

DOI:10.13350/j.cjpb.240123

• 综述 •

蚊虫杀虫剂抗性机制及检测方法研究进展

曹自有,冯欣宇,尹建海,夏志贵*

(中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,国家热带病研究中心,世界卫生组织热带病合作中心,科技部国家级热带病国际联合研究中心,国家卫生健康委寄生虫病原与媒介生物学重点实验室,上海 200025)

【摘要】 蚊虫作为疾病传播媒介,对全球公共卫生产生重大影响。长期以来,化学方法是控制蚊虫种群的主要手段,然而蚊虫对杀虫剂的抗性已经引起了广泛关注。本文对蚊虫杀虫剂抗性的产生原因、抗性机制及其检测方法的研究进展进行了全面梳理和分析。首先,分析了抗性产生的原因,包括杀虫剂使用不当、生物选择压力、环境污染、基因突变和基因流等。其次,探讨了抗性产生的机制,如生物代谢途径的改变、杀虫剂靶点的突变、表达调控、行为抗性、解毒酶活性协同作用和抗性基因多态性等。最后,总结了蚊虫杀虫剂抗性检测方法的研究进展,涉及生物测定法、生化检测法和分子生物学检测法。旨在为蚊虫杀虫剂抗性检测新方法的研究以及杀虫剂抗性监测和管理提供新的理论支持和科学手段。

【关键词】 疟疾;蚊虫;杀虫剂抗性;检测方法;研究进展;综述

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)01-0113-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Jan;19(1):113-119,123.]

Research progress of insecticide resistance mechanism and testing methods

CAO Ziyou, FENG Xinyu, YIN Jianhai, XIA Zhigui (*National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Chinese Center for Tropical Diseases Research; WHO Collaborating Centre for Tropical Diseases; National Center for International Research on Tropical Diseases, Ministry of Science and Technology; NHCKey Laboratory of Parasite and Vector Biology, Shanghai 200025, China*)

【Abstract】 Mosquitoes, as vectors of disease transmission, have a significant impact on global public health. For a long time, chemical methods have been the main means of controlling mosquito populations, but the issue of mosquito resistance to insecticides has attracted widespread attention. This article comprehensively reviews and analyzes the research progress on the causes, resistance mechanisms, and detection methods of mosquito insecticide resistance. First, the causes of resistance were analyzed, including improper use of insecticide, biological selection pressure, environmental pollution, gene mutation and gene flow. Secondly, the mechanism of resistance generation was explored, such as changes in biological metabolic pathways, mutations in insecticide targets, expression regulation, behavioral resistance, synergistic effects of detoxification enzyme activity and resistance gene polymorphism. Finally, the research progress of mosquito insecticide resistance detection methods was summarized, including bioassay, biochemical detection, and molecular biology detection. Intended to provide new theoretical support and scientific means for the research of new methods for detecting insecticide resistance of mosquitoes, as well as for monitoring and managing insecticide resistance.

【Key words】 malaria; mosquito; insecticide resistance; test method; research progress; review

***蚊虫是疟疾、登革热、黄热病等多种疾病的主要传播媒介。随着全球气候变化和人口流动,媒传疾病的范围和影响日益扩大。蚊虫媒传控制长期以来一直是管理蚊子相关疾病的全球战略的关键,而杀虫剂是这一战略中最重要的组成部分。

人造化学杀虫剂的使用最早可以追溯到19世纪中期。1871年巴黎绿(乙酰亚砷酸铜)被成功用于防治马铃薯甲虫,直到20世纪中期前,巴黎绿用于防治疟蚊传播疟疾且一直被许多国家广泛使用。20世纪40年代二氯二苯基三氯乙烷(Dichloro-Diphenyl-Trichloroethylene, DDT)杀虫能力发现以来,就开始重点部署针对幼虫和成年蚊子的此类杀虫剂,以达到媒介控制的目的^[1]。此后化学杀虫剂也逐渐成为防治蚊虫传播疟疾的主要手段,包括有机磷类(敌敌畏、杀螟腈、地虫硫磷等)和氨基甲酸酯类(甲萘威、克百威、涕灭威等),并于20世

纪70年代首次向市场推出拟除虫菊酯杀虫剂^[2-3]。现在,应用最普遍的杀虫剂为新烟碱类。第一个上市的新烟碱杀虫剂为吡虫啉,1993年在日本以Hachikusan商品名登记上市^[3]。在目前已有的杀虫剂种类中,拟除虫菊酯由于其有效性和安全性,是世界范围内最广泛用于灭蚊防治疟疾的杀虫剂。

2021年全球范围内的84个疟疾流行国家估计有2.47亿

* **【基金项目】** 上海市第五轮公共卫生体系建设三年行动计划重点学科项目(GWV-10.1-XK13)

** **【通讯作者】** 夏志贵, E-mail: xiazg@nipd.chinacdc.cn

【作者简介】 曹自有(1998-),男,河南平顶山人,硕士研究生,从事媒介生物学及控制研究。
E-mail: caoziyou2021@163.com

疟疾病例,其中死亡病例估计为 61.9 万人,疟疾死亡人数在 2000-2021 年期间稳步下降^[4]。近年来全球疟疾负担大大减少主要是通过扩大核心病媒控制干预措施实现的,即长效杀虫蚊帐(Long-lasting Insecticidal Net, LLIN)和室内滞留喷洒杀虫剂(Indoor Residual Spraying, IRS)^[5]。据统计,全世界就有近三分之二的室内滞留喷洒(IRS)方案需依赖拟除虫菊酯杀虫剂进行^[6]。自 20 世纪 50 年代发表了第一份关于蚊子对氯代烃杀虫剂抗性的报告以来^[7],全球范围内有关杀虫剂抗性的报道不断。长期地应用杀虫剂导致了蚊虫抗药特别是对拟除虫菊酯类抗药性的出现,如在苏丹、赤道几内亚比奥科岛以拟除虫菊酯为基础的 IRS 效果不理想,两地的拟除虫菊酯杀虫剂已被恶虫威(bendiocarb)取代^[8-9]。抗性的产生影响了杀虫剂的防治效果,对抗药性问题不容忽视。同时,用于监测抗性的生物学方法需要良好的蚊虫饲养等实验室条件,在条件落后的地方不具备该方法的检测能力,而且只检测表型抗性,结果有滞后性,不能及时发现抗药性基因突变,这可能会导致抗性基因的遗传扩散;而基于 PCR(Polymerase Chain Reaction)技术的分子生物学方法通量普遍较低、费用较高,不常用于一般监测,与媒介蚊种检测方法分开进行,不适用于大规模的媒介监测项目。因此,进一步研究蚊虫杀虫剂抗性和抗性检测方法显得尤为重要。世界各地的研究人员正在努力试图阐明控制杀虫剂抗性发展的机制并不断探索检测抗性的新方法,这是朝着有效预防蚊虫抗药性、控制耐药蚊虫并最终减少蚊媒疾病流行迈出的重要一步。

