



中华人民共和国国家标准

GB/T 26352—XXXX
代替 GB/T 26352—2010

德国小蠊抗药性检测用生物测定法

Test methods of cockroach resistance to insecticides—The bioassay methods for
Blattella germanica

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准代替GB/T 26352—2010《蜚蠊抗药性检测方法 德国小蠊生物测定法》，与GB/T 26352—2010相比，除结构和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 修改了诊断剂量的定义（见 3.1，2010 年版的 2.1）；
- b) 修改了试虫和仪器要求（见第 4 章、第 6 章，2010 年版的第 3 章、第 5 章）；
- c) 补充修改了药膜法、点滴法的操作步骤（见 8.2.1、8.2.2、9.2.1 和 9.2.2，2010 年版的 7.2.1、7.2.2、8.2.1 和 8.2.2）；
- d) 补充了附录 A。

本标准由国家卫生健康标准委员会卫生有害生物防制标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由中国疾病预防控制中心负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委疾病预防控制局和规划发展与信息化司负责业务管理、法规司负责统筹管理。

本标准起草单位：北京市疾病预防控制中心、扬州大学、中国农业大学、江苏省疾病预防控制中心、陕西省疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、中国人民解放军军事科学院军事医学研究院。

本标准主要起草人：曾晓芑、李静、周小洁、钱坤、高希武、褚宏亮、吕文、任东升、佟颖、董言德。

德国小蠊抗药性检测用生物测定法

1 范围

本标准规定了德国小蠊 (*Blattella germanica*) 对有机磷类、氨基甲酸酯类、拟除虫菊酯类、新烟碱类等杀虫药剂抗药性的诊断剂量法和敏感基线法。

本标准适用于德国小蠊抗药性的生物测定。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

诊断剂量 diagnostic dose

能杀死敏感媒介生物种群 99%或 99.9%的剂量（浓度）或该剂量（浓度）的数倍，用以检测媒介生物种群的抗药性。

[来源：GB/T 31721—2015，4.5.4.14，有修改]

3.2

F1代 F1 generation

从现场捕捉的德国小蠊，繁殖后得到的第一代。

4 试虫

现场采集德国小蠊，室内饲养繁殖得到的F1代雄性成虫，试虫应形态完整、虫体健壮、虫龄尽量一致。

5 试剂

丙酮或其它有机溶剂，CO₂或乙醚，杀虫剂原药、凡士林与液体石蜡混合物（1：1）。

6 仪器

养虫缸，500 mL 的透明磨砂广口瓶，微量点滴器或微量进样器。

注：广口瓶尺寸高：16 cm，底部直径：8 cm，瓶口直径：5.5 cm，内表面积约为350 cm²。

7 测试条件

温度： $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度： $60\% \pm 10\%$ 。

8 敏感基线法

8.1 原理

依据杀虫剂使用剂量和死亡机率值关系建立毒力回归方程，以敏感品系得到的杀虫剂毒力回归线作为敏感基线。以待测昆虫种群得到的杀虫剂毒力回归线与敏感基线对比，通过比较由毒力回归线计算得到的半数致死量的变化来确定待测种群的抗性水平。

8.2 操作步骤

8.2.1 药膜法

用丙酮或其他有机试剂作为溶剂，将供试杀虫药剂原药（油）配成一定浓度的母液，然后将杀虫药剂母液稀释成系列浓度。通过预实验确定5~7个浓度梯度，最低浓度时试虫死亡率大于0小于20%，最高浓度时试虫死亡率大于80%小于100%。取不同浓度药剂溶液2.5 mL加入500 mL广口瓶中，不断转动广口瓶，使药液均匀分布于瓶口磨砂表面以下所有内壁，直至肉眼看不到液体流动。置于通风橱中过夜，使有机溶剂全部挥发。瓶口磨砂玻璃处涂抹凡士林与液体石蜡混合物（1：1），每瓶放试虫10头，接触1 h后，将试虫移入洁净容器内正常饲养。24 h（72 h）后记录死亡数。每个浓度试验重复3次，以相应溶剂处理为对照组。

