

江苏省重要病媒生物 抗药性监测方案

江苏省疾病预防控制中心

二〇一二年三月

1 背景

抗药性是指形成具有耐受杀死正常种群大部分个体的药量的能力。它是影响全球公共卫生、农业、林业、畜牧业等领域中有害生物控制的重要问题，是影响媒介生物性传染病预防控制的重要因素。开展和加强重要病媒生物抗药性监测，可以指导化学药剂的科学使用，延缓抗药性发展速度，提高控制效果，保护有益生物，维持生态平衡。方案的实施能够指导和推进我省重要病媒生物控制水平、提升突发公共卫生事件中病媒生物控制技术支撑水平、规范我省重要病媒生物抗药性监测方法。

本方案是以WHO推荐的测定方法为基础，并结合我省实际，统一方法，统一药剂，使监测数据具有科学可比性。

2 监测目的

2.1 掌握抗药性水平，指导防制

掌握我省重要病媒生物对常用化学药剂的抗性水平，了解抗性动态和发展规律。

2.2 制定控制预案，提高疾控能力

为病媒生物控制中药剂的选择和使用提供科学依据；针对不同疫情、不同地区、不同病媒生物制定药剂的储备和使用预案。

3 监测的组织、分工和职责

3.1 监测网络

监测网络由各级疾病预防控制机构组成。

3.2 分工和职责

3.2.1 江苏省疾病预防控制中心

江苏省疾病预防控制中心组织全省监测方案的起草、修改和完善，根据省辖市疾控机构的建议，确定全省监测点的布局，组织全省监测工作的实施；承担全省病媒生物抗性监测的技术指导和培训；负责监测信息的收集、整理、分析上报和反馈；并组织专家进行监测质量的检查和考核工作。

3.2.2 省辖市疾病预防控制部门

省辖市疾病预防控制中心，依据江苏省监测方案的要求，组织开展辖区内重要病媒生物抗性监测工作，按时完成监测任务；按时收集、分析、上报监测结果，对要求开展抗性监测的县（市）进行技术指导和监测质量控制。

4 监测内容和方法

4.1 靶标昆虫的选择

选择淡色库蚊的幼虫或成虫、家蝇成虫、蟑螂成虫为监测对象。

4.2 监测点的选择

（1）当地媒介生物性传染病的发生情况；（2）相关疾病媒介生物的种类和发生强度；（3）病媒生物对人的骚扰程度等选择。监测点要考虑地理分布（经纬度、生境），每省辖市选1~2个有代表性的监测点进行。监测点要相对固定。

4.3 监测时间

在当地的发生高峰期，每2年进行一次，不同监测年份测定时间相对固定。

4.4 试虫采集

蚊、蝇试虫的采集以居民区（城市或农村）及人活动频繁的区域（公园、绿化带、村庄周围500米内等）为主。在其东、西、南、北、中5个方位采集样本，按接近等比例混合后进行抗药性测定。抗药性监测，在采集试虫的当代或室内饲养的1~2代进行。