1 蚊虫对杀虫剂产生抗性的现状

根据 WHO(World Health Organization)的定义,抗药性是指昆虫通过自然选择和突变对杀虫剂的毒害产生抗药性的能力^[10]。Mohammed 等定义杀虫剂抗性为“一个种群对杀虫剂剂量的耐受能力,这种能力是由于对杀虫剂的选择压力而形成的。而此耐受剂量对于同一物种的正常种群的大多数个体来说是致命的”^[11]。两者都强调自然选择和突变对抗药性产生的作用。

截至 2020 年,在全球范围内已记录的数据显示有 125 种蚊虫对一种或多种杀虫剂产生了不同程度的抗药性^[12]。在提供 2010-2020 年监测数据的 88 个疟疾流行国家中,78 个在至少一种疟疾媒介和一个采集点检测到对至少一种杀虫剂类别的抗药性;29 个国家已经在不同地点检测到对拟除虫菊酯、有机氯、氨基甲酸酯和有机磷的抗药性;19 个国家确认在至少一个地点和至少一种当地媒介对所有以上这四类杀虫剂产生抗药性^[4]。

2 蚊虫对杀虫剂产生抗性的原因

蚊虫抗药性的产生是一个复杂的过程,直接取决于遗传、生理、行为和生态因素,间接取决于杀虫剂的使用量和频率^[13]。有研究表明,在按蚊中抗药性的产生主要是由于杀虫剂靶点的突变改变了其敏感性,以及解毒或隔离杀虫剂的酶的基因表达上调^[14]。也有研究认为抗药性的产生可能是由于转基因结构或目标蚊子种群的选择性突变,这与长期存在的 GDMMs(Gene Drive-modified Mosquitoes)尤为相关^[15-16]。French-Constant^[17]的研究表明,在人为控制干预计划实施之前,蚊虫种群中可能就已存在有利于抗药性的突变。在经过杀虫剂选择后,携带抗性多态性或等位基因的个体比例增加,其

后代存活率会大大提高,最终耐药个体将成为种群中的优势群体。这被认为是蚊虫的一种重要的进化现象^[18]。总体上虽然对抗药性按蚊生活史特征的研究很少,但可以肯定的是蚊虫基因目标位置突变与健康负担、降低繁殖竞争力和幼虫存活有关^[19-20]。此外,来自工农业的环境污染物和来自天然异种生物的化感化学物质都可介导蚊虫抗药性机制的发展,但这些污染物对遗传抗性的影响仍不清楚^[21]。

另外,用于农业和公共卫生的杀虫剂,在选择疟疾病媒抗药性方面也发挥了关键作用^[22]。农用和卫生用杀虫剂的使用量和频次增加,特别是用于农作物保护的杀虫剂,导致蚊虫在未接触卫生杀虫剂前可能就对相同类型的药剂产生了抗性。值得注意的是,杀虫剂的使用本身可能不会产生抗药性,而是选择一小部分具有基因突变的个体,使他们能够抵抗杀虫剂的影响存活下来,并且将赋予抗药性的遗传变化传递给后代。这点要与“诱导”区分开来,“诱导”可能发生在接触任何杀虫剂的亚致命(或低剂量)环境中,并且不会遗传给后代^[23]。

3 杀虫剂抗性机制

杀虫剂的抗性类型主要包括:代谢抗性,靶标抗性,表皮抗性三大类^[24],另有学者提出非特异性抗性及行为抗性^[25]。代谢抗性和靶标抗性一直是杀虫剂抗性研究的热点。

代谢抗性是由解毒酶的活性介导的^[26],有研究表明,将杀虫剂与这些酶的抑制剂结合可以大大降低对杀虫剂的抗药性^[27]。杀虫剂在蚊虫体内被解毒酶代谢降解而降低毒性,这些代谢酶(有称解毒酶)主要包括谷胱甘肽巯基转移酶(Glutathione S-transferase, GSTs)、乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)及细胞色素 P450 介导的多功能氧化酶(Mixed Function Oxidase, MFO)等。

靶标抗性已在多种蚊虫对杀虫剂的抗性中被发现。其涉及 AChE 对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性,AChE 是神经系统中的一种重要的关键酶,负责水解乙酰胆碱神经递质从而终止神经冲动;电压门控钠离子通道(Voltage-gated Sodium Channel, VGSC)对滴滴涕(DDT)和拟除虫菊酯的击倒抗性,通常情况下杀虫剂有效成分在与钠通道结合后,它们会导致蚊虫的神经系统反复放电,神经膜去极化从而导致蚊虫死亡;以及 γ -氨基丁酸受体(γ -Aminobutyric acid Receptor, GABAR)对环戊二烯类杀虫剂的抗性^[28-29]。

考虑到大多数杀虫剂是亲脂性分子,因此表皮抗性被认为是蚊虫对多种杀虫剂的交叉抗性^[21],该抗性机制可延缓杀虫剂进入蚊虫体内尤其是到达靶标部位的时间,并使杀虫剂在体内有更多机会被降解。这种抗性机制不是特异性的,但可以广泛影响蚊虫对杀虫剂的接触。Wood 等^[30]使用扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)测量实验室催命按蚊(*Anopheles Funestus*)株的平均角质层厚度,结果表明耐除虫菊酯的蚊虫的平均角质层厚度明显大于易感蚊虫。此外,通过蚊虫的¹⁴C 溴氰菊酯渗透率试验所观察到的表皮抗性受细胞色素 P450 单加氧酶表达的控制^[31-33]。然而对表皮抗性的认识还远远不足,仍需要做更多工作来确定表皮抗性的重要性。

行为抗药性不具有与生理抗药性相同的“重要性”,但可以被认为是一个促成因素,它使得蚊虫行为改变避免接触致命剂量的杀虫剂^[34-35]。例如 Russell 等^[36]的调查结果表明,坦桑尼亚催命按蚊的叮咬偏好由室内转向室外,这与当地增加拟除虫