8.2.2 点滴法

用丙酮或其他的有机溶剂将供试杀虫药剂原药（油）配成一定浓度的母液，然后将杀虫药剂母液稀释成系列浓度。通过预实验确定5~7个浓度梯度，最低浓度时试虫死亡率大于0小于20%，最高浓度时试虫死亡率大于80%小于100%。试虫用二氧化碳或乙醚麻醉，用微量点滴器将1 μL 药剂溶液点滴于雄性成虫第2、3对足基节间的胸部腹板上，每个处理点滴试虫10头。将处理后的试虫转入清洁容器内正常饲养。24 h（72 h）后记录死亡数。每个浓度试验重复3次，以点滴相应溶剂为对照组。

8.3 死亡判断

试虫不能正常爬行或完全不动视为死亡。

8.4 结果表述

结果用抗性倍数表述，抗性倍数=待测种群 LC_{50} (LD_{50}) 值/敏感种群 LC_{50} (LD_{50}) 值。

8.5 判别标准

敏感品系和测定样本 LC_{50} (LD_{50}) 的95%置信限不重叠，且抗性倍数大于等于5倍为抗性种群。

9 诊断剂量法

9.1 原理

依据药剂对敏感品系的毒力回归线，确定一个能够区分敏感个体和抗性个体或抗性杂合体的剂量。一般用2倍敏感品系的LD₉₉（LC₉₉）值作为诊断剂量。根据待检测德国小蠊种群在诊断剂量下的死亡率做为抗性判定标准。

9.2 操作步骤

9.2.1 药膜法

用丙酮或其他有机试剂将供试杀虫药剂配成一定浓度的母液，然后将杀虫药剂母液稀释到所需浓度，取2.5 mL药剂溶液加入500 mL广口瓶中（常见杀虫药剂对德国小蠊的诊断剂量见附录A中的表A.1），不断转动三角瓶，使药液均匀分布于瓶口磨砂表面以下所有内壁，直至肉眼看不到液体流动，置于通风橱中过夜，使有机溶剂全部挥发。瓶口磨砂玻璃处涂抹凡士林与液体石蜡混合物（1：1），每瓶放试虫10头，接触1 h后，将试虫移入洁净容器内正常饲养。24 h（72 h）后记录死亡数。试验重复10次，以相应溶剂处理为对照组。

9.2.2 点滴法

用丙酮或其他有机溶剂将供试杀虫药剂配成一定浓度的母液，然后将杀虫药剂母液稀释到诊断剂量需要的浓度（常见杀虫药剂对德国小蠊的诊断剂量见附录A中的表A.2）。试虫用二氧化碳或乙醚麻醉，用微量点滴器将1 μL药剂溶液点滴于雄性成虫第2、3对足基节间的胸部腹板上，以点滴相应溶剂为对照组。每次测定至少处理100头试虫。将处理后的试虫转入清洁容器内正常饲养。24 h（72 h）后记录死亡数。

9.3 死亡判断

试虫不能正常爬行或完全不动视为死亡。

9.4 结果表述

结果用死亡率表述。按式（1）计算死亡率。

$$M = \frac{N_m}{N} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

M ——死亡率；

N_m ——死亡虫数；

N ——试虫总数。

对照死亡率小于5%无需校正；对照死亡率在5%~20%之间，用Abbott公式进行校正；对照死亡率大于20%为无效测定。按式（2）计算校正死亡率。

$$M_m = \frac{M_t - M_c}{1 - M_c} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

M_m ——校正死亡率；

M_t ——处理组死亡率；

M_c ——对照组死亡率。

9.5 判别标准

死亡率或校正死亡率小于80%为抗性种群。

附录 A

(资料性)

常用杀虫药剂对德国小蠊的敏感基线和诊断剂量

表A.1给出了常用杀虫药剂对德国小蠊的诊断剂量。表A.2给出了常用杀虫药剂对德国小蠊的敏感基线。

表A.1 常用杀虫药剂对德国小蠊的诊断剂量

杀虫药剂	点滴法 μg/cockroach	药膜法 mg/L
氯菊酯 (Permethrin)	5.44	-
高效氯氰菊酯 (Beta-cypermethrin)	0.58	4.4
溴氰菊酯 (Deltamethrin)	0.16	-
残杀威 (Propoxur)	6.66	53.31
乙酰甲胺磷 (Acephate)	4.44	-
氟虫腈 (Fipronil)	7.30×10^{-3}	0.8

