



รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

มาตรฐานชุดทดสอบการตอบสนองต่อสารเคมีฆ่าแมลงเชิงพฤติกรรมในยุงพาหะนำโรค

Standardization of Excito-Repellency escape chamber for mosquito behavior

โดย

รศ.ดร.ธีรภาพ เจริญวิริยะภาพ

วันที่ 30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2547

สัญญาเลขที่ RSA/01/2545

รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

มาตรฐานชุดทดสอบการตอบสนองต่อสารเคมีฆ่าแมลงเชิงพฤติกรรมในยุงพาหะนำโรค
Standardization of Excito-Repellency escape chamber for mosquito behavior

โดย

รศ.ดร.ธีรภาพ เจริญวิริยะภาพ
ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
บางเขน กรุงเทพฯ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงไปด้วยดีด้วยความร่วมมือของหลายฝ่าย โดยเฉพาะ สำนักงานสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้สนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัยโครงการทุนพัฒนานักวิจัย ตามโครงการเลขที่ RSA/01/2545 โดยมีนายธีรภาพ เจริญวิริยะภาพ เป็นหัวหน้าโครงการ ซึ่งผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณกองการเกษตรและสหกรณ์ สำนักงานทหารพัฒนา กองบัญชาการทหารสูงสุด บ้านพุเตย ตำบลท่าเสา อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ที่อำนวยความสะดวกเรื่องที่พักและสถานที่ทำงานวิจัยในระหว่างการปฏิบัติงาน และขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ร่วมสนับสนุนเงินทุนสมทบเพื่อให้โครงการตามสัญญาเลขที่ RSA/01/2545 ดำเนินไปด้วยความราบรื่น สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ นิสิต นักศึกษาและผู้ร่วมงานทุกคนที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

Project Code: RSA/01/2545

Project Title: Standardization of Excito-Repellency escape chamber for mosquito behavior

Investigator: Theeraphap Chareonviriyaphap, Department of Entomology, Faculty of
Agriculture, Kasetsart University Bangkok

E-mail: faasthc@ku.ac.th

Project Period: 3 Yrs

The objective of this present study is to complete development of tests for quantifying behavioral responses of disease vectors to insecticides using the excito-repellency test system. Seventeen test populations of mosquitoes were used for the standardization processes. Of these, nine test populations were *Aedes aegypti* and eight were *Anopheles* mosquitoes. All test populations were exposed to pyrethroids and DDT at the operational field doses. Factors influencing the excito-repellency test results were characterized. These included time of the test, temperature, humidity, holding period, age of mosquitoes, nutritional status, physiological conditions, insecticide levels, resistant vs. susceptible test populations, sources of test paper, field and laboratory test populations and contact vs. noncontact with insecticides.

All test populations of *Anopheles* showed marked contact irritancy to deltamethrin compared to paired controls and non-contact repellency trials, in controlled laboratory colonies and field-caught populations. The degree of repellency was less profound than irritancy but, in most cases, produced a significant escape response compared to paired controls. In case of *Ae. aegypti*, both field and laboratory test populations demonstrated irritancy action, not repellency function as seen in *Anopheles* mosquitoes. In this study, very interesting result was found when behavioral responses to insecticides of two species within *An. minimus* taxon were compared. *Anopheles minimus* species A showed dramatically strong repellency function whereas *An. minimus* C demonstrated the irritancy actions to pyrethroids and DDT. This will provide a basic cue of how insecticide resistance (physiological) will occur in the mosquito populations.

In this study, seasonal abundance and blood feeding activity of *An. minimus* was also obtained. In addition, other minor factors that may influence test results were tested to compare the behavioral responses of *An. minimus*. Results are the subject of this report.

Keywords: Irritancy-Repellency Mosquitoes Insecticides Resistance

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดทดสอบการสารเคมีให้ครบ
กระบวนการ เพื่อใช้ทดสอบพฤติกรรมของแมลงพาหะนำโรคเมื่อมีการนำสารเคมีมาใช้
ในการควบคุม ซึ่งการพัฒนาระบวนการชุดทดสอบดังกล่าวเพื่อใช้ทดสอบการทำงานของ
ของสารเคมีว่าจะมีผลกระทบกับแมลงพาหะอย่างไร ในการนี้ได้ใช้ยุงทั้งหมด 17
ประชากร (ยุงก้นปล่อง 8 ประชากร ยุงลาย 7 ประชากร) เป็นต้นแบบในการกำหนด
มาตรฐานปัจจัยต่างๆ ของชุดทดสอบ นำยุงทั้ง 17 ประชากรมาทดสอบกับสารเคมีใน
กลุ่มดีทีและสารไพรีทรอยด์อีกหลายชนิดที่ปัจจุบันยังคงใช้กันในพื้นที่ในการควบคุมยุง
ในการทดสอบแต่ละครั้งได้หาความเหมาะสมของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการใช้เครื่องมือ
และ/หรืออาจทำให้การตอบสนองของยุงเปลี่ยนแปลงไป เช่น เวลาที่ทดสอบ อุณหภูมิ
ความชื้น ระยะเวลาพักยุงก่อนการทดสอบ อายุของยุง สถานะภาพทางสรีระและ
โภชนาการ ระดับความเข้มข้นของสารเคมีฆ่าแมลง สถานะภาพการต้านทานต่อสารเคมี
ของยุง กระดาษเคลือบสารเคมี ยุงจากพื้นที่/ห้องทดลอง การได้สัมผัสหรือไม่สัมผัส
สารเคมี เป็นต้น ซึ่งได้ผลเรียบร้อยแล้วเพื่อกำหนดระดับความเหมาะสมของปัจจัยต่างๆ
ขณะที่ทำการทดสอบพฤติกรรมการตอบสนองของสารเคมี

หลังจากกำหนดปัจจัยต่างๆ ครบแล้ว การศึกษาพบว่าสารเคมีทั้งหมดไม่ได้ฆ่ายุง
ที่ใช้ในการศึกษา โดยยุงก้นปล่องบินหลบหนีไปหลังจากที่ได้สัมผัสกับสารเคมี มี
บางส่วนของยุงก้นปล่องได้หลบหนีไปก่อนที่จะสัมผัสกับสารเคมี ส่วนยุงลายทุก
ประชากรจะต้องสัมผัสสารเคมีก่อนที่จะหลบหนี นอกจากนี้พบว่ายุงมินิมัส เอ และ ซี มี
การสนองตอบต่อสารเคมีอย่างแตกต่างกัน มินิมัสเอส่วนใหญ่หลีกเลี่ยงสารเคมีโดยไม่ได้
สัมผัสกับสารเคมีเลย ขณะที่มินิมัสซีไม่หลีกเลี่ยงสารเคมีหากไม่ได้รับการสัมผัสกับสาร
นั้นๆ ข้อมูลเหล่านี้มีประโยชน์มากในการศึกษาการต้านทานสารเคมีของยุงพาหะใน
อนาคต ดังได้เห็นจากยุงลายที่ต้านทานสารเคมีอย่างมาก

นอกจากได้สร้างบรรทัดฐานในการศึกษาพฤติกรรมต่อสารเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ
แล้วการวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาการกระจายตัวและการออกหาอาหารของยุงก้นปล่องมินิมัส
พบว่ายุงก้นปล่องมินิมัสบางส่วนยังคงหากินและเกาะพักในบ้านเรือน

INTRODUCTION

One of the principal techniques of vector borne disease abatement has been through various methods of vector control to reduce transmission risk. For decades, insecticides have been used to control vectors of disease. Today, resistance of several mosquito vectors including *Anopheles minimus* and *Aedes aegypti* to DDT and pyrethroids occurs. Concomitantly, mosquito populations in some countries have not developed resistance in spite of regular insecticide use, especially with vectors of malaria. These difference responses to insecticides have raised the issue of avoidance behavior (sometimes referred to as "behavioral resistance") having a role in disease prevention and in the suppression of insecticide resistance, especially in malaria vectors (Roberts and Andre 1994).