菊酯浸渍蚊帐的覆盖率有关。

其它的机制如代谢解毒酶活性协同作用:蚊虫体内的解毒酶通常在多种生物代谢途径中发挥作用,当这些途径被同时激活时,可能导致协同效应,使蚊虫对杀虫剂更具抗性。此外还有蚊虫抗性基因多态性:抗性基因在蚊虫种群中可能存在多态性,即同一基因在不同个体中具有不同的等位基因,这种多态性可能导致蚊虫对杀虫剂抗性的差异。这些机制都在蚊虫对杀虫剂产生抗性中发挥了不同程度的作用。

世界卫生组织推荐用于疟疾媒介控制的六种杀虫剂的抗性机制(表1)。

表1 常用杀虫剂抗性机制
Table 1 Commonly used insecticide resistance mechanisms

杀虫剂 Insecticide	分子靶标 Molecular targets	基因突变 Gene mutation	酶机制 Enzymatic mechanisms	参考文献 References
拟除虫菊酯类	钠离子通道	Kdr 突变	单加氧酶、酯酶	[37-41]
滴滴涕	钠离子通道	Kdr 突变	单加氧酶、谷胱甘肽 S 转移酶	[37,42]
氨基甲酸酯类	-	Ace-1 突变	乙酰胆碱酯酶	[37,42]
有机磷类	-	Ace-1 突变	单加氧酶、谷胱甘肽 S 转移酶、酯酶	[37-39]
环戊二烯类	γ -氨基丁酸受体	Rdl 突变	谷胱甘肽 S 转移酶	[37,43-44]
吡啶类	γ -氨基丁酸受体	Rdl 突变	谷胱甘肽 S 转移酶	[37,43-44]

4 杀虫剂抗性检测方法

4.1 生物测定法 生物测定法是一种直接评估杀虫剂对蚊虫的毒性作用的方法,该法以活的成蚊为受试对象,在暴露于杀虫剂一定时间后观察其失能或死亡情况,通过如下指标:抗性系数、时间-死亡率等来反映蚊虫的抗性水平^[45]。

4.1.1 WHO 药膜接触筒法 WHO 药膜接触筒试验是一种直接暴露反应测试,自上世纪 60 年代初期首次介绍以来,经过了不断改进和完善,该法在给定的杀虫剂抗性区分浓度或抗性强度浓度下测量蚊子死亡率,以此来判定是否存在抗性及其抗性强度^[37]。抗性区分浓度下死亡率 $\geq 98\%$ 为敏感;在 90%~97%之间为可能存在抗性,但是否具有抗性尚需使用替代试验进一步验证; $< 90\%$ 为证实存在抗性。5 倍抗性强度浓度下,死亡率 $\geq 98\%$ 为低强度, $< 98\%$ 为中至高强度;10 倍抗性强度浓度下,死亡率 $\geq 98\%$ 为中强度, $< 98\%$ 为高强度。该法直观、操作简单,不仅可以检测抗性水平,而且在与增效剂合用时可用于确定蚊虫对某种杀虫剂是否具有代谢抗性;不足之处在于操作过程中易受外部条件影响或研究者在试验过程中易将失能(不能站立)蚊虫记为死亡,影响对结果的判定,因此需要严格的实验条件控制。

4.1.2 CDC 瓶生物测定法 美国 CDC (Center for Disease Control and Prevention) 于 2010 年网络发布了更新版的瓶生物测定法,这一方法是将溶于丙酮或乙醇溶剂的杀虫剂均匀地涂布于玻璃瓶的内表面,后将蚊虫置于瓶中暴露于杀虫剂,每隔 15 min 记录一次失能或存活数量,直至全部失能或最多观察 2 h 就停止试验,最后通过比较时间-死亡率来判断抗性水平^[46]。与 WHO 区分剂量法不同的是,该法测量使用预定浓度的杀虫剂使敏感蚊子丧失能力所需的不同时间长度,而前者测量暴露于特定浓度杀虫剂的蚊子在固定时间段内的死亡率。该法程序相对简单快捷,可进行各种增效剂效果的测定,在评估不同种类和不同浓度杀虫剂时有更大的灵活性,作为一种补充方法广泛用于日常监测蚊子种群的抗性^[37];不足之处在于

对进行测定的瓶子准备不当时常会阻碍结果的准确性,需要严格进行瓶子内涂层。另外,该法也增加补充了不同判别浓度的抗性强度测定项,可以用更少的蚊子获得有价值的信息。Zamora 等^[47]还将上述两种方法进行了对比评估,结果显示两者的效能基本一样。

4.2 生化法 生化法主要通过测定蚊虫体内与抗性相关的酶活性,如酯酶、混合功能氧化酶和谷胱甘肽-S 转移酶等,来评估蚊虫抗性水平^[48]。Brogdon 等^[49]在研究中发现,生化检测法可以定量评估蚊虫抗性,但受样本处理和实验条件影响较大,需要一定的技术水平。

4.2.1 GSTs 检测 GSTs 是杀虫剂产生代谢抗性的重要酶系,参与多种分子的解毒,蚊虫体内 GSTs 水平与有机氯类、有机磷类、环戊二烯类和吡啶类杀虫剂引起的抗性有关。Brogdon 等^[50]建立了微量板法检测 GSTs 的活性,该法将蚊虫匀浆离心后取上清放入 96 孔板中,然后加入 1-氯-2,4-二硝基苯(1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene,CDNB)和谷胱甘肽,30 min 后在 414nm 波长下测定吸光度来计算 GSTs 活性。该法可以定量检测 GSTs 的酶活性,但由于所需试验仪器限制不利于进行现场检测。WHO 推荐使用的标准方法为在每个蚊子匀浆样品中加入 200mL GSH/CDNB 工作液(100 μ L 0.6%的还原型谷胱甘肽稀释在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中,pH=6.5 0.013g 1-氯-2,4-二硝基苯稀释在 1mL 70%甲醇中),在 340nm 波长处立即读数并作动力学分析 5min^[51]。该法目前多用于 GSTs 活性测定的相关研究中。Vontas 等^[52]运用 CDNB 和还原型谷胱甘肽作底物,通过碘滴定显色后肉眼观察颜色变化来确定是否产生有关 GSTs 的抗性。该法操作简便适用于现场快速定性检测,缺点是定量。上述传统的生化检测方法估计的是总 GSTs 水平的上升,而 Aravindan 等^[53]研究发现与 DDT 亲和力最高的 D6 转录本模拟的 GSTs 可能在蚊子接触杀虫剂时过度表达,在通过湿法实验室研究进一步证实后,将有可能设计一种特定的分子检测方法来确定这种高亲和力转录本的表达水平,并且这可以用于在田间蚊虫中更可靠地检测 GSTs 的抗药性。