蟑螂选择德国小蠊或美洲大蠊。采集点选择同一区域内卫生处理频繁的場所，如农贸市场、餐饮场所、宾馆饭店、交通工具等；试虫饲养一代，取羽化后2~3周龄健康雄性成虫。

5 监测药剂

除标注的必测药剂外，其它药剂根据当地用药情况进行选择监测。

5.1 淡色库蚊/致倦库蚊的监测药剂

拟除虫菊酯类：高效氯氰菊酯(必做药剂)、溴氰菊酯(必做药剂)、氯菊酯、氯氰菊酯；

有机磷类：双硫磷(必做药剂)、敌敌畏、倍硫磷、杀螟硫磷；

氨基甲酸酯类：仲丁威(必做药剂)；

有机氯类：DDT、三氯杀虫酯。

5.2 家蝇的监测药剂

拟除虫菊酯类：溴氰菊酯(必做药剂)、高效氯氰菊酯(必做药剂)、高效氯氟氰菊酯；

有机磷类：敌敌畏(必做药剂)、毒死蜱、甲基吡恶磷；

氨基甲酸酯类：残杀威；

有机氯类：DDT。

5.3 蟑螂的监测药剂

拟除虫菊酯类：高效氯氰菊酯(必做药剂)；

有机磷类：乙酰甲胺磷(必做药剂)；

氨基甲酸酯类：残杀威(必做药剂)。

6 设施和器材

蚊类、蝇类和蟑螂抗药性监测所需主要设施和器材见表1。

表1 蚊虫、家蝇和蟑螂抗药性测定所需设施和器材

设施	数量	要求或种类	用途
养虫室	1 间	能控制温湿度和光照	标准试虫的获得
抗药性测定室	1 间	能控制温度、通风	完成抗性测定操作
通风橱	1 个		药剂配制
烘箱	1 台	0—300℃	器皿干燥消毒，废弃昆虫的处理
冰箱	2 台	有4℃和—20℃温区，有锁。	药剂存放
光照培养箱或恢复室	1台或1间	能控制温湿度和光照	培养测定试虫
点滴器	2—3个	0.3~1微升	家蝇、蟑螂抗药性测定
昆虫诱捕器具	若干	诱蚊灯、吸虫器、捕虫网、捞勺、吸蟑器等	采集试虫
个人防护用品	若干	手套、口罩、防蚊帽、驱避剂等	防蚊虫叮咬
移液器	各1 只	100 微升、200 微升、1000 微升	配制药液
电子天平	1 台	感量为0.1毫克	原药的称量
磁力搅拌器	1 台		药剂混匀
玻璃器皿	若干	烧杯200毫升、100毫升、量筒、容量瓶、青霉素瓶等	药剂的配制或测试容器
计算机	1 台	有POLO 或DPS 等统计软件	资料统计分析

7 监测方法

7.1 蚊虫幼虫浸渍法

以IV龄初幼虫为测试对象，以丙酮将原药稀释，将待测药剂配制5~7个系列浓度，即在250毫升的烧杯（或白瓷碗等）中加入200毫升脱氯水和0.5毫升相应的药液，加入20—30头试虫，以200mL脱氯水为对照。试虫在 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 $70\pm 10\%$ 、光照：黑暗=16：8的条件下，24小时调查并记录各处理的死亡数。试验重复3次。对照死亡率超过20%，试验视为无效。

死亡判断标准：用锐器触动不能动的幼虫为死亡，只是震颤也视为死亡。

7.2 成蚊接触筒法

药纸的制备 将白油和乙醚(AR)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 毫升均匀滴于16 厘米×12.5厘米的新华1号滤纸或其他质量相近的滤纸上。2小时后待乙醚完全挥发即可应用。药纸制备后应在6小时内使用，如需要可以把10—20张药纸用大小相同的玻璃板夹紧，用橡皮膏把间缝封实，再装入黑纸袋中，在较低温下大约可以存放一个月，但一经开启即不能储存，必须在2~3天内用完，如果已经装入接触筒，就只能用一次。

先把恢复筒安装在放隔板的一面，用吸蚊器吸取20~25只雌蚊（羽化后24~48小时，未吸血）吹入筒内，然后关闭隔板，在隔板另一面装上已衬贴药纸的接触筒，把隔板抽开，将恢复筒内蚊虫轻吹入接触筒，迅速关上隔板，将筒平放，即开始计算接触时间，接触60分钟，完毕后再抽开隔板将蚊虫再吹入恢复筒，关上隔板，将筒直放，用浸有5%葡萄糖水的棉花团置于尼龙网上。室温 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，从接触完毕后24小时计算死亡率。为了便于蚊虫在恢复筒内停留，可用白纸衬贴在筒内上端1/2 或2/3，空出下端，以便于观察死亡掉下的蚊虫。在4~5次重复中，每剂量应至少测100 只蚊。

7.3 家蝇的监测方法

用丙酮(分析纯)将原药配成5~7个系列浓度。取3~7日龄，体重为18~ 20mg的家蝇成虫。用乙醚（分析纯）轻度麻醉后，选健康雌虫，每处理30只置于平皿

中，用点滴器将药液按浓度由低到高的顺序，点滴于中胸背板上，放入加有少量奶粉的500 mL洁净的烧杯中，以海绵或脱脂棉供水，在温度为 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度60%~70%的条件下用1:1白糖和奶粉混合物饲养24 h。记录各处理的死亡虫数。对照以丙酮处理，死亡率超过20%时需要重新进行。试验重复3次。

死亡判断标准：凡腹部上翻，六足抽搐，用探针触之不能翻身爬行者判为死亡。

7.4 蟑螂的监测方法

7.4.1 药膜法

用丙酮将原药制备为1.0%的母液，再用丙酮稀释成0.05%的稀释液。取0.05%的稀释液2.5ml置于500ml透明广口瓶内，将瓶滚动使瓶底与瓶壁均匀地涂上药膜，待丙酮挥发后24h内进行测试，广口瓶的瓶颈处涂石腊油和凡士林的等量混合物。对照组用2.5ml丙酮，操作同前。每次将10只德国小蠊雄性成虫放入瓶中（美洲大蠊5只），用纱布封口，并在不同时间间隔观察试虫的击倒情况，直至2h。试验重复3次。同时用正常饲养的标准品系以同样方法测定。实验均以丙酮为空白对照。求出 KT_{50} 、 KT_{95} 、95%可信限及抗性系数。

