杀虫剂敌敌畏、杀螟硫磷、双硫磷的相对敏感基线 LC_{50} 及其 95% CI 分别为 1.1918 (1.1184~1.2721)、0.1150 (0.1107~0.1192) 和 0.0564

(0.0531~0.0596)mg/L;氨基甲酸酯类杀虫剂仲丁威的相对敏感基线 LC_{50} 及其 95% CI 为 0.2709 (0.2617~0.2825)mg/L(表 1)。中华按蚊实验室敏感品系幼虫对不同杀虫剂的敏感度由高到低依次为溴氰菊酯、高效氯氰菊酯、双硫磷、氯菊酯、杀螟硫磷、仲丁威、敌敌畏。

表 1 实验室常用杀虫剂对中华按蚊敏感品系幼虫的毒力(浸渍法)

Table 1 Lethal concentrations of commonly used insecticides to susceptible strain of *An. sinensis* larvae (impregnation method)

杀虫剂	LC_{50} 及其 95% CI (mg/L)	LC_{99} (mg/L)	毒力回归方程 ($y=a+bx$)	区分剂量 (mg/L)
溴氰菊酯	0.0086(0.0066~0.0115)	0.0339	13.0586+3.8987x	0.0678
高效氯氰菊酯	0.0101(0.0089~0.0115)	0.1216	9.2950+2.1510x	0.2432
氯菊酯	0.0633(0.0541~0.0755)	0.2104	10.3449+4.4594x	0.4208
敌敌畏	1.1918(1.1184~1.2721)	2.1957	4.3319+8.7669x	4.3914
仲丁威	0.2709(0.2617~0.2825)	0.4369	11.3541+11.2014x	0.8738
杀螟硫磷	0.1150(0.1107~0.1192)	0.2481	11.5447+6.9681x	0.4962
双硫磷	0.0564(0.0531~0.0596)	0.1785	10.8033+4.6466x	0.3570

实验室拟除虫菊酯类药剂溴氰菊酯、高效氯氰菊酯、氯菊酯对中华按蚊敏感品系幼虫的区分剂量分别为 0.0678、0.2432 和 0.4208 mg/L;有机磷类杀虫剂敌敌畏、杀螟硫磷、双硫磷的区分剂量分别为 4.3914、0.4962 和 0.3570 mg/L;氨基甲酸酯类杀虫剂仲丁威的区分剂量为 0.8738 mg/L(表 1)。

2.2 实验室杀虫剂对中华按蚊敏感品系成蚊的相对敏感基线和区分剂量测定 实验室拟除虫菊酯类药剂

溴氰菊酯、高效氯氰菊酯、氯菊酯对中华按蚊敏感品系成蚊的相对敏感基线 LC_{50} 及其 95% CI 分别为 0.0091 (0.0081~0.0104)、0.0184 (0.0163~0.0209) 和 0.0516 (0.0400~0.0686)mg/L;氨基甲酸酯类杀虫剂仲丁威的相对敏感基线 LC_{50} 及其 95% CI 为 0.0186 (0.0174~0.0199)mg/L(表 2)。中华按蚊实验室敏感品系成蚊对不同杀虫剂的敏感度由高到低依次为溴氰菊酯、高效氯氰菊酯、仲丁威、氯菊酯。

表 2 实验室中华按蚊敏感品系成蚊对常用杀虫剂的毒力(接触法)

Table 2 Lethal concentrations of commonly used insecticides to susceptible strain of adult *An. sinensis* (contact method)

杀虫剂	LC_{50} 及其 95% CI (mg/L)	LC_{99} (mg/L)	毒力回归方程 ($y=a+bx$)	区分剂量 (mg/L)
溴氰菊酯	0.0091(0.0081~0.0104)	0.0390	12.5204+3.6871x	0.0780
高效氯氰菊酯	0.0184(0.0163~0.0209)	0.1076	10.2596+3.0291x	0.2152
氯菊酯	0.0516(0.0400~0.0686)	0.3859	8.4266+2.6610x	0.7718
仲丁威	0.0186(0.0174~0.0199)	0.0532	13.8210+5.0963x	0.1064

实验室拟除虫菊酯类药剂溴氰菊酯、高效氯氰菊酯、氯菊酯对中华按蚊成蚊的诊断剂量分别为 0.0780、0.2152 和 0.7718 mg/L;氨基甲酸酯类杀虫剂仲丁威的诊断剂量为 0.1064 mg/L(表 2)。

2.3 WHO 推荐的几种常用杀虫剂对按蚊成蚊的区分剂量 结果见表 3。拟除虫菊酯类杀虫剂中,按蚊成蚊接触高效氯氰菊酯 4 h 的诊断剂量为 0.05%,接触氯菊酯 1 h 的诊断剂量为 0.75%,接触溴氰菊酯 1 h 的诊断剂量为 0.05%;氨基甲酸酯类杀虫剂中,按蚊成蚊接触仲丁威 1 h 的诊断剂量为 0.10%。

3 讨论

媒介按蚊杀虫剂对敏感性监测是蚊虫防治工作的重要部分之一。各地在大规模使用杀虫剂前应收集测

表 3 WHO 推荐的几种杀虫剂对按蚊成蚊的区分剂量

Table 3 The discriminating doses of WHO-recommended insecticides for adult *An. sinensis*

杀虫剂类型	杀虫剂	按蚊诊断剂量(%)
有机氯	DDT	4.00(1)
	狄氏剂	0.40(1)
有机磷	杀螟硫磷	1.00(2)
	敌敌畏	-
	马拉硫磷	5.00(1)
氨基甲酸酯	残杀威	0.10(1)
	仲丁威	0.10(1)
拟除虫菊酯	高效氯氰菊酯	0.05(4)
	氯菊酯	0.75(1)
	溴氰菊酯	0.05(1)