4.2.2 MFO 检测 MFO 是一个复杂的酶家族,它们与分子氧结合,并从 NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)接收电子,使细胞色素 P450 还原,并与代谢底物形成复合物,主要参与有机磷类、DDT 和拟除虫菊酯类杀虫剂的代谢解毒。Brogdon 等^[54]在 Thomas 等^[55]研究的基础上改进了使用底物 3, 3' 5, 5'-四甲基联苯胺(3, 3' 5, 5' -Tetramethylbenzidine,TMBZ)在电泳凝胶上检测血红素过氧化物酶活性的方法。具体方法为在用无水甲醇稀释匀浆和 3, 3',5,5'-四甲基联苯胺(分别为 0.01g/5mL)的溶液中加入 0.25 mol/L pH 7.2 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液 80 μ L,然后与 15 mL pH 为 5.0 的 0.25 mol/L 醋酸钠缓冲液混合,随后加入 25 μ L 3%过氧化氢,混合物在室温下放置 2 h。用 20 μ L 蒸馏水、200 μ L TMBZ 溶液和 25 μ L 3% H_2O_2 制备样品和每板的两个对照,最后在 650 nm 处读取吸光度,并将值与已知浓度细胞色素 C 的吸光度标准曲线进行比较。该技术可以快速确定抗性频率估计值,并且该方法的简单性使其可适用于多种检测场合,但由于该法是一种间接测定法,在存在未知血红蛋白或干扰物质的情况下易出现结果偏差。

4.2.3 酯酶检测 酯酶是蚊虫体内对杀虫剂解毒的重要水解酶,它普遍存在于蚊虫体内各组织中,主要参与有机磷类和拟除虫菊酯类杀虫剂的解毒。Pasteur 和 Georghiou 首次使用了一种简单的滤纸试验,用于检测单只蚊子中酯酶活性的增加,这项测试是基于蚊子匀浆在滤纸上的沉积,滤纸首先在含有 α -乙酸萘酯的缓冲液中孵化,然后在含有偶氮染料的染色溶液中孵化,最终观察颜色变化来反映酯酶的活性^[56]。后又优化该试验方法,即 FP/Est 试验,该法提高了测试的灵敏度以及引入量化特征,使其更具可靠性^[57]。在上述滤纸法的基础上 Hemingway 和 Georghiou 建立了微量孔板法,该法引入了微孔板,可大批量操作,也可以用于酯酶水平的定量^[58]。Moores 等^[59]描述了一种用于检测乙酰胆碱酯酶的微量滴定板法,该法较先前 Hemingway 等^[60]的方法具有较高的准确性,同时也更省时。国内学者早期使用滤纸法和微量板法检测蚊虫体内酯酶的活性^[61-62],目前国外学者主要使用微量板测定法进行相关研究^[63-64]。

4.3 分子生物学法 分子生物学检测法主要包括聚合酶链反应(PCR)^[65]、高通量测序^[66]等技术。这些方法可以直接检测蚊虫基因组中与抗性相关的基因突变、基因表达水平变化等,具有高灵敏度、高特异性和高通量的特点。然而,这些方法设备要求高,成本较高,适用于实验室研究和监测工作。

4.3.1 PCR 和基于 PCR 的反应技术 该技术主要包括有 PCR(聚合酶链式反应)、AS-PCR^[67-69](Allele-Specific PCR,基因特异性扩增)、PCR-RFLP(聚合酶链反应-限制性片段长度多态性)^[70]、qPCR(Real-Time Quantitative PCR,实时荧光定量 PCR)^[71]、RT-PCR(Reverse Transcription PCR,逆转录 PCR)^[72]、dPCR(Digital PCR,数字 PCR)^[73]、TaqMan PCR(液相探针荧光 PCR)^[74]。

PCR 和基于 PCR 的反应技术可以检测蚊虫杀虫剂靶标位点的突变,常见的检测到的靶点基因突变有 VGSC(电压门控钠通道)基因突变位点:L1014F、L1014S、L1014C;Ace-1(乙酰胆碱酯酶 1)基因突变位点:G119S;Rdl(γ -氨基丁酸受体)基因突变位点:A296G、A296S。PCR-RFLP 是一种在 PCR 后对产物进行限制性酶切的方法,通过对切割后产物的长度和数量进行分析,可以判断基因中是否存在与抗性相关的特定点突变。该方法已成功应用于检测多种蚊子(如 *Anopheles gambiae* 和 *Culex quinquefasciatus*)中与拟除虫菊酯和 DDT 抗性相关的 *kdr* 基因突变^[75]。qPCR 方法可以测定蚊子基因表达水平的变化,从而了解基因表达与抗性之间的关系。这种方法对于揭示蚊子对杀虫剂产生抗性的转录调控机制非常有用。例如,通过对 *Anopheles gambiae* 中的多个氧化还原酶基因(如 CYP6M2 和 CYP6P3)进行 qPCR 分析,研究人员发现这些基因在抗性蚊子中的表达水平显著升高,表明这些基因可能与拟除虫菊酯抗性有关^[76,77]。AS-PCR 和 TaqMan qPCR 探针分析法依赖于进行两次检测来同时检测 VGSC-1014F 和 VGSC-1014S 突变。Lynd 等^[78]建立了一种可同时检测两种突变等位基因和野生型等位基因的锁核酸(LNA)qPCR 方法,在对冈比亚按蚊进行检测后发现同时存在 L1014F 和 L1014S 突变,N1575Y 多态性出现频率较低,此结果与 TaqMan-*kdr* 法完全一致,该方法可设计探针在一次 qPCR 反应中可靠地检测三个等位基因,