击倒标准：以观察时刻虫体仰翻、六足抽搐、不能爬行为击倒标准。

7.4.2 点滴法

以丙酮为溶剂配制一定浓度母液，再按等比或等差配制5~7个浓度级备用。将试虫用 CO_2 麻醉后，仰卧排列在平皿内，每个浓度级各滴10只，由低至高浓度依次用微量点滴器将 $1\mu\text{l}$ 药液点滴在试虫第2、第3对足基节间的腹板上。点药后正常饲养，72h后检查死亡率。重复3次。求出毒力回归线、 LD_{50} 、 LD_{95} 、95%可信限和抗性系数。同时以丙酮为对照，操作方法和要求同上。

死亡判断标准：虫体仰翻，用针刺激虫体腹部无任何反应，视为死亡。虫体恢复正常姿势，但不能移动也视为死亡。

7.4.3 计算及抗性判断标准

抗性系数(R)=现场品系 LD_{50} 值/敏感品系 LD_{50} 值

抗性系数 <5 为低度抗性； $5\leq$ 抗性系数 ≤ 10 为中度抗性；抗性系数 >10 为高度抗性。

8 统计与计算

用POLO软件或DPS软件进行数据统计，记录处理虫数、自由度。通过分析获得致死中浓度（ LC_{50} ）或致死剂量（ LD_{50} ）值及其95%置信限， LC_{90} （或 LD_{90} ）及其95%置信限，毒力回归线的斜率b值及其标准差，卡方值。

附录

附录1 蚊虫抗药性浸渍法测定原始记录表

附录2 家蝇抗药性点滴法测定原始记录表

附录3 蟑螂抗药性药膜法测定原始记录表

附录4 蟑螂抗药性点滴法测定原始记录表

附录5 淡色库蚊幼虫抗药性浸渍法测定敏感基线

附录6 家蝇抗药性点滴法测定敏感基线

附录7 蜚蠊抗药性药膜法测定敏感基线

附录1 蚊虫抗药性浸渍法测定原始记录表

填报人：_____；审核人：_____；上报日期：_____

试虫名称：_____ 虫源地名：_____							
测定人：_____ 药剂名称：_____							
处理日期：_____年_____月_____日至_____月_____日							
培育温度：_____℃； 湿度：_____％ 测定室温：_____℃；湿度：_____％							
处理浓度 (单位：mg/L)	重复1		重复2		重复3		合计
	死虫数	总虫数	死虫数	总虫数	死虫数	总虫数	死/总
对照							/
							/
							/
							/
							/
							/
							/
							/
卡方 X^2 _____ 自由度 (n)： _____							
斜率 b 值： _____ 回归方程： _____							
LC ₅₀ ： _____ 95%置信限： _____							
LC ₉₅ ： _____ 95%置信限： _____							
备注： _____							
测定单位（盖章） _____							

附录2 家蝇抗药性点滴法测定原始记录表

填报人：_____；审核人：_____；上报日期：_____

试虫名称：_____ 虫源地名：_____							
测定人：_____ 药剂名称：_____							
处理日期：_____年_____月_____日至_____月_____日							
培育温度：_____℃； 湿度：_____% 测定室温：_____℃；湿度：_____%							
处理浓度 (单位：μg /ul)	重复1		重复2		重复3		合计
	死虫数	总虫数	死虫数	总虫数	死虫数	总虫数	死/总
对照							/
							/
							/
							/
							/
							/
							/
							/
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> 卡方 X^2 _____ 斜率 b 值： _____ LC₅₀： _____ LC₉₅： _____ 点滴器容量： _____ 备注： _____ </div> <div> 自由度 (n)： _____ 回归方程： _____ 95%置信限： _____ 95%置信限： _____ </div> </div>							
测定单位（盖章）							

附录3 蟑螂抗药性药膜法测定原始记录表

填报人: _____; 审核人: _____; 上报日期: _____

试虫名称：☐德国小蠊 ☐美洲大蠊

试虫品系：☐现场品系 ☐敏感品系

采集地点：_____

药剂名称：_____ 测定时间：_____

温度：_____ 相对湿度：_____

<div>击倒虫数</div> <div>观察时间</div> <div>(单位：min)</div>	重复 1	重复 2	重复 3	合计
总试虫数				

卡方 X^2 _____ 自由度 (n): _____

斜率 b 值: _____ 回归方程: _____

KT₅₀: _____ 95%置信限: _____

KT₉₅: _____ 95%置信限: _____

备注: _____

测定单位 (盖章)