注1：以敏感品系的LD₉₉ (LC₉₉) 值的2倍作为诊断剂量。
注2：敏感品系来自北京市疾病预防控制中心，测定时间为2018年11月。
注3：氟虫腈处理后72 h记录试虫死亡数。

表A.2 常用杀虫药剂对德国小蠊的敏感基线

杀虫药剂	点滴法 (95%置信区间) μg/cockroach	药膜法 (95%置信区间) mg/L
氯菊酯 (Permethrin)	0.21 (0.17~0.25)	-
高效氯氰菊酯 (Beta-cypermethrin)	2.19×10^{-2} (1.83×10^{-2} ~ 2.64×10^{-2})	0.6 (0.4~0.6)
溴氰菊酯 (Deltamethrin)	6.11×10^{-3} (4.83×10^{-3} ~ 8.17×10^{-3})	-
残杀威 (Propoxur)	0.35 (0.29~0.42)	6.05 (0.87~18.22)
乙酰甲胺磷 (Acephate)	0.31 (0.28~0.36)	-
氟虫腈 (Fipronil)	1.46×10^{-3} (1.33×10^{-3} ~ 1.61×10^{-3})	0.04 (0.02~0.06)

注1：敏感品系来自北京市疾病预防控制中心，测定时间为2018年11月。
注2：氟虫腈处理后72 h记录试虫死亡数。

国家标准《德国小蠊抗药性检测用生物测定法》（修订）

征求意见稿

编制说明

一、工作简况（包括任务来源与项目编号、标准起草单位、协作单位、主要起草人、简要起草过程）

（一）任务来源、起草单位、起草人

根据国家卫健委印发的《国家卫生健康委法规司关于下达卫生健康标准体系升级改造项目计划的通知》（国卫法规综标便函[2021]6号）要求，根据复审结论及本专业标准体系框架，本标准列入由中国疾病预防控制中心承担《公共卫生标准体系升级改造》项目的标准修订目录。

本项目由北京市疾病预防控制中心牵头，由扬州大学、中国农业大学、江苏省疾病预防控制中心、陕西省疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、中国人民解放军军事科学院军事医学研究院共同组成标准起草工作组完成。

曾晓芃，北京市疾病预防控制中心主任技师，主任，国家卫生有害生物防制标准专业委员会主任委员。长期从事媒介生物控制工作，为 GB/T 26352—2010《蜚蠊抗药性检测方法 德国小蠊生物测定法》的第一起草人，本次标准修订项目中负责确定标准文本框架，确定主要技术指标。

李静，北京市疾病预防控制中心助理研究员，兼任国家卫生有害生物防制标准专业委员会秘书处秘书。从事媒介生物控制，主要研究方向为昆虫毒理学。负责国内外文献和标准的整理，负责测定敏感基线和诊断剂量、撰写文本，征求意见及意见汇总。

周小洁，北京市疾病预防控制中心副研究员，从事媒介生物防制，重点研究方向为蜚蠊防制和化学杀虫剂安全使用。负责问题分析、收集国内外相关文献，负责测定敏感基线和诊断剂量。

钱坤，扬州大学副教授，国家卫生有害生物防制标准专业委员会委员、副秘书长。负责修订意见的汇总整理、问题分析。

高希武，中国农业大学教授。主要研究方向为昆虫毒理学。负责重大意见分

歧的处理与解释。

褚宏亮，江苏省疾病预防控制中心主任技师，国家卫生有害生物防制标准专业委员会委员。负责问题分析、修改文本，以及部分药剂的敏感基线验证工作。

吕文，陕西省疾病预防控制中心主管医师。负责文献查阅、问题分析，部分药剂的敏感基线验证工作。

任东升，中国疾病预防控制中心传染病预防控制所，研究员。负责意见汇总分析，试验验证。

佟颖，北京市疾病预防控制中心主任技师，国家卫生有害生物防制标准专业委员会秘书长。负责协调专家征集意见及问题分析。

董言德，军事科学院军事医学研究员微生物流行病学研究所高级实验师，国家卫生有害生物防制标准专业委员会委员，中国卫生有害生物防制协会专家委员会委员。负责技术内容实验验证。