具有节省时间、降低检测成本的优点。Mavridis 等^[79]开发并验证了一种 ddPCR(数字微滴 PCR)方法,并定量检测大量冈比亚按蚊库中的 *kdr* L1014F 抗性靶点突变,结果显示该种方法的 MAFs(等位基因突变频率)测量值与实际值的一致性相关系数为 0.9988,表明几乎一致^[80]。该法与未改进的 qPCR 方法相比,在精密性、准确性和 LOD(即检测限:先前方法为 5.0%,此法为 0.050%)方面都具有优势^[81]。此外,因为该法可用于批量测定大型样本容量,这对于在全球病媒控制规划框架下快速监测病媒低频耐药突变尤为重要,以便于在耐药性蔓延之前迅速采取行动^[82]。Mavridis 等^[26]等开发了一种新型多重 qRT-PCR 方法,该法基于特定的 TaqMan 探针和 RT,无需事先提取 RNA 和进行 DNase 处理步骤,可准确地测定拟除虫菊酯代谢物 CYP6P3、CYP6M2、CYP9K1、CYP6P4、CYP6Z1 和 GSTE2 的水平,且不需要冷链系统,可使用保存于 RNAlater 中的样品,这对于快速诊断试剂盒的开发具有重要意义。

4.3.2 基因测序技术 RNA 测序(RNA-seq)是一种用于研究转录组的高通量测序技术,它可以对特定细胞、组织或生物体在特定条件下的所有 RNA 分子进行定量和定性分析。RNA-seq 主要用于检测基因表达水平、新基因发现、剪接变异和 RNA 编辑。此技术可以测定蚊子在某一特定条件下的全基因组表达谱,Ingham 等^[83]通过对 *Anopheles gambiae* 进行 RNA-seq 分析,发现了一组与拟除虫菊酯抗性相关的基因,包括一些解毒酶基因(编码 P450s、脱氢酶和酯酶的基因)和非解毒酶基因(编码转运蛋白和信号转导蛋白的基因)。这种全基因组表达谱分析方法通过对比抗性和非抗性蚊虫的基因表达谱,有助于揭示抗性蚊子的生物学特性和可能的抗性机制。

DNA 测序(DNA-seq)广泛应用于基因组学、遗传学、生物信息学等领域,可以用于基因定位、突变检测、进化分析。通过测定蚊子基因组中特定基因的 DNA 序列,可精确地鉴定与抗性相关的突变和多态性,这些数据可用于了解抗性的起源和传播。Riveron 等^[84]通过对 *Anopheles funestus* 中的 CYP6P9a 和 CYP6P9b 基因进行 DNA 测序,发现这两个基因在马拉维和莫桑比克的抗性蚊子中具有显著的遗传多样性,这可能与该地区不断增长的抗性有关^[84]。另有学者 Campos 等^[85]通过结合多重 PCR,定制设计的双索引序列和 Illumina 下一代测序技术,对 *Anopheles gambiae* 复合体的四个物种进行高通量单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)分析,利用这种扩增子测序方法对 *ace1*、*gste2*、*vgsc* 和 *rdl* 抗性基因进行研究,共鉴定出杀虫剂靶基因中的 15 个非同义突变,包括以前描述的与抗性相关的突变和两个新突变(*vgsc* 中的 F1525L 和 *gste2* 中的 D148E)。该方法为疟疾流行地区提供了一种可靠且成本效益高的高通量监测 *Anopheles gambiae* 复合体蚊虫的方案,有较好的应用前景。

5 小结

目前蚊虫杀虫剂抗性检测方法研究已经取得了显著的进展,各种检测方法在灵敏度、准确性和适用范围方面具有不同特点,应相互补充使用,以避免未知耐药机制未被检测到的风险。总体上,生物测定法操作简单,对设备要求低,其缺点是所得结果具有滞后性,不利于抗性治理;生化法较生物测定法操作更为简单,但是在检测指标的选择上需要考虑杀虫剂的作用机制,若选择的指标不合适可能会得到错误的结论;分子生物

学方法具有快速、灵敏的特点,可用于抗性的早期检测,可测定抗性基因频率,其缺点是对操作要求较高,费用也高,目前多用于科研。应注意的是,以上列出的三种方法均不适用于行为抗性的检测。另外需要注意的是,蚊虫杀虫剂抗性产生的原因相当复杂,涉及多种生物学、生态学和环境影响。而且抗性基因和表型抗性并非绝对的对立关系,在微观层面上检测蚊虫杀虫剂抗性基因时,可能会出现虽然检测到有相关抗性基因但蚊虫却不表现出对相应杀虫剂的表型抗性。因此,在解读检测结果时应根据实际情况全面客观地分析抗性程度。

6 展望

我国于2021年6月获得世界卫生组织消除疟疾认证,这也是我国卫生事业发展史上的又一里程碑。在疟疾消除后,监测是保持工作能力、巩固消除成果、防止输入性疟疾病例引起继发性传播的关键措施,也是“2016—2030全球疟疾技术战略”的三大支柱之一。

随着全球气候变化和城市化进程加快,蚊虫传播疾病的范围和影响力可能进一步扩大。因此,深入研究蚊虫杀虫剂抗性检测方法和抗性基因具有重要的现实意义。在未来的研究中,以下几个方面值得关注:①开发新型抗性检测方法和技术,如将以往多种方法联合使用提高检测灵敏度和准确性,为蚊虫抗性监测和管理提供新的解决方案。②研究多重抗性检测方法,应对蚊虫对多种杀虫剂的抗性,以期能够在发生大规模交叉耐药前发现并及时调整防控策略。③研究内容应“动态化”。不再局限于单个抗性基因及相应调控功能的寻找与鉴定,将在蚊虫基因的相互作用网络中研究相关抗性基因。④利用大数据和生物信息学方法,分析蚊虫抗性基因的功能和调控机制。针对不同地区和种群的蚊虫抗性特点,制定精准防治策略。这包括合理使用和轮换杀虫剂、发展新型杀虫剂、优化灭蚊技术和方法、结合生物防治和环境治理等。同时,要注重蚊虫抗性的动态监测,及时调整防治策略,确保防治效果。⑤多学科交叉研究:为了更深入地研究蚊虫杀虫剂抗性,需要将生物学、生态学、分子生物学、遗传学、化学、环境科学等多个学科的研究成果相互融合。通过多学科交叉研究,可以在不同层次和角度揭示蚊虫抗性产生和发展的规律,为防治策略提供更全面的科学依据。

未来,随着技术的不断进步和发展,新的方法和技术将不断涌现,为传疟蚊虫抗性的监测和控制提供更加有效的手段。

【参考文献】

[1] Geneva; World Health Organization. Global vector control response 2017-2030 [EB/OL]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241512978>, 2017-10-02/2022-03-20.