Avoidance of insecticides by malaria vectors has been recorded in the presence and absence of physiological resistance and the relationships, if any, between resistance and behavioral avoidance are still unclear. The failure to understand these relationships is due to a remarkable shortage of systematic and detailed studies on behavioral responses of vectors to insecticides. The contributions that insecticide resistance vice insecticide-avoidance contribute to the reemerging malaria problem are unclear.

Excito-repellency tests to study the irritant (contact) effect of insecticides on mosquitoes have been developed as far back as 1963 (WHO 1970). Investigations have been conducted on malaria vectors using modified WHO excito-repellency test boxes (Bondareva et al. 1986; Ree and Loong 1989; Pell et al. 1989). The typical chamber mimics a house miniturized, having walls, an entrance and an exit window. Unfortunately, no method for assessment of behavioral responses of mosquitoes have been fully accepted, indicating the past difficulties of conducting excito-repellency testing, data analysis and interpretation (Roberts et al. 1984; Evan 1993). Until recently, adequate methods have not been available for testing non-contact repellency (Roberts et al. 1997). Chareonviriyaphap et al. (1997), used an improved experimental escape chamber that was provided information on both contact irritability and non-contact repellency for behavioral response tests on *Anopheles albimanus* in laboratory and natural field conditions. However, this prototype test system was cumbersome, sometimes difficult to use, and required much time to attach the test papers onto the inner walls, especially under field conditions. To help alleviate these problems, an improved collapsible, metal excito-repellency test chamber was developed as described in Chareonviriyaphap and Aum-Aong,

2000. This test system has already been used in a study of behavioral responses of a *An. minimus* laboratory colony to DDT. Using this test system obtained highly reproducible test results (Chareonviriyaphap, et al. 2000).

As with DDT, synthetic pyrethroids also elicit behavioral responses in insects. Recently, mosquito control strategies using pyrethroid-impregnated bed nets and intradomiciliary spraying with pyrethroids has been introduced to many countries including Thailand. The continuing prospect of wide-scale pyrethroid use should be a major stimulus for extensive studies on the significance of pyrethroid avoidance in Thailand. The role of pyrethroid irritability and repellency should be clearly defined for important malaria vector before large-scale programs are initiated and limited major resources are expanded.

OBJECTIVE

Presently, there are no adequate standardized tests for accurately for quantifying the behavioral responses of malaria vectors to insecticide sprayed house walls. The proposed research herein was to quantify vector behavioral responses to insecticides using excito-repellency test chambers. The ultimate goal was to complete of tests for measurement of behavioral responses of malaria vectors to insecticides used in vector control. The improved test systems was evaluated against level of insecticides and types of behavioral responses as measured both in the laboratory and in the field.

A regime of standardizing test procedures was conducted, as follows:

A.the accuracy of the excito-repellency test system in counting specimens escaping from test chambers was verified.

B.the relationships between escape frequency and variations in number of test specimens were defined.

C.An ambient temperature, relative humidity, the cycle of dark and light, nutritional and physiological conditions of test specimens, insecticide tested papers, different level insecticides, different populations, and length of holding periods before specimens taking off from the chamber were completely compared.

C.escape frequency between female mosquitoes released into filter paper-lined chambers and female released into chambers with the screen cylinders was measured (with prevent contact with the surface of filter paper) and,

D.the relationships of these variables and the relationship between these and insecticides used in this study were measured.

Study site. Based on preliminary surveillance on pesticide avoidance behavior in *Anopheles minimus*, a vector of malaria in Thailand. Ban Pu Teuy, Kanchanaburee Province was selected for a study site. This site is a perfect location for this proposed study since all three main malaria are abundance and is useful for comparative field studies, for collecting specimens for electrophoretic analysis, for testing laboratory-based assays of excito-repellency behavior, and for detection of insecticide resistance.

Isozyme. Specimens from field site were obtained by landing collection. We emphasized landing collection simply because we would like to know exactly which species of *An. minimus* (A and C) remains endophilic and endophagic¹. Polyacrylamide gel electrophoresis will be performed on ODH following the technique of Green et al. 1991. ODH is used as a diagnostic enzyme to separate a sibling species of *An. minimus*.

Physiological resistance assay: Populations of *Anopheles minimus* adults were exposed for one hour to diagnostic dosages of DDT, deltamethrin and lambdacyhalothrin etc according to the WHO protocol (World Health Organization 1981). For each test, five cylinders (2 for the controls and 3 for the treatments) were used. Control cylinders contain filter paper impregnated with solvent; whereas treatments contained paper impregnated with the diagnostic concentration of insecticide in solvent. Twenty-five mosquitoes were introduced into each cylinder for one hour. Mosquitoes were then transferred to holding containers, and a 10% sucrose solution will be provided. Mortalities were recorded at 24 hours. Each test was replicated 3 times.

Measurement and criteria for assessing resistance status: Insecticide resistance/susceptibility was measured using the standard World Health Organization susceptibility test procedures which were a more or less standardized and precise method of measuring mainly field materials. In use of discriminating dosages, the test results had been classified and reconfirmed on the F1 generation as:

- A.>90% mortalities: susceptible
- 50-90% mortalities:intermediate,and
- >50%mortlailities: resistant

¹ Previous work showed both endophilic (endophagic) and exophilic (exophagic) of *An. minimus*

Excito-repellency test: A standardizing test procedures was conducted as follows:

1. verify the accuracy of counts of specimens taking off from test chambers.
2. define the relationships and interactions between numbers escaping and variations in: (a) number of test specimens, (b) temperature, (c) relative humidity, (d) a cycle of dark and light period, (e) nutritional state and physiological condition of test specimens, (f) mosquito species and (g) lengths of holding period before specimens are allowed to escape test chambers.
3. compare the escape patterns of female releases in filter paper-lined chambers with females released in chambers with the screen cylinders (with prevent contact with the surface of filter paper).
4. determine the relationships of variables listed in 1,2 and 3 and variable doses of insecticides used in malaria control program.
5. In collaboration with the Department of Biostatistic, Faculty of Liberal Arts and Science, the preliminary data to evaluate various statistical treatments for the bioassay data was used.

Only *An. minimus* females was used in excito-repellency tests. Each test was replicated at least 4 times. To fulfill the goals of this research, test was performed to compare insecticides used in malaria control program, different concentrations of insecticides, insecticide resistant versus insecticide susceptible populations, colony versus field-caught populations, insecticide contact versus non-contact, and short term (30 minutes) versus long term(four hours) exposure etc.

Observations on mortality of test populations were made immediately after each test was compared, i.e., the number of dead specimens inside the exposure chamber was recorded. Additionally, test specimens collected from the exposure chamber were held separately for observations on 24 hour mortalities.