（二）简要起草过程

接受课题研究和标准修订任务后，本项目组基于《病媒生物抗药性检测标准实施情况及跟踪评价》项目报告中反馈的标准修订意见，查阅了国内外关于德国小蠊抗药性的文献和 WHO 指南，并进行了分析归纳。同时，召开了专家研讨会，对于修订的指标内容进行研讨，考虑到标准的适用性和可操作性，对相关参数进行了实验室验证，最终确定标准的技术修订方案。

根据修订方案对标准文本进行修改后，经研讨和沟通，工作组达成一致意见，形成标准征求意见稿。

二、与我国有关法律、法规、规章、规范性文件和其他标准的关系

目前国内已经发布的病媒生物抗药性检测包括：《蚊虫抗药性检测方法 生物测定法》（GB/T 26347—2010）、《蚊虫抗药性检测方法 不敏感乙酰胆碱酯酶法》（GB/T 26348—2010）、《蝇类抗药性检测方法 家蝇不敏感乙酰胆碱酯酶法》（GB/T 26349—2010）、《蝇类抗药性检测方法 家蝇生物测定法》（GB/T 26350—2010）、《蜚蠊抗药性检测方法 德国小蠊不敏感乙酰胆碱酯酶法》（GB/T 26351—2010）、《蜚蠊抗药性检测方法 德国小蠊生物测定法》（GB/T 26352—2010）、《蝇类抗药性检测方法 家蝇不敏感乙酰胆碱酯酶等位基因法》（WS/T 594—2018）。

为进一步提高标准的可操作性和适用性，本项目在 GB/T 26352—2010 的基础上，补充和完善了德国小蠊抗药性检测的生物测定方法和常见杀虫药剂对德国小蠊的敏感基线和诊断剂量。

抗药性检测可为科学合理选择杀虫剂、提高防制效果，以及制定防制方案和延缓害虫对杀虫剂产生抗药性提供依据和指导。GB/T 26352—2010 为国家卫生有害生物防制标准专业委员会确定的标准体系框架之内，同时，该标准已用于国家卫生城市创建工作和全国病媒生物抗药性监测方案中，与其他标准相协调。

三、国外相关法律、法规、文件和标准情况的对比说明

在本标准的修订过程中，查阅了WHO的《Insecticide resistance and vector control》《Instruction for determining the susceptibility or resistance of mosquito larva to insecticides》《Resistance of vectors of disease to pesticides》(1980, 1986, 1992)、《Suppliers for monitoring insecticides resistance in disease vectors-Procedures and Conditions》(WHO/CDS/CPE/PVC/2001.2)等指南或手册。同时也参考了Pyrethroid resistance and cross-resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L) (Wei PY, 2001), Insecticide Resistance of Several Field-Collected German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) Strains (Wu XY, 2017), Carbamate Insecticides Resistance Monitoring . of Adult Male German Cockroaches, *Blattella germanica* (L.), in Southern Iran (Mohammad Djaefar, 2013)等相关文献。

WHO的指南中关于德国小蠊的生物测定方法为1970年公布的药膜法，使用的指标为LT₅₀，即致死中时间（lethal time）。记录德国小蠊接触药剂不同时候后被击倒的数量，实际应为KT₅₀，即击倒中时间，knockdown time。该方法在1992年发布的Vector resistance to pesticides. WHO TRS N° 818中建议到：应确定德国小蠊抗药性测定时的接触时间和接触后观察时间。所提供的药剂及推荐剂量为狄氏剂、氯丹、二嗪农、马拉硫磷、杀螟硫磷等已不在蜚蠊控制中使用的杀虫剂。因此，在现阶段该方法不具有参考意义。

四、标准制定原则

本标准的制定依据以下原则：

1. 标准文本编写原则

按照国家卫生健康委员会印发的《卫生健康标准编写指南》，参考 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准结构和编写》中的规定进行编写。