[2] Hemingway J. Resistance: A problem without an easy solution [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2018, 151: 73-75.

[3] 叶莹. 杀虫剂发展史的简述[J]. *世界农药*, 2017, 39(1): 15-17.

[4] Geneva; World Health Organization. world malaria report 2022 [EB/OL]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240064898>, 2022-12-08/2023-03-15.

[5] Cibulskis RE, Alonso P, Aponte J, et al. Malaria: Global progress 2000-2015 and future challenges[J]. *Infect Dis Poverty*, 2016, 5(1): 61.

[6] Hemingway J, Ranson H, Magill A, et al. Averting a malaria

disaster: will insecticide resistance derail malaria control? [J]. *The Lancet*, 2016, 387(10029): 1785-1788.

[7] Şengül Demirak MŞ, Canpolat E. Plant-Based Bioinsecticides for Mosquito Control: Impact on Insecticide Resistance and Disease Transmission [J]. *Insects*, 2022, 13(2): 162.

[8] Kleinschmidt I, Mnzava AP, Kafy HT, et al. Design of a study to determine the impact of insecticide resistance on malaria vector control: a multi-country investigation [J]. *Malar J*, 2015, 14: 282.

[9] Vontas J, Grigoraki L, Morgan J, et al. Rapid selection of a pyrethroid metabolic enzyme CYP9K1 by operational malaria control activities [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(18): 4619-4624.

[10] Phoomkhong W, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T. Discriminating lethal concentrations for pyrethroid compounds used in susceptibility monitoring of *Anopheles epiroticus*, a malaria vector in Thailand [J]. *Acta tropica*, 2018, 185: 255-260.

[11] Balarabe Rabi u Mohammed, Yayo M Abdulsalam, Yusuf Y Deeni. Insecticide resistance to *Anopheles spp.* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Nigeria. [J]. *Inter J Mosquito Res*, 2015, 2(3): 56-63.

[12] Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. Malaria; mosquitoes, insecticide resistance [EB/OL]. <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/#>, 2020-07-16/2022-01-10.

[13] Naqqash MN, Gokce A, Bakhsh A, et al. Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests [J]. *Parasitol Res*, 2016, 115(4): 1363-1373.

[14] Liu N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions [J]. *Annu Rev Entomol*, 2015, 60: 537-559.

[15] James AA. Gene drive systems in mosquitoes: rules of the road [J]. *Trends Parasitol*, 2005, 21(2): 64-67.

[16] Hammond AM, Kyrou K, Bruttini M, et al. The creation and selection of mutations resistant to a gene drive over multiple generations in the malaria mosquito [J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(10): e1007039.

[17] Ffrench-Constant RH. Which came first: insecticides or resistance? [J]. *Trends Genet*, 2007, 23(1): 1-4.

[18] Zhu F, Lavine L, O'neal S, et al. Insecticide resistance and management strategies in Urban Ecosystems [J]. *Insects*, 2016, 7(1): 2.

[19] Luc Djogbenou VN, Philip A. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation [J]. *Malaria J*, 2010, 9(12): 1-8.

[20] Platt N, Kwiatkowska RM, Irving H, et al. Target-site resistance mutations (*kdr* and RDL), but not metabolic resistance, negatively impact male mating competitiveness in the malaria vector *Anopheles gambiae* [J]. *Heredity (Edinb)*, 2015, 115(3): 243-252.

[21] Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, et al. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2013, 43(4): 407-

- 416.
- [22] Ranson H, N'guessan R, Lines J, et al. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? [J]. Trends Parasitol, 2011, 27(2): 91-98.
- [23] Poupardin R, Reynaud S, Strode C, et al. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*; impact on larval tolerance to chemical insecticides [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2008, 38(5): 540-551.
- [24] 伍一军. 近二十年我国杀虫剂毒理学研究进展(II)——昆虫对杀虫剂的抗性研究[J]. 应用昆虫学报, 2020, 57(5): 995-1008.
- [25] Karunaratne P, De Silva P, Weeraratne T, et al. Insecticide resistance in mosquitoes: Development, mechanisms and monitoring [J]. Ceylon JSci, 2018, 47(4): 299-309.
- [26] Mavridis K, Wipf N, Medves S, et al. Rapid multiplex gene expression assays for monitoring metabolic resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae* [J]. Parasit Vectors, 2019, 12(1): 9.
- [27] Gleave K, Lissenden N, Chaplin M, et al. Piperonyl butoxide (PBO) combined with pyrethroids in insecticide-treated nets to prevent malaria in Africa [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2021, 5: CD012776.
- [28] Hemingway J, Hawkes N J, Mccarroll L, et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2004, 34(7): 653-665.
- [29] Davies T G, Field L M, Usherwood P N, et al. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels [J]. IUBMB Life, 2007, 59(3): 151-162.
- [30] Wood O, Hanrahan S, Coetzee M, et al. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* [J]. Parasit Vectors, 2010, 3: 67.
- [31] Kasai S, Komagata O, Itokawa K, et al. Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8(6): e2948.
- [32] Bass C, Jones C M. Mosquitoes boost body armor to resist insecticide attack [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(33): 9145-9147.
- [33] Balabanidou V, Kampouraki A, Maclean M, et al. Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(33): 9268-9273.
- [34] Roberts Dr C T, Harlan Hh, Hshieh P. Methods of testing and analyzing excito-repellency responses of malaria vectors to insecticides [J]. J Am Mosq Control Assoc, 1997, 13(1): 13-17.
- [35] Chandre FDF, Duchon S, Finot L, et al. Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae* [J]. Medical and Veterinary Entomology, 2000, 14(1): 81-88.
- [36] Russell TL, Govella NJ, Azizi S, et al. Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania [J]. Malar J 2011, 10(1): 80.
- [37] Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes [J]. Geneva; World Health Organization, 2018.
- [38] Brogdon WG, McAllister JC. Insecticide resistance and vector control [J]. Emerg Infect Dis, 1998, 4(4): 605-613.
- [39] Hemingway JKS. Mosquito carboxylesterases a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism [J]. Med Vet Entomol, 1998, 12(1): 39-45.
- [40] Nikou D, Ranson H, Hemingway J. An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae* [J]. Gene, 2003, 318: 91-102.
- [41] Zhong D, Chang X, Zhou G, et al. Relationship between knockdown resistance, metabolic detoxification and organismal resistance to pyrethroids in *Anopheles sinensis* [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55475.
- [42] Penilla Pr R A, Hemingway J, Torres JI, et al. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control: baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico [J]. Med Vet Entomol, 1998, 12(3): 217-233.
- [43] Muller P, Donnelly MJ, Ranson H. Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana [J]. BMC Genomics, 2007, 8: 36.
- [44] Ranson HND, Hutchinson M, Wang X, et al. Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, *Anopheles gambiae* [J]. Insect Mol Biol, 2002, 11(5): 409-418.
- [45] Ranson H, Lissenden N. Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes; A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control [J]. Trends in Parasitology, 2016, 32(3): 187-196.
- [46] Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for evaluating insecticide resistance in arthropod vectors using the CDC bottle bioassay [EB/OL]. http://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir_manual/ir_cdc_bioassay_en.pdf, 2015-11-02/ 2022-05-08.
- [47] Zamora PE, Balta LR, Palomino SM, et al. Adaptation and evaluation of the bottle assay for monitoring insecticide resistance in disease vector mosquitoes in the Peruvian Amazon [J]. Malar J, 2009, 8: 208.
- [48] Hemingway J, Ranson, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease [J]. Ann Rev Entomol, 45(1): 371-391.
- [49] Brogdon WG. Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. [J] Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol, 1988, 90(1): 145-50.
- [50] Brogdon WG, Barber AM. Microplate assay of glutathione S-transferase activity for resistance detection in single-mosquito triturates [J]. Comp Biochem Physiol B, 1990, 96(2): 339-342.
- [51] Geneva: World Health Organization. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, Bioefficacy and persistence of insecticides on treated surfaces [EB/OL]. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64879/WHO_CDS_CPC_MAL_98.12.pdf?sequence=1, 1998-12-28/ 2022-03-31.
- [52] Vontas JG, Enayati AA, Small GJ, et al. A simple biochemical