We used the life table method, a survival analysis approach, to estimate mosquito escape rates (or rate of mosquitoes staying in the chambers) and then compare differences in mosquito escape among populations, insecticides and concentrations (doses) of insecticides). With this method, we estimated the mosquito escape rate one-minute intervals. We treated mosquitoes that escaped as "deaths" and those remaining in the exposure chamber as "survivals". The time in minutes for 50% and 90% of the test population to escape was estimated with the life table method and these estimates were used as the "escape time" summary statistics (ET50 and ET90).

MATERIALS

AN EXCITO REPELLENCY ESCAPE CHAMBER SYSTEM (ERECS)

Four ERECS were used for a complete development of tests for quantifying behavioral responses of malaria vectors to insecticides. Standardized method was included as described in Method and Experimental Design Section. Today, there are no adequate standardized tests for quantifying the behavioral responses of malaria vectors to insecticide sprayed house walls. Another component of the proposed research was to continue developing and evaluating tests for quantifying vector responses to insecticides. The test systems were evaluated against level and types of behavioral responses measured both in the laboratory and in the field. This ERECS system was developed by PI using the Thailand Research Fund (TRF) grant (PDF 67/2540).

MOSQUITO POPULATIONS

1. Field populations: *Anopheles minimus* was chosen as the test species as it is one of the most important malaria vector in Thailand. Based on our previous work, in addition, *An. minimus*, is endophagous, and anthropophilic, and thus is likely to come into contact with DDT and pyrethroids used in bed net impregnation and intradomicillary spraying. *Anopheles minimus* populations will be obtained from landing collection near a slow running stream of Ban PuTuey, Ta Soa County, Ti Yok Nai District, Kanchanaburee Province, western Thailand, and Chumporn Province, south of Thailand. *Anopheles minimus* population from Mea Sot was also tested as a compared field species.

2. Laboratory colony: This colony has been maintained in the laboratory since 1994. It was originally collected from human landing collection in Prae Province, north of Thailand in 1994. Subsequently, it has been maintained in the laboratory-controlled condition at the Malaria Division, Department of Communicable Disease Control (CDC), Ministry of Public Health, Nontaburee Thailand. The colony was received from the Malaria Division (CDC) and is currently maintained in an insectary at the Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

3. *Aedes aegypti* field and laboratory populations. *Aedes aegypti* populations were used for standardization processes. Six field populations, three from Thailand and three from Indonesia, and 3 laboratories were used for these analysis.

INSECTICIDES

- 1.DDT (Dichloro-diphenyl-trichloroethane) (99% purity). This chemical will be obtained through World Health Organization (WHO), Penang Malaysia,
- 2.Deltamethrin [(S)-a cyano-3-phenoxybenzyl (IR)-cis-trans-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropane carboxylate]. This chemical will be obtained from AgrEvo Environmental Health (UK),
- 3.Lambda cyhalothrin:(+)-cyano-3-phenoxybenzyl(+)-cis-trans-3(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate. This chemical will also be obtained from Agr Evo Environmental Health (UK), and
4. some other pyrethroids (depending upon availability)

WORLD HEALTH ORGANIZATION TEST KITS

The World Health Organization Susceptibility Test Assay will be purchased from WHO, Geneva, Switzerland. In order to fulfill the goal, 4 sets of kits will be ordered thru Vector Biology Research Unit, Sains University, Penang, Malaysia.

RESULTS (see attached manuscripts)

1. Factors tested (สรุปแยกตามปัจจัยดูรายละเอียดเพิ่มเติมใน manuscripts ที่แนบมา)

1. Temperature

เปรียบเทียบที่ 27 °C และ 32 °C พฤติกรรมการสนองตอบต่อสารเคมีจะเร็วขึ้นและชุดควบคุมมีการ alert มากขึ้น เมื่อเทียบกับการทดสอบที่อุณหภูมิต่ำกว่า

2. Humidity

ความชื้นที่มากกว่า 75% เหมาะที่สุดในการทดสอบพฤติกรรมการหลีกเลี่ยงต่อสารเคมี ในการศึกษาครั้งนี้จำเป็นต้องศึกษารายละเอียดเพิ่มเติม เนื่องจากมีปัญหาจำนวนยุงที่ใช้ทดสอบ

3. Populations

Laboratory populations

จากการศึกษาพบว่ายุงทุกกลุ่มประชากรแสดงพฤติกรรมหลีกเลี่ยงสารเคมีฆ่าแมลงได้ดี ซึ่งความรุนแรงของการแสดงออกขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของประชากรนั้นๆ

Field populations

จากการศึกษาพบว่ายุงทุกกลุ่มประชากรแสดงพฤติกรรมหลีกเลี่ยงสารเคมีฆ่าแมลงได้ดี

4. Holding period

จากการศึกษานำยุง (ทั้งในพื้นที่และจากห้องทดลอง) มาพักไว้ 0 4 8 12 24 ชั่วโมง พบว่า 4 ชั่วโมง ก่อนการทดลองจะให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด

5. Chemicals

สารเคมีที่ใช้ (ดีดีที และ ไพรีทรอยด์) มีฤทธิ์ในการขับไล่มากกว่าฆ่ายุง ซึ่งความรุนแรงของสารเคมีขึ้นอยู่กับสารเคมีชนิดนั้นๆ ได้ทดสอบ deltamethrin, permethrin, resmethrin, cypermethrin, lambda cyhalothrin, alpha cypermethrin, biometrin DDT

6. Nutritional condition

เปรียบเทียบ unfed sugarfed early bloodfed late bloodfed parous nulliparous พบว่าการนำยุง unfed ที่งดการให้อาหารอย่างน้อย 6 ชั่วโมงจะให้ผลการทดลองที่เสมอต้นเสมอปลายมากที่สุด

7. Age composition

อายุของยุงมีอิทธิพลต่อการสนองตอบต่อสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทดลองทั้งสิ้น พบว่ายุงอายุ 3-5 วัน เหมาะที่จะนำมาใช้ในการศึกษามากที่สุด

8. Time of the test

ได้เปรียบเทียบเวลา 0600-2000 น. พบว่า การทดลองในช่วง 0800-1600 น จะให้ผลไม่แตกต่างกัน

9. Resistant mosquitoes vs. Susceptible mosquitoes

จากการศึกษาไม่พบความแตกต่างการตอบสนองต่อสารเคมีระหว่างยุงที่ต้านทานต่อสารเคมีและไม่ต้านทานต่อสารเคมี

10. Level of Insecticide

พบว่าความเข้มข้นของสารเคมีมีอิทธิพลต่อพฤติกรรมการสนองตอบการหลีกเลี่ยงนี้ ระดับความเข้มข้นมีอิทธิพลต่อการขับไล่ หากมากเกินไปจะได้มีฤทธิ์ในการขับไล่

11. Contact vs. noncontact

พบว่ายุงกันปล่อยได้หลีกเลี่ยงสารเคมีจากทั้ง contact และ noncontact แต่การตอบสนองใน contact test มีมากกว่า ยกเว้น ยุง *Anopheles minimus* species A จากอำเภอแม่สอด

2. Percent mortalities (indicating of resistance) to 3 compounds in field mosquito populations according WHO protocol (1992)