2. 与其他相关标准协调的原则

本标准与已经发布的标准相协调。本标准中定义的阐述，术语、符号、概念，及饲养环境的规定，力求与 GB/T 31721—2015《病媒生物控制术语与分类》及 NY/T 1964.4—2010《农药登记用卫生杀虫剂室内试验试虫养殖方法 第4部分：德国小蠊》等标准保持一致。

3. 按体系制定标准的原则

标准的制定遵循了卫生有害生物防制标准体系的基本原则，符合卫生有害生物防制标准体系的整体思路和框架，使之成为卫生有害生物防制系列标准中的有机组成部分。

五、确定各项技术内容（如技术指标、参数、公式、试验方法、检验规则等）的依据

1. 修改了诊断剂量的定义

修改理由为：应与现行有效的 GB/T 31721—2015《病媒生物控制术语与分类》尽量保持一致。GB/T 31721—2015 标准原文中诊断剂量的定义为“能杀死敏感病媒生物种群 99% 或 99.9% 死亡率的剂量（浓度）或该剂量（浓度）的数倍，用以检测病媒生物种群的抗药性。”因在学科分类中统一使用了媒介生物。在此基础上，将“病媒生物”改为了“媒介生物”，为表述跟清晰，删除了“死亡率”。改为“能杀死敏感媒介生物种群 99% 或 99.9% 的剂量（浓度）或该剂量（浓度）的数倍，用以检测媒介生物种群的抗药性。”

2. 修改了试虫要求

追踪评价报告中反馈意见中提到，原来规定的时间“F1代羽化后7~15天的雄性成虫，要求过于严格，不利于基层人员操作。另外，德国小蠊不像蚊虫和蝇类的龄期容易人为分开，且德国小蠊成虫生活周期长。实际操作中成虫龄期容易不一致，也影响可用试虫的数量。经过文献检索，WHO的蜚蠊生物测定方法对试虫要求宽泛，优先选择雄虫，虫量不够的情况下，可以选择雌虫或若虫。在检索到的SCI文献中，德国小蠊的生测试虫多选用雄性成虫（Wei YP, 2001; Wu XY, 2017; Mohammad D.M.F, 2013; William J.C, 1976）。因此，本标准将试虫的要求进行修改，要求形态完整、虫体健壮、虫龄尽量一致的雄性成虫用于生物测定。

3. 修改了药膜法使用的容器

原标准中使用的为500 mL的三角瓶，在追踪评价中反映制作药膜时不易操作，建议使用广口瓶。经过测量，500 mL三角瓶外表面积约为390 cm²，500 mL透明磨砂广口瓶外表面积约为370 cm²。用2.5 mL丙酮溶液加入广口瓶中，溶剂量同样适合，且相对于三角瓶更易于操作。此外，在WHO的指南和文献中，采用果酱瓶，未使用三角瓶。因此，为统一规格、提高标准的可操作性，在标准文本中改为了透明磨砂广口瓶，并给出了参考尺寸。

4. 在附录中补充了常用杀虫药剂对德国小蠊的敏感基线和诊断剂量

根据农药信息网上登记注册的防制蜚蠊的药剂有效成份、剂型，按照不同药剂类型，选出了具有代表性的10类药剂（表1）。根据药剂的作用方式，针对点滴法，选择了氯菊酯（Permethrin）、高效氯氰菊酯（Beta-cypermethrin）、溴氰菊酯（Deltamethrin）、残杀威（Propoxur）、乙酰甲胺磷（Acephate）和氟虫腓（Fipronil），给出敏感基线和诊断剂量；针对药膜法，根据登记的滞留喷洒剂型和数量，以及药剂类型，选择高效氯氰菊酯（Beta-cypermethrin）、残杀威（Propoxur）和氟虫腓（Fipronil）3种药剂，给出敏感基线和诊断剂量。