- assay for glutathione S-Transferase activity and its possible field application for screening glutathione S-Transferase-based insecticide resistance[J]. Pesticide Biochem Physiol, 2000, 68(3):184-192.
- [53] Aravindan V, Muthukumaravel S, Gunasekaran K. Interaction affinity of Delta and Epsilon class glutathione-s-transferases (GSTs) to bind with DDT for detoxification and conferring resistance in *Anopheles gambiae*, a malaria vector[J]. J Vector Borne Dis, March 2014, 51:8-15.
- [54] Brogdon WG, McAllister JC, Vulule J. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing the elevated oxidase mechanism for insecticide resistance[J]. J Am Mosquito Control Associat, 1997, 13(3):233-237.
- [55] Thomas P, Ryan D, Levin W. An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels[J]. Anal Biochem, 1976, 75:168-176.
- [56] Pasteur N, Georghiou GP. Filter paper test for rapid determination of phenotypes with high esterase activity in organophosphate resistant mosquitoes[J]. Mosq News, 1981, 41:181-183.
- [57] Pasteur NG. Improved filter paper test for detecting and quantifying increased esterase activity in organophosphate-resistant mosquitoes (Diptera: Culicidae)[J]. J Econ Entomol, 1989, 82(2):347-353.
- [58] Ahasan M D M, Rozy F, Rahman M D A, et al. Esterase Variability Among Chironomid Larvae[J]. Int. J. Sustain. Agril. Tech, 2013, 9(6):07-16.
- [59] Moores GD, Devonshire AL, Denholm I. A microtitre plate assay for characterizing insensitive acetylcholinesterase genotypes of insecticide-resistant insects [J]. Bulletin of Entomological Research, 2009, 78(3):537-544.
- [60] Riaz N. Effect of different plants extract on Acetylcholinesterase activity of *Aedes aegypti* and *Musca Domestica* adults [J]. Pakistan Journal of Science, 2023, 74(1):12-19.
- [61] 李士根, 甄天民, 赵玉强, 等. 酯酶滤纸法检测淡色库蚊抗药性的研究[J]. 地方病通报, 2001(2):103-105.
- [62] 李士根, 蒋滨, 甄天民, 等. 微量滴定板法测定蚊虫非特异性酯酶检测抗药性的研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2002(3):178-180.
- [63] Safi NH, Ahmadi AA, Nahzat S, et al. Evidence of metabolic mechanisms playing a role in multiple insecticides resistance in *Anopheles stephensi* populations from Afghanistan[J]. Malar J, 2017, 16(1):100.
- [64] Yusuf MA, Vatandoost H, Oshaghi MA, et al. Biochemical mechanism of insecticide resistance in malaria vector, *Anopheles gambiae*. l in Nigeria[J]. Iran J Public Health, 2021, 50(1):101-110.
- [65] Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s. s [J]. Insect Mol Biol, 1998, 7(2):179-184.
- [66] Bonizzoni M, Afrane Y, Dunn WA, et al. Comparative transcriptome analyses of deltamethrin-resistant and -susceptible *Anopheles gambiae* mosquitoes from Kenya by RNA-Seq[J]. PLoS One, 2012, 7(9):e44607.
- [67] Martinez-Torres DFC, Williamson MS, Darriet F, et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s. s. [J]. Insect Mol Biol 1998, 7(2):179-184.
- [68] Ranson HBJ, Vulule JM, Wang X, et al. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids[J]. Insect Mol Biol, 2000, 9(5):491-497.
- [69] Wang ZM, Li CX, Xing D, et al. Detection and widespread distribution of sodium channel alleles characteristic of insecticide resistance in *Culex pipiens* complex mosquitoes in China[J]. Med Vet Entomol, 2012, 26(2):228-232.
- [70] Lynd A, Ranson H, McCall PJ, et al. A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (kdr) detection in *Anopheles gambiae*[J]. Malar J, 2005, 4:16.
- [71] Bass C, Nikou D, Vontas J, et al. The vector population monitoring tool (VPMT): high-throughput dna-based diagnostics for the monitoring of mosquito vector populations [J]. Malar Res Treat, 2010, 2010:190434.
- [72] David JP, Strode C, Vontas J, et al. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors [J]. Proceedings Nat Aca Sci, 2005, 102(11):4080-4084.
- [73] Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number[J]. Anal Chem, 2011, 83(22):8604-8610.
- [74] Bass C, Nikou D, Donnelly MJ, et al. Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods[J]. Malar J, 2007, 6:111.
- [75] Ranson H, Jensen B, Vulule JM, et al. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. [J]. Insect Mol Biol, 2000, 9(5):491-497.
- [76] Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, et al. Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s. s. from Southern Benin and Nigeria[J]. BMC Genomics, 2008, 9:538.
- [77] Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, et al. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. [J]. Medical and Veterinary Entomology, 2003, 17(1):87-94.
- [78] Lynd A, Oruni A, Van't Hof AE, et al. Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* from the northern Democratic Republic of Congo, with extreme knockdown resistance (kdr) mutation frequencies revealed by a new diagnostic assay[J]. Malar J, 2018, 17(1):412.
- [79] Mavridis K, Michaelidou K, Vontas J. Highly sensitive droplet digital PCR-based diagnostics for the surveillance of malaria vector populations in low transmission and incipient resistance settings[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2021, 21(10):1105-1114.