Populations	DDT	Deltamethrin	Lambdacyhalothrin
<i>An. minimus</i> A Tak	0	0	0
<i>An. minimus</i> C Kanchanaburi	0	0	0
<i>An. minimus</i> A Petchaboon	0	0	0
<i>An. dirus</i> Kanchanaburi	0	0	0
<i>An. maculatus</i> Kanchanaburi	0	0	0
<i>An. swadiwongporni</i> Kanchanaburi	0	0	0
<i>Ae. aegypti</i> Bangkok	6	77	67
<i>Ae. aegypti</i> Pathomtani	7	64	60
<i>Ae. aegypti</i> Nontaburi	12	68	54
<i>Ae. aegypti</i> Kanchanaburi	7	65	76

3. Excito repellency test (see attached manuscripts for more details)

Discussion (see attached manuscripts)

ส่วนนี้ได้ discuss ในรายละเอียดไว้ใน manuscript ที่ได้แนบมาด้วยแล้ว

References

- Bondareva NI, Artem'ev MM, Gracheva GV. 1986. Susceptibility and irritability caused by insecticides to malaria mosquitoes in USSR. Part 1. *Anopheles pulcherrimus*. *Med Parazitol Parazit Bolezni* 6: 52-55.
- Chareonviriyaphap T, Roberts DR, Andre RG, Harlan HH, Manguin S, Bangs MJ. 1997. Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*, a malaria vector in the Americas. *J Amer Mosq Control Assoc* 13(2): 171-183.
- Chareonviriyaphap T, Aum-Aong B. 2000. Improved excito-repellency escape chamber for behavioral tests on mosquitoes. *Mekong Malaria Forum* 5: 82-86.
- Evans, R.G. 1993. Laboratory evaluation of the irritancy of bendiocarb, lambda-cyhalothrin, and DDT to *Anopheles gambiae*. *J Am Mosq Control Assoc* 9: 285-293.
- Mantel N, Haenzel W. 1959. Statistic aspects of the analysis of data from retrospective studies of diseases. *J Natl Cancer Inst* 22: 719-748.
- Ree HI, Loong KP. 1989. Irritability of *Anopheles farauti*, *Anopheles maculatus*, and *Culex quinquefasciatus* to permethrin. *Jpn J Sanit Zool* 40: 47-51.
- Roberts DR, Alecrim WD, Tavares AM, Mc. Neil KM. 1984. Influence of physiological condition on the behavioral response of *Anopheles darlingi* to DDT. *Mosq News* 4: 357-361.
- Roberts DR, Andre RG. 1994. Insecticide resistant issues in vectors. *Amer J Trop Med Hyg* 50 (Suppl): 21-34.
- WHO 1970. Insecticide resistance and vector control (17th report of WHO Expert Committee on Insecticides). Instruction for determining the irritability of adult mosquitoes. WHO Technical Rep Ser 433: 158-163.

Output จากโครงการที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. Chareonviriyaphap, T., Parbaripai, A. and S. Sungvornmyothrin. 2002. An improved excito-repellency escape test system. *J. Vector Ecology* 27(2) (250-225).
2. Chareonviriyaphap T, Parbaripai A, Bangs MJ, Aum Aung B 2003. Seasonal abundance and blood feeding activity of *Anopheles minimus* Theobald (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J. Med. Entomol.* 40(6) 876-881.
3. Chareonviriyaphap T, Parbaripai A, Bangs MJ. 2004. Excito-repellency of deltamethrin on the malaria vectors, *Anopheles minimus*, *Anopheles dirus*, *Anopheles swadiwongporni* and *Anopheles maculatus* in Thailand. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* 20(1) 45-54.
4. Kong Mee M, Parbaripai A, Akkratanakul P, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T. 2004. Behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to deltamethrin and possible implications for disease control. *J. Med. Entomol.* 41(6) 1155-1168. (correspondence author)

กำลังดำเนินการ (attached manuscripts)

1. Pothikasikorn J, Chareonviriyaphap T. Differences in behavioral responses to insecticides between two species in *Anopheles minimus* taxon. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* (Preparation: correspondence author)
2. Chareonviriyaphap T. Standardization method for an excito-repellency test system for behavioral tests in mosquito vectors. *J. Vec. Ecol.* (Preparation: correspondence author)

2. การนำผลประโยชน์งานวิจัยไปใช้

1. Platform presentation on excito-repellency at the 2002 American Mosquito Control Association, Arizona 2-6 March 2002 USA.
2. Platform presentation on behavioral responses of malaria vectors by DDT and deltamethrin in Thailand. American Mosquito Control Association, Minnesota 4-10 April 2003 USA.
3. Poster presentation. Effect of nutritional and physiological status of *Aedes aegypti*, on behavioral responses to deltamethrin
4. Lecture to Staff of Malaria Division and Vector Borne Disease Zone (1-6) on "AN IMPROVEMENT ON VECTOR CONTROL-CHEMICAL AND BEHAVIORAL RELATIONSHIP" 6 พฤษภาคม 2545 ภูเก็ต

5. ได้ร่วมมือกับหน่วยงานต่างประเทศในประเทศฟิลิปปินส์ ประเทศอินโดนีเซีย และสหรัฐอเมริกา ทดสอบความเป็นไปได้ของการใช้ excito-repellecy test system กับ ยุงและแมลงพาหะหลายชนิด โดยการทดสอบนี้ได้เน้นที่ความสัมพันธ์ระหว่าง สารเคมีและพฤติกรรม (Chemical/behavioral relationship) ที่ได้ประดิษฐ์ขึ้นที่ ประเทศไทย
6. Lecture to Staff of Malaria Division and Vector Borne Disease Zone (1-6) on "Insecticide Resistance on Malaria and Dengue Vectors" 29 มิถุนายน 2547 โรงแรมเชียงใหม่ภูคำ เชียงใหม่
7. International Workshop on Excito-Repellency Test System for Mosquito Vector in Thailand at Kasetsart University Bangkok Thailand. 20-23 September 2004.

3. ผลงานวิชาการตีพิมพ์ในวารสารในประเทศไทย

1. อัจฉริยา ปรามอริฟาย และ ชีรภาพ เจริญวิริยภาพ 2544. ยุงพาหะนำโรคมาลาเรียและสถานภาพการกินเลือดของยุง ก้นปล่อง *Anopheles minimus* อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี วารสารโรคติดต่อกระทรวงสาธารณสุข 26 (1): 61-67.
1. อัจฉริยา ปรามอริฟาย และคณะ ผลของอุณหภูมิต่อพฤติกรรมการหลีกหนีสารเดลต้าเมทธรินและดีดีทีในยุงก้นปล่องมินิมัส วารสารโรคติดต่อ (submitted)
2. อัจฉริยา ปรามอริฟาย และคณะ พฤติกรรมการหลีกหนีของยุงพาหะนำโรคมาลาเรียมินิมัสต่อสารเดลต้าเมทธริน วารสารกีฏวิทยาและสัตววิทยา (submitted)

ABSTRACT

Although several evidences support the existence of behavioral responses of insecticides by malaria vectors worldwide, no standardized test method has yet been available. This study attempts to standardize the test system using an improved excito-repellency test chamber, as described by Chareonviriyaphap (1999), by defining the relationships between number of escaping and various variables using laboratory colony of Anopheles minimus mosquitoes. Those variables include biological conditions of mosquitoes i.e. nutritional and physiological states of mosquitoes, and environmental factors such as times of test, temperature and humidity against 3 compounds. Results indicated that variables tested influences the test results differently as described herein.