表1 我国登记的防制蜚蠊用的代表性药剂

	有效成分	单剂	混剂	共计	滞留喷洒的剂型	滞留喷洒的剂型数量	类型	中毒症状
1.	高效氯氰菊酯	58	120	178	乳油、悬浮剂、可湿性粉剂、可溶液剂、微乳剂、水乳剂	58	II型（含 α -CN）	痉挛、麻痹、死亡
2.	残杀威	28	49	77	乳油、悬浮剂、可湿性粉剂、可溶液剂、微乳剂、水乳剂、水乳剂	21	氨基甲酸酯类（作用于乙酰胆碱酯酶）	兴奋、痉挛、抽搐、死亡
3.	溴氰菊酯	33	15	48	悬浮剂、可湿性粉剂	18	II型（含 α -CN）	痉挛、麻痹、死亡
4.	高效氯氰菊酯	20	3	23	可湿性粉剂、微囊悬浮剂、悬浮剂、水分散粒剂、	17	II型（含 α -CN）	痉挛、麻痹、死亡
5.	氟虫腓	69	1	70	悬浮剂	13	苯基吡唑类（阻碍昆虫 γ -氨基丁酸控制的氯化物代谢）	兴奋
6.	氯菊酯	6	208	214	可湿性粉剂、水乳剂、水溶液剂、乳油、微乳剂	8	I型（不含 α -CN）	兴奋、击倒效应
7.	呋虫胺	16	0	16	可溶液剂	4	第三代新烟碱类（硝基胍类，抑制乙酰胆碱受体使昆虫的神经系统发生紊乱）	麻痹、死亡
8.	吡虫啉	41	4	46	悬浮剂	3	新烟碱类（作用点是昆虫烟碱乙酰胆碱酯酶受体，从而干扰害虫运动神经系统使化学信号传递失灵）	麻痹、死亡

9.	乙酰甲胺磷	17	5	22		0	有机磷类（作用于乙酰胆碱酯酶）	兴奋、痉挛、抽搐、死亡
10.	毒死蜱	11	2	13		0	有机磷类（作用于乙酰胆碱酯酶）	兴奋、痉挛、抽搐、死亡

5. 其他修订

依据所收到的反馈意见，本次修订对于收到的各条意见进行了认真研究，基于标准修订与书写的要求，对于正确合理的意见进行了采纳，并在修订中进行相应的修改。这些修改将有助于标准理解，提高标准的适用性和可操作性。

六、重大意见分歧的处理结果和依据

对于反馈意见中提出的增加通过计算 KT_{50} 的药膜法作为抗性判定方法之一。经过查阅 WHO 指南和国内文献，发现：1) WHO 果酱瓶法测定蜚蠊的抗药性时，不同药剂选用了不同浓度，而非国内文献中所有药剂统一使用 0.05% 的浓度，因不同药剂的作用方式不同，对试虫的药效也不同，使用统一浓度不科学；2) WHO 的方法中使用的药剂为狄氏剂、氯丹、二嗪农、马拉硫磷、杀螟硫磷等已不在蜚蠊控制中使用的老一代杀虫剂，在 1992 年发布的 *Vector resistance to pesticides. WHO TRS N° 8183* 中，也提出该方法不适合于击倒性药剂，并且建议应确定德国小蠊抗药性测定时的接触时间和接触后观察时间；3) 在实际工作中，同一个试虫可能存在多次击倒-恢复-击倒的情况，数据出现波动、噪音大，最后数据的确定依赖主观因素强，从而影响最终结果；4) 与点滴法相比，药膜法的试虫受药量受试虫爬行能力、药剂种类（中毒后是否兴奋）影响；5) 同一德国小蠊品系用不同方法检测出的抗性水平往往存在很大差异。一般 LT_{50} （ KT_{50} ）最低、 LC_{50} 居中， LD_{50} 最高。（Cochran DG. 1997）。选用的指标不同，将直接抗性结果的判定。因此，在现阶段，通过计算 KT_{50} 的药膜法尚不合作为标准的方法。

七、标准属性的建议

本标准属于方法类标准，待标准通过审查后将建议作为推荐性国家标准发布实施，并替代 GB/T 26352—2010《蜚蠊抗药性检测方法 德国小蠊生物测定法》。

八、其他予以说明的几个问题

无。