- practical microbiology[J]. FEMS Microbiol Lett, 2021, 368(2): fnaa203.
- [16] 岳峰, 李尧, 张宏锋, 等. 虚拟仿真实验教学践行“两创”的路径探索[J]. 中国高等教育, 2023(11): 51-54.
- [17] Zhang G, Liu J, He Y, et al. Modifying *Escherichia coli* to mimic Shigella for medical microbiology laboratory teaching: a new strategy to improve biosafety in class [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1257361.
- [18] 李勇向, 张禄清, 郭海霞, 等. 基于虚拟仿真技术的机械设计课程教学改革实践[J]. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1671-1684.
- [19] 郭长存, 罗贯虹, 韩英, 等. 模拟医学教育在医学本科生临床技能教学中的作用[J]. 中国临床研究, 2017, 30(7): 993-994, 998.
- [20] 李忠玉, 刘良专, 梁瑜等. 多层次综合性医学虚拟仿真实验教学中心的建设与成效分析[J]. 实验技术与管理, 2016, 33(9): 220-222.
- [21] 岳峰, 李尧, 张宏锋等. 虚拟仿真实验教学践行“两创”的路径探索[J]. 中国高等教育, 2023(11): 51-54.
- [22] Jeremiah D. Evaluation of the hyflex, hybrid, and asynchronous online teaching modalities on student learning in graduate microbiology coursework[J]. FASEB, 2022, 36(S1): R6050.
- [23] Timmis K. A road to microbiology literacy (and more): an opportunity for a paradigm change in teaching[J]. J Microbiol Biol Educ, 2023, 24(1): e00019-23.
- [24] Smyth DS, Broderick NA, Goller CC. Editorial: Community series in tools, techniques, and strategies for teaching in a real-world context with microbiology, volume II[J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1156805.
- [25] Joyner JL, Parks ST. Scaffolding STEM literacy assignments to build greater competence in microbiology courses[J]. J Microbiol Biol Educ, 2023, 24(1): e00218-22.
- [26] 黄金玉, 徐能全, 王华京, 等. 医维度虚拟仿真教学平台在系统解剖学理论教学中的应用[J]. 赣南医学院学报, 2022, 42(12): 1338-1340.
- [27] 潘晋, 顾园, 秦啸峰, 等. 虚拟仿真技术在病原生物学实验教学中的应用及探索[J]. 医学教育管理, 2021, 7(04): 389-392, 397.
- [28] 孙琦. 国内外虚拟仿真教学研究进展与比较分析[J]. 江苏科技大学学报(社会科学版), 2022, 22(4): 96-104.
- [29] Moreno ACR, Pasternak TN, Piantola MAF, et al. Real-Lab-Day: undergraduate scientific hands-on activity as an authentic learning opportunity in microbiology education [J]. FEMS Microbiol Lett, 2023, 370: fna062.
- [30] de Sousa EBG, Alexandre B, Ferreira MR, et al. Applications of learning analytics in high schools: A systematic literature review [J]. Front Artif Intell, 2021, 4: 737891.
- [31] 杨闽楠, 邢效瑞, 王光西, 等. 医学微生物学虚拟仿真实验平台建设初探[J]. 基础医学教育, 2018, 20(2): 137-140.
- [32] 刘伯阳, 吕丽艳, 杜凤霞, 等. 虚拟仿真实验在病原生物学与免疫学实验教学中的应用研究 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2020, 41(17): 2220-2221.
- [33] Hu JP, Wu ZX, Xie T, et al. Applications of molecular simulation in the discovery of antituberculosis drugs: A review[J]. Protein Pept Lett, 2019, 26(9): 648-663.
- [34] Yu L, Wang W, Liu Z, et al. Construction of a virtual simulation laboratory for gene detection[J]. BMC Med Educ, 2023, 23(1): 423.
- [35] 陈晓军, 周莎, 邱竞帆, 等“虚实结合”实验教学模式在人体寄生虫学教学中的应用: 以血吸虫综合实验为例[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2022, 35(2): 180-183.
- 【收稿日期】 2023-10-25 【修回日期】 2023-12-11

(上接 119 页)

- [80] Akoglu H. User's guide to correlation coefficients[J]. Turk J Emerg Med, 2018, 18(3): 91-3.
- [81] Mavridis K, Wipf N, Muller P, et al. Detection and monitoring of insecticide resistance mutations in *Anopheles gambiae*: Individual vs pooled specimens[J]. Genes (Basel), 2018, 9(10).
- [82] Vontas J, Mavridis K. Vector population monitoring tools for insecticide resistance management: Myth or fact? [J]. Pestic Biochem Physiol, 2019, 161: 54-60.
- [83] Ingham VA, Jones CM, Pignatelli P, et al. Dissecting the organ specificity of insecticide resistance candidate genes in *Anopheles gambiae*: known and novel candidate genes. [J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 1-15.
- [84] Riveron JM, Ibrahim SS, Chanda E, et al. The highly polymorphic CYP6M7 cytochrome P450 gene partners with the directionally selected CYP6P9a and CYP6P9b genes to expand the pyrethroid resistance front in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 817.
- [85] Campos M, Phelan J, Spadar A, et al. High-throughput barcoding method for the genetic surveillance of insecticide resistance and species identification in *Anopheles gambiae* complex malaria vectors[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 13893.
- 【收稿日期】 2023-08-08 【修回日期】 2023-10-15