There was statistically significant in escaping when times of test were compared ($P < 0.05$). Test performed in the morning is recommended due to a consistency of test results. Responses to insecticides by young mosquitoes are higher than the old ones. However, there was no statistically different in escape pattern between young and old female mosquitoes. No statistical significance was found in escape pattern under various temperature and humidity tested from all 3 compounds ($P > 0.05$). Obvious responses to DDT and 2 synthetic pyrethroids by mosquitoes were observed when unfed mosquitoes were compared to the others, sugar fed, early blood fed, late blood fed and gravid ($P < 0.05$). We conclude that both biological conditions of mosquitoes and environmental factors effect the test results. Therefore, careful and intentional monitoring should be aware. Details are included herein.

INTRODUCTON

Although behavioral responses of insecticides by malaria vector remains enigma for years, several reports firmly supported the existence of behavioral responses in malaria vectors (Spark et al. 1989). In the past, behavioral responses have been normally overlooked in national malaria control programs, with focusing exclusively on biochemical (toxicological) responses to insecticides. Today, the development of insecticide resistance in insect pests and disease vectors occurs in some countries, but it has been very limited in many areas in spite of an extensive use of chemicals to control insect pests and disease vectors (Roberts and Andre, 1994; Chareonviriyaphap et al. 1997). This phenomena suggests that behavioral avoidance could be a critical aspect in effective reduction of human-vector contact than toxicology (Roberts et al. pers comm).

Assays for evaluating behavioral responses of insecticides by malaria vectors have been progressively reviewed (Roberts et al. 1997 and Rutledge et al. 1999). Most tests in the past were done using modified WHO excito-repellency test box (Bondareva et al., 1986, Ree & Loong, 1989, Pell et al., 1989, Quinones & Suarez, 1989 and Rutledge et al., 1999) and do not discriminate between contact and noncontact conditions. All tests rely exclusively on the concept of the responses of malaria vectors to insecticides only after physical contact with the chemical insecticides and this concept is prejudicial and unrealistic (Roberts et al. 1997). Furthermore, a qualified and accepted method for behavioral responses by malaria vectors has never been available.

Method of excito-repellency study including testing, analyzing and interpreting was not totally accepted (Roberts et al. 1984, Evan 1993 and Chareonviriyaphap et al. 1997), compounding difficulty of analyzing and interpreting test data. Recently, Roberts et al. (1997) proposed a valuable test system to discriminate between contact irritancy and noncantact repellency and used a survival analysis approach to estimate mosquito escape rate from chamber. The test system was used by Chareonviriyaphap et al. (1997) and, subsequently by Bangs et al. (submitted). Unfortunately, this test system was cumbersome, and required much time to attach the test papers, especially in the field condition. Chareonviriyaphap et al. (1999) developed an improved collapsible, metal excito-repellency test chamber for behavioral tests on mosquitoes. But, little is

known about standardizing the test chamber system against various parameters that might influence the test results.

The objective of this study is to standardize the test system for quantifying the behavioral responses of malaria vectors to insecticides. This is conducted by defining the series of the relationships between numbers escaping from test chamber and variations in some different environmental factors such as temperature, humidity and physiological and nutritional states of mosquitoes against those variables under laboratory-controlled conditions. The results are the subject of this report.

MATERIALS AND METHODS

Anopheles minimus test populations:

Mosquito colony. This colony has been maintained in the laboratory for at least 5 years. It was originally collected from human biting collection in Prachinburi Province, north of Thailand in 1993. Subsequently, it was maintained in laboratory-controlled conditions at the Malaria Division, Department of Communicable Disease Control (CDC), Ministry of Public Health, Nontaburi 11000 THAILAND. The colony was received from CDC and was raised in the insectary at the Division of Biology, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaengsean Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand in 1998. This colony was completely susceptible to DDT, deltamethrin and lambda-cyhalothrin.

Mosquito rearing:

Anopheles minimus colony was reared following the method of Chareonviriyaphap et al. (1997), with only minor modification. All life stages were maintained under the insectary controlled condition ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$ and $80\pm 10\%$ relative humidity) at the Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaengsean Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand. Adults were provided cotton pads soaked with 10% sugar solution from the day of emergence and adults were maintained in the 12x12x12-in. screened cage. Female mosquitoes were permitted to have a human blood meal on the fourth day post-emergence. Two days post blood feeding, oviposition dishes were placed in the cage with the gravid females.

Insecticide papers.

Test papers ($27.5 \times 35.5 \text{ cm}^2$) were impregnated, based on WHO diagnostic doses, with 0.025% deltamethrin and 0.1% lambda-cyhalothrin. In the case of DDT, field rate at 2 g/m^2 DDT was used. DDT and deltamethrin impregnated papers were supported by Division of Tropical Public Health, Department of Preventive Medicine and Biometrics, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland and those received were prepared according to World Health Organization (WHO) specification. 0.1% Lambda-cyhalothrin papers were purchased from WHO, Vector

Control Unit, Penang, Malaysia. All papers were treated at the rate of 2.75 ml of the insecticide solution per 180 cm².

Test Parameters

1. Physiological age : 3-5 days-old female mosquitoes vs. 7-10 days-old female mosquitoes
2. Times of test : (0500-0730, 0830-1100, 1300-1630 and 1800-2030)
3. Insecticides : 2 g/m² DDT, 0.1% deltamethrin, 0.05% lambda-cyhalothrin
4. Nutritional stages : Unfed, sugar fed, early blood fed, late blood fed and gravid
5. Temperature : 20-24°C, 25-29°C and 30-36°C
6. Humidity : 40-60%, 61-80%, and >80%

Behavioral tests:

The test system used in this study was collapsible as described by Chareonviriyaphap and Ratanstham, (1999). A full test required 4 chambers, a pair of treatment chamber and a pair of control chamber. Tests were performed as described in the recent publication of Chareonviriyaphap et al. (1997) with some modifications.

Data analysis

Survival analysis method was used for excito-repellency data as a method of choice (Chareonviriyaphap et al. 1997). With this method, we can minimize the loss of useful information and are able to estimate the mosquito escape rate at 1-min interval. The log-rank method was used to compare pattern of escape behavior (Mantel and Haenzel 1959). The methods of analyzing excito-repellency data has been recently described by Roberts et al. (1997).

RESULTS

The excito-repellency test system was standardized by defining the series of the relationships between numbers escaping from test chamber and variations in an ambient temperature, relative humidity and nutritional and physiological states of mosquitoes under laboratory controlled-condition against 3 currently used insecticides in national malaria control program in Thailand, namely DDT, deltamethrin and lambda-cyhalothrin (Tables 1-6 and Figures 1-8).

This finding indicated that escape patterns of Anopheles minimus from the contact trial to all 3 chemical insecticides was considerably higher than those from the control and noncontact, regardless of physiological and nutritional conditions of the test populations. Significant differences in escape patterns were found, in all cases, when noncontact trial was compared to the controls. We also found that high number of gravid females escaped from the control chambers for all 3 compounds. In addition, higher number of mosquitoes took off from the controls when the test was performed in the late evening. There is no statistically significant in extremes temperature and humidity. Low mortality of escape mosquitoes was observed, in all cases, as indicated in Tables 1-6. In brief, nutritional conditions of mosquitoes and some environmental factors, to a certain extent, affect mosquito responses to insecticides tested.

Table 1 showed mortalities of 2 test populations, 3-5 days-old and 7-10 days-old test populations, after a 24-h holding period from contact and noncontact trials. In contact trial, percent mortality of escape and nonescape specimens from 2 test populations was very low (<10%) from all 3 compounds. High percent mortality was found in nonescape specimens of 7-10 days-old test specimens when tested against lambdacyhalothrin (100%) and deltamethrin (55%). Deltamethrin (>90%) produced more number of escaping from 2 test populations, followed by Lambdacyhalothrin (>80%) and DDT (72%). In contrast, low number of specimens escaped from the controls for all 3 compounds. In noncontact trial, percent mortality of escape and nonescape of 2 test populations was also low (<9% for the escape and <3% for nonescape) (Table 1). Higher number of take off mosquitoes was observed in the chamber treated with lambda-cyhalothrin (45% for 7-10 days-old mosquitoes and 26% for 3-5 days-old mosquitoes), followed by deltamethrin (39% for 7-10 days-old mosquitoes and 24% for 3-5 days-old

mosquitoes) and DDT (21% for 7-10 days-old mosquitoes and 23% for 3-5 days-old mosquitoes). Low percent mortalities were found in all the control trials of 2 test populations.

Mortalities of unfed females, at 4 different times of test, after a 24-h holding period from contact and noncontact trials are given in Table 2. Again, with all 3 compounds, low percent mortalities (<10%) of escape and nonescape mosquitoes from contact, noncontact and 2 controls were observed, except nonescape specimens from contact trial with deltamethrin (100%) of population tested in the afternoon (1300-1530) and lambdacyhalothrin (46.7%) of population tested in the morning (0800-1130). Lambda-cyhalothrin and deltamethrin produce higher number of escaping than DDT does in all cases. Perfect escape (100%) from the chamber was observed in contact trial with lambdacyhalothrin in the afternoon test (1300-1530 pm). Interestingly, in contact trial, higher escape specimens were observed in the control in the morning test, 0800-1130 am, compared with those in the afternoon, 1300-1530, of all 3 compounds. Due to shortage of mosquito specimens, no test was performed during 0500-0730 am and 1800-2000 pm.

Mortalities of unfed females, performed at different temperature, after a 24-h holding period from contact and noncontact trials are given in Table 3. Overall mortalities were very low as seen in contact, noncontact and control of escape and nonescape mosquitoes. In contact trial, lambdacyhalothrin produced higher escape specimens almost 100% when temperature is between 25-36 °C. However, mortalities after 24-h holding period were higher in the tests conducted at higher temperature. In contact trial, higher number of mosquitoes takes off, in all cases, in the chambers treated with deltamethrin and lambdacyhalothrin than those with DDT.

Mortalities of unfed females, performed at different humidity, after a 24-h holding period from contact and noncontact trials are given in Table 4. In contact trial, low mortality was seen in contact, noncontact and 2 controls of escape and nonescape mosquitoes. However, mortalities after 24-h post-treatment were higher in the tests conducted at extremely low humidity. Number of escape mosquitoes is more likely to be related to percent humidity for all 3 compounds. In the case of DDT, 64%, 87% and 75% escaped from the chamber tested at 40-60%, 61-80% and >80%, respectively. For

Lambdacyhalothrin, 100% of mosquitoes escaped from the chamber when tested at 80% relative humidity. In noncontact trial, percent mortalities from escape, nonescape and control trials were also low as indicated in Table 4. Higher mortalities of escaped and nonescaped mosquitoes were observed in the tests conducted at lower percent humidity.

Tables 6 and 7 disclosed the escape pattern in different nutritional states of female *An. minimus* in contact and noncontact trials. In contact trial with DDT, low percent mortality was observed in escape and nonescape specimens. With deltamethrin in contact trial, percent mortality of nonescape unfed and late blood fed were 33.6 and 18.2%. With lambda-cyhalothrin, comparatively high percent mortality was found in unfed (87.5%), sugarfed (25.8%), early blood fed (90%), late blood fed (48.3%) and gravid (61.5%) of nonescape mosquito tested. In noncontact trial with all 3 compounds, percent mortality was very low in escape and nonescape mosquitoes at different nutritional states.

Multiple comparisons of escape patterns of each variable tested in contact, noncontact and control trials against 3 compounds are given in Tables 7 and 8. The patterns of escape responses were tested with the log rank method and significance was determined by the 0.05 level of probability. In contact trial with DDT, deltamethrin and lambdacyhalothrin, significant differences in escape patterns were found 1) when unfed compared to the other nutritional status 2) when test population conducted at 1800-2030 pm was compared with the other test times ($P>0.05$). In noncontact trial with DDT, deltamethrin and lambdacyhalothrin, mark differences in escape patterns were found when unfed was compared with the other nutritional states and 2) when test population conducted at 1800-2030 pm was compared with the others ($P>0.05$).

Figures 1-8 demonstrate the proportions of mosquitoes remaining in the exposure chambers under different physiological and nutritional states of mosquitoes including environmental factors such as temperature, humidity and times of test. These proportions are used to develop patterns of escape rates and are indicative of escape probabilities between contact and noncontact (Fig 1), contact and control (Figs 2-7), and noncontact and control trials (Fig 8) with laboratory colonized *An. minimus* population.

There were significant differences in escape patterns for all 3 compounds when contact trials were compared with control and noncontact trials ($P < 0.05$). In contact trial, escape rate was higher in lambda-cyhalothrin compared with DDT and deltamethrin (not illustrated) as seen in Figure 1 ($P < 0.05$). With all 3 compounds, escape rates of younger test populations in contact and noncontact trials was higher than those from the older test populations as shown in Figure 2 (deltamethrin was not illustrated) ($P < 0.05$). No significant differences were found in escape patterns when young and old populations were compared ($P > 0.05$). Rapid escape responses in contact and noncontact (not illustrated) trials were observed with those conducted in the afternoon (1300-1530) and morning (0800-1130) tests compared with early morning (0500-0730) and late evening (1800-2030) (Figure 3). Significant differences were seen when the afternoon test (1300-1500) was compared to the others. Higher number of female mosquitoes escaped from the control chambers, of all cases, when tests were performed in the late evening, especially 0700 pm. More escape responses in contact trial were observed in female mosquitoes tested at higher temperature compared with the lower temperature (Figure 4). With deltamethrin, similar escape patterns in temperature differences were seen (not illustrated). However, no significant differences were found in all 3 compounds ($P < 0.05$). The patterns of escaping females from contact and control trials under different humidity were similar to those of temperature (Figure 5). Dramatic escape responses of female mosquitoes in contact trials were observed in gravid females compared with the other nutritional states for lambda-cyhalothrin (Figure 6). Similar escape patterns were seen in both DDT and deltamethrin (not illustrated). Responses of sugar-fed female mosquitoes in both contact and noncontact trials for 3 compounds were comparatively low. Significant contact irritancy was seen when gravid females were compared to all the other nutritional states for all 3 compounds ($P < 0.05$). Significance in the escape patterns of female mosquitoes to DDT, deltamethrin and lambda-cyhalothrin in noncontact trials was observed when compared to the controls ($P < 0.05$) (Figure 7).

DISCUSSION

ON THE PROCESS

ACKNOWLEDGEMENT

Authors would like to thank Malaria Division, Communicable Disease Control (CDC), Ministry of Public Health for providing the Anopheles minimus mosquito colony. We also Ms.Atchareeya Praparipay of Division of Biostatistics, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaengsean Campus, Nakhon Pathom, Thailand for her assistance in data analysis. We would like to thank Dr.Roberts of the Uniformed Services University (USUHS) for providing papers impregnated with DDT and Deltamethrin. This project was funded in full by Thai Research Fund (TRF).

REFERENCES CITED (Related work for discussion)

- Bondareva, N.L., Artem'ev, M.M. & Gracheva, G.V. 1986. Susceptibility and irritability caused by insecticides to malaria mosquitoes in the USSR. Part 1. Anopheles pulcherrimus. Medit. Parazitol. Parazit. Bolezni 6: 52-55.
- Chareonviriyaphap, T., Roberts, D.R., Andre, R.G., Harlan, H. and Bangs, M.J. 1997. Pesticide avoidance behavior in Anopheles albimanus Wiedemann. Amer. J. Mosq. Con. Assoc. 13 (2).
- Chareonviriyaphap, T. and Rattanatham, S. 1999. An improved excito-repellency escape chamber for behavioral test in mosquitoes. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.
- Evan, R.G. 1993. Laboratory evaluation of the irritancy of bendiocarb, lambda-cyhalothrin, and DDT to Anopheles gambiae. J. Am. Mosq. Control Assoc. 9: 285-293.
- Pell, J.K., Spinney, M.A., & Ward, K.J. 1989. Observations on the behavior of adult Anopheles gambiae encountering residual deposits of lambda-cyhalothrin compared with the other major classes. Fourth Annu. Conf. Soc. Vector Eco. Eur. Region 18 pp.
- Quinones, M.L. & Suarez, M.F. 1989. Irritability to DDT of natural populations of the primary malaria vectors in Colombia. J. Am. Mosq. Control Assoc. 5: 56-59.
- Ree, H.I. & Loong, K.P. 1989. Irritability of Anopheles farauti, Anopheles maculatus, and Culex quinquefasciatus to permethrin. Jap. J. Sanit. Zool. 40: 47-51.
- Roberts, D.R., Chareonviriyaphap, T., Harlan, H. H. and P. Hshieh. 1997. Methods for testing and analyzing excito-repellency responses of malaria vectors to insecticides. Amer. J. Mosq. Con. Assoc. 13 (1) 13-17.
- Roberts, D.R., Alecrim, W.D., Tavares, A.M. & Mc Neill, K.M. 1984. Influence of physiological condition on the behavioral response of Anopheles darlingi to DDT. Mosq. News 4: 357-361.
- Roberts, D.R. and Andre, R.G. 1994. Insecticide resistance issues in vectors. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50 (Suppl.): 21-34.

Rutledge, L.C., Echara, N.M. and Gupta, R.K. 1999. Responses of male and female mosquitoes to repellents in the World Health Organization insecticide irritability test system. J. Amer. Mos. Control. Assoc. 15(1): 60-64.

Spark et al. 1989.

TABLES and FIGURES

Table 1. Mortalities of unfed Anopheles minimus females after a 24-h holding period following exposures in contact and control trials of excito-repellency tests.

Table 2. Mortalities of 3-5 unfed Anopheles minimus females at different test times after a 24-h holding period following exposures in contact and noncontact trials of excito-repellency tests.

Table 3. Mortalities of 3-5 days-old unfed Anopheles minimus females tested at different temperature after a 24-h holding period following exposures in contact and noncontact trials of excito-repellency tests.

Table 4. Mortalities of 3-5 days-old unfed Anopheles minimus females tested at different humidity after a 24-h holding period following exposures in contact and noncontact trials of excito-repellency tests.

Table 5. Mortalities of unfed, sugar fed, early blood fed, late blood fed and gravid Anopheles minimus females after a 24-h holding period following exposures in contact trials of excito-repellency tests.

Table 6. Mortalities of unfed, sugar fed, early blood fed, late blood fed and gravid Anopheles minimus females after a 24-h holding period following exposures in noncontact trials of excito-repellency tests.

Table 7. Comparison of escape patterns (in excito-repellency test) of different nutritional stages, ages, times of test, temperatures and humidity by insecticides for laboratory Anopheles minimus colony in contact trials

Table 8. Comparison of escape patterns (in excito-repellency test) of different nutritional stages, ages, times of test, temperatures and humidity by insecticides for laboratory Anopheles minimus colony in noncontact trials

Figure 1. Proportions of 3-5 days-old unfed female Anopheles minimus in exposure chambers in contact and noncontact trials with 2 g/m² DDT and 0.1% lambdacyhalothrin

Figure 2. Proportions of 3-5 days-old (Y) and 7-10 days-old (O) unfed female Anopheles minimus in exposure chambers in contact and control trials with 2 g/m² DDT and 0.1% lambdacyhalothrin

Figure 3. Proportions of 3-5 days-old unfed female *Anopheles minimus* in exposure chambers in contact and control trials with 2 g/m² DDT and 0.1%lambda cyhalothrin [tests were performed at 0500-0730 (E), 0800-1130 (D), 1300-1530 (P) and 1800-2030 (A)]

Figure 4. Proportions of 3-5 days-old unfed female *Anopheles minimus* in exposure chambers in contact and control trials with 2 g/m² DDT and 0.1%lambda cyhalothrin at different temperature [(tests were performed at 20-24°C (L), 25-29°C (M) and 30-36°C(H)]

Figure 5. Proportions of 3-5 days-old unfed female *Anopheles minimus* in exposure chambers in contact and control trials with 2 g/m² DDT and 0.1%lambda cyhalothrin at different humidity [(tests were performed at 40-60%(L), 61-80% (M) and >80%(H)]

Figure 6. Proportions of unfed, sugar fed (SF), early blood fed (EBD), late blood fed (LBD) and gravid (G) female *Anopheles minimus* in exposure chambers in contact and control trials with 0.1%lambda cyhalothrin

Figure 7. Proportions of 3-5 days-old unfed female *Anopheles minimus* in exposure chambers in noncontact and control trials with 2 g/m² DDT, 0.025%delatamethrin and 0.1%lambda cyhalothrin

Standardization test system behavioral study malaria vectors

RESULTS (เพิ่มเติม)

TABLE 1

Insecticides	3-5 Days-old mosquitoes				7-10 Days-old mosquitoes			
	Number		%Mortality		Number		%Mortality	
	Tested	Escaped	Escaped	Not escaped	Tested	Escaped	Escaped	Not escaped
CONTACT								
DDT	100	72	5.5	7.1	100	72	4.2	7.2
DDT-C	100	16	0	1.2	100	5	0	2
Del	100	90	0	10	100	96	2	100
Del-C	100	6	0	1.06	100	14	0	0
Lam	100	86	9.3	7.1	100	80	1.2	55
Lam-C	100	24	4.1	0	100	9	0	0
NONCONTACT								
DDT	100	23	0	2.5	100	21	4.7	0
DDT-C	100	12	0	0	100	10	0	1.1
Del	100	24	4.1	0	100	39	2.6	3.2
Del-C	100	6	0	1.1	100	13	0	0
Lam	100	26	0	2.7	100	45	2.2	0
Lam-C	100	12	8.3	0	100	13	0	0

DDT: 2 g/m² DDT,

Del: 0.025% Deltamethrin

Lam: 0.1% Lambda cyhalothrin

C: Control

TABLE 2

Trial	Test-time	Insecticides	Number		%Mortality	
			Tested	Escaped	Escaped	Not escape
CONTACT						
	0500-0730	DDT	100	-	-	-
		DDT-C	100	-	-	-
		Del	25	22	0	2.5
		Del-C	25	7	0	0
		Lam	100	-	-	-
		Lam-C	100	-	-	-
	0800-1130	DDT	100	71	5.6	6.8
		DDT-C	100	22	0	1.3
		Del	100	90	0	20
		Del-C	100	5	0	1.02
		Lam	100	85	9.4	46.7
		Lam-C	100	23	4.3	0
	1300-1530	DDT	100	78	5.1	4.5
		DDT-C	100	10	0	0
		Del	100	98	1	100
		Del-C	100	7	0	0
		Lam	100	100	0	0
		Lam-C	100	19	0	0
	1800-2030	DDT	50	46	0	0
		DDT-C	50	4	0	0
		Del	50	48	0	0
		Del-C	50	7	0	0
		Lam	100	-	-	-
		Lam-C	100	-	-	-
NONCONTACT						
	0500-0730	DDT	100	-	-	-
		DDT-C	100	-	-	-
		Del	25	13	0	0
		Del-C	25	11	0	0
		Lam	100	-	-	-
		Lam-C	100	-	-	-
	0800-1130	DDT	100	20	5	1.2
		DDT-C	100	15	0	0
		Del	100	23	0	0
		Del-C	100	4	0	0
		Lam	100	18	0	0
		Lam-C	100	4	0	0
	1300-1530	DDT	100	27	0	1.3
		DDT-C	100	14	0	0
		Del	100	14	0	0
		Del-C	100	6	0	0
		Lam	100	27	0	0
		Lam-C	100	10	0	0
	1800-2030	DDT	50	16	0	0
		DDT-C	50	13	0	0.22
		Del	50	14	0	0
		Del-C	50	7	0	0
		Lam	100	-	-	-
		Lam-C	100	-	-	-

DDT: 2 g/m² DDT, Del:0.025% Deltamethrin, Lam 0.1% Lambda-cyhalothrin, C: Control, (- non applicable)

TABLE 3

Trial	Temperature	Insecticides	Number		%Mortality	
			Tested	Escaped	Escaped	Not escape
CONTACT						
	20-24°C	DDT	100	74	2.7	3.5
		DDT-C	100	7	0	1.1
		Del	100	92	4.3	3.7
		Del-C	100	6	0	1.1
		Lam	100	90	5.5	7.2
		Lam-C	100	14	7.1	4.6
	25-29°C	DDT	100	84	5.9	6.2
		DDT-C	100	15	0	1.2
		Del	100	97	0	33.5
		Del-C	100	9	0	1.1
		Lam	100	99	9.1	0
		Lam-C	100	17	5.8	2
	30-36°C	DDT	100	87	5.7	7.6
		DDT-C	100	5	0	1.1
		Del	100	80	0	100
		Del-C	100	10	0	1.1
		Lam	100	32	0	1.1
		Lam-C	100	16	0	1.1
NONCONTACT						
	20-24°C	DDT	100	16	6.2	0
		DDT-C	100	5	0	0
		Del	100	15	6.6	0
		Del-C	100	6	16.1	4.2
		Lam	100	34	12.5	25.7
		Lam-C	100	20	0	0
	25-29°C	DDT	100	21	4.7	1.2
		DDT-C	100	11	0	0
		Del	100	28	0	0
		Del-C	100	5	2	0
		Lam	100	30	0	0
		Lam-C	100	8	0	1.1
	30-36°C	DDT	100	38	0	3.2
		DDT-C	100	6	0	0
		Del	100	27	3.7	0
		Del-C	100	13	0	0
		Lam	100	27	0	0
		Lam-C	100	3	0	0

DDT: 2 g/m² DDT, Del : 0.025% Deltamethrin, Lam : 0.1% Lambda cyhalothrin, C : Control

TABLE 4

Trial	Humidity	Insecticides	Number		%Mortality	
			Tested	Escaped	Escaped	Not escape
CONTACT						
	40-60%	DDT	100	64	12.5	35.9
		DDT-C	100	12	8.3	0
		Del	100	84	5.9	6.2
		Del-C	100	11	9.1	1.1
		Lam	100	97	0	0
		Lam-C	100	10	0	0
	61-80%	DDT	100	87	5.7	7.6
		DDT-C	100	12	0	1.1
		Del	100	92	0	6.7
		Del-C	100	11	0	1.12
		Lam	100	97	0	33
		Lam-C	100	22	4.5	0
	>80%	DDT	100	75	5.3	6
		DDT-C	100	18	5.5	0
		Del	100	93	0.82	100
		Del-C	100	18	0	0
		Lam	100	100	0	0
		Lam-C	100	14	0	0
NONCONTACT						
	40-60%	DDT	100	14	0	0
		DDT-C	100	11	9.1	0
		Del	100	17	5.8	0
		Del-C	100	6	0	0
		Lam	100	16	6.2	0
		Lam-C	100	7	0	2.1
	61-80%	DDT	100	21	4.7	1.2
		DDT-C	100	14	0	0
		Del	100	32	0	0
		Del-C	100	6	0	0
		Lam	100	32	0	0
		Lam-C	100	10	0	0
	>80%	DDT	100	24	0	2.6
		DDT-C	100	14	0	0
		Del	100	27	3.7	0
		Del-C	100	14	0	0
		Lam	100	30	0	0
		Lam-C	100	24	0	0

DDT: 2 g/m² DDT, Del : 0.025% Deltamethrin, Lam : 0.1% Lambda cyhalothrin, C : Control

TABLE 5

Chemicals	Mosquitoes	Number		%Mortality	
		Tested	Escaped	Escaped	Not escaped
DDT	Unfed	100	71	4.2 (3/71)	6.8(2/29)
DDT-C	Unfed	100	16	0(0/16)	1.2(1/84)
DDT	Sugar fed	100	55	0(0/55)	4.4(2/45)
DDT-C	Sugar fed	100	7	0(0/7)	0(0/93)
DDT	Early blood fed	100	54	(1/54)	6.6(3/45)
DDT-C	Early blood fed	100	11	0(0/11)	0(0/89)
DDT	Late blood fed	100	65	1.5(1/65)	5.7(2/35)
DDT-C	Late blood fed	100	4	0(0/4)	0(0/96)
DDT	Gravid	50	31	22(7/31)	0
DDT-C	Gravid	50	20	15(3/20)	0
Del	Unfed	100	94	4.2(4/94)	33.3(2/6)
Del-C	Unfed	100	8	0(0/8)	1.1(1/92)
Del	Sugar fed	100	67	1.5(1/67)	0(0/33)
Del-C	Sugar fed	100	0	0(0)	0(0/100)
Del	Early blood fed	100	75	5.3(4/75)	8(2/25)
Del-C	Early blood fed	100	