附录4 蟑螂抗药性点滴法测定原始记录表

填报人：_____；审核人：_____；上报日期：_____

试虫名称： ☐ 德国小蠊 ☐ 美洲大蠊

试虫品系： ☐ 现场品系 ☐ 标准品系

采集地点： _____

药剂名称： _____ 测定时间： _____

温度： _____ 湿度： _____

处理浓度 (单位: mg/mL)	重复 1		重复 2		重复 3		合计	
	死 虫 数	总虫数	死虫数	总虫数	死虫数	总虫数	死虫数	总虫数
对照								

卡方 X^2 _____ 自由度 (n): _____

斜率 b 值: _____ 回归方程: _____

LD₅₀ (μ g/虫): _____ 95%置信限: _____

LD₉₅ (μ g/虫): _____ 95%置信限: _____

点滴器容量: _____

备注: _____

测定单位 (盖章)

附录 5 淡色库蚊幼虫抗药性浸渍法测定敏感基线

药物名称	LC ₅₀ (mg/L)	95% 置信限	LC ₉₅ (mg/L)	95% 置信限	回归方程
溴氰菊酯	0.0013	0.0004~0.0092	0.1893	0.0200~31.1617	Y=7.1931+0.7584X
高效氯氰菊酯	0.0038	0.0021~0.0067	0.0455	0.0200~0.2395	Y=8.6865+1.5211X
氯菊酯	0.0277	0.0187~0.0439	0.4852	0.2110~2.2199	Y=7.0601+1.3221X
生物丙烯菊酯	0.1813	0.1028~0.6432	2.0437	0.5961~66.3689	Y=6.1595+1.5634X
敌敌畏	0.0183	0.0162~0.0206	0.0713	0.0592~0.0899	Y=9.8346+2.7814X
残杀威	0.0968	0.0455~0.2541	1.6452	0.4880~52.0538	Y=6.3558+1.3368X
双硫磷	0.0004	0.0004~0.0005	0.0013	0.0011~0.0015	Y=16.6471+3.4574X
仲丁威	0.2531	0.2185~0.3039	0.6979	0.5212~1.1263	Y=7.2280+3.7336X

备注：该测试品系为省疾控实验室敏感品系；测试时间为 2009 年。

附录 6 家蝇抗药性点滴法测定敏感基线

药剂	LD50 (μ g/雌蝇)	95%置信限	LD95 (μ g/雌蝇)	95%置信限	回归方程
高效氯氰菊酯	0.0070	0.0035~0.0189	1.7003	0.3162~30.0272	$Y=0.6895x+6.8346$
溴氰菊酯	0.0002	0.0001~0.0026	0.0417	0.0032~2234.8538	$Y=0.7212x+8.0046$
敌敌畏	0.0006	0.0003~0.0013	0.0125	0.0048~0.1223	$Y=1.2747x+9.7102$

备注：该测试品系为省疾控实验室敏感品系；测试时间为 2009 年。

附录 7 蜚蠊抗药性药膜法测定敏感基线

虫种	药剂	KT50 (min)	95%置信限	KT95 (min)	95%置信限	回归方程
德 国 小 蠊	残杀威	15.7350	15.0561~16.3735	21.6585	20.4119~23.5491	$y=11.8538x-9.1874$
	高效氯氰菊酯	4.1071	3.6618~4.6052	12.4259	10.0777~16.7602	$Y=3.4211x+2.9010$
	乙酰甲胺磷	15.0284	13.9215~16.1237	41.4397	36.2022~49.5197	$Y=3.734x+0.6054$
	溴氰菊酯	3.0145	2.3001~3.6660	9.9262	7.8256~14.4044	$Y=3.18x+3.48$
	敌敌畏	4.02	3.61~4.71			$Y=8.14x+0.08$
美 洲 大 蠊	残杀威	30.3976	26.5731~33.6680	50.4872	43.2527~70.9437	$Y=7.4650x-6.0694$
	高效氯氰菊酯	5.4006	4.2528~6.6907	25.8818	18.0484~46.8031	$Y=2.4169x+3.2297$
	乙酰甲胺磷	57.0815	48.4210~64.5589	110.6301	94.2487~145.2769	$Y=5.7237x-5.0536$

备注：该测试品系为省疾控实验室敏感品系；测试时间为 2009 年。