注:括号内数据为接触时间(h)。

试基线资料。尚无基线资料的地区,可用实验室饲养多年的敏感品系替代进行测试^[10]。杀虫剂敏感性监测

工作量很大,且对实验蚊虫数量有较高的要求,因此目前我国开展此项监测的省份并不多。

本实验室中华按蚊引自中国 CDC 寄生虫病预防控制所实验室饲养 50 年以上的虫种,未接触过任何杀虫剂,且该原始种群来自于上海市南汇区,因此可认为该中华按蚊为上海本地敏感种群。通过对该种群进行幼虫和成蚊的常用杀虫剂测定,初步得到了中华按蚊幼虫和成蚊对常用杀虫剂的相对敏感度基线和诊断剂量。

由于中华按蚊属于较难驯化饲养的蚊种,国内长期饲养中华按蚊的实验室也较少,查阅各种文献,尚未得到有关某些杀虫剂对中华按蚊幼虫和成蚊的敏感基线或诊断剂量。参照 WHO 推荐的几种常用杀虫剂对按蚊成蚊的区分剂量(表 3),可以发现本实验室中华按蚊成蚊除了对高效氯氰菊酯的区分剂量与 WHO 推荐的有所不同,对于仲丁威、氯菊酯和溴氰菊酯 3 种杀虫剂的区分剂量基本与 WHO 推荐值相同。因此,本研究得出的敏感度基线和区分剂量的测定结果可以作为我国中华按蚊成蚊区分剂量的参考值,应用于我国中华按蚊成蚊的抗性监测中。衡量一个敏感种群及其相对敏感毒力基线除了要比较其 LC_{50} 值外, b 值的大小是另一个重要指标。一般敏感毒力基线的 b 值多数都 >2 。本实验室中华按蚊敏感品系对几种常用杀虫剂的毒力回归线 b 值都在 2 以上,说明该品系对各杀虫剂反应的异质性是比较低的。如果 b 值较小,这样的种群就不是同源敏感种群,其毒力回归线一般也不能作为敏感毒力基线。由于 WHO 没有推荐常用杀虫剂对按蚊幼虫的区分剂量,而本实验室中华按蚊成蚊的测定结果与 WHO 推荐值较为接近。因此可认为本实验室的中华按蚊为同源敏感种群,幼虫对各杀虫剂的毒力测定结果也可作为区分剂量的参考值,应用于中华按蚊幼虫的抗性监测中。

本实验过程中,由于没有常用杀虫剂对该蚊种的基线资料,因此对于各杀虫剂的浓度都要进行逐一摸索。对于每个药物的测定,首先扩大药物浓度范围进行初测,随后根据初步测定结果,进一步缩小浓度设置范围,常以等差或等比数列设置测试浓度,经过反复测试,找到每个药物的浓度区间。由于实验对于幼虫和成虫的受试要求有限定,故对饲养有较严格的要求,需

要同一时期饲养大量的蚊虫,且要求虫龄齐整,发育完好,以保证一种药物的测试所用蚊虫是同一批次、同一生态环境,使外界干扰因素降至最低。饲养工作量大、繁琐,实验测试也需不断反复、调整,整个实验工作需占用实验人员大量的时间和精力。

常用杀虫剂对中华按蚊的相对敏感度基线和区分剂量的初步建立,对于上海市及周边省市突发疫情时,进行方便、快速的抗药性测定,指导喷洒灭蚊用药浓度,使经济效益最大化。也可为全国其他省市作为一个参比标准。中华按蚊敏感毒力基线的建立过程虽然繁琐、复杂,耗费较大精力,但是作为研究抗药性规律与机制、制定抗药性治理策略等的基础与前提还是非常有意义的。

参考文献

- [1] 唐振华. 昆虫抗药性及治理[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 97-98, 103.
- [2] 鲁艳辉. 禾谷缢管蚜和麦长管蚜玻璃管药膜法敏感毒力基线的建立[J]. 昆虫学报, 2009, 52(1): 52-58.
- [3] 沈晋良, 吴益东. 棉铃虫抗药性及其治理[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 114.
- [4] 汪中明, 邢丹, 李春晓, 等. 常用 5 种卫生杀虫剂对淡色库蚊成蚊区分剂量的研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2008, 19(5): 394-395.
- [5] 赵彤言, 汪中明, 董言德, 等. GB/T 26347-2010 蚊虫抗药性检测方法-生物测定法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [6] 文礼章. 昆虫学研究方法与技术导论[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 401-402.
- [7] 沈宝祥, 李菊林, 周华云. 中华按蚊对常用菊酯类杀虫剂抗性现场调查[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, 14(2): 148-149.
- [8] 刘维德. 按蚊抗药性研究进展[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1996: 81.
- [9] 全国蚊类抗药性调查研究协作组. 蚊类抗药性调查协作组总结[C]. 北京: 中国蚊类抗药性调查汇编, 1984: 1-142.
- [10] 潘波, 朱泰华, 刘勇鹰, 等. 我国主要传疟媒介对杀虫剂的敏感性现状[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2001, 12(2): 145-148.
- [11] 潘波, 朱泰华, 吴旭光, 等. 广东几种野外蚊虫抗有机磷酯酶活性聚集度的初步研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1995, 6(1): 58-59.
- [12] 雷心田, 魏红雨, 童学娅, 等. 四川省疟疾媒介按蚊对化学杀虫剂抗药性调查报告[J]. 实用寄生虫病杂志, 1993, 1(3): 5-8.
- [13] 何群, 朱泰华, 潘波, 等. 广东省蚊虫对常用杀虫剂的敏感性[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1996, 7(3): 226-227.

收稿日期: 2013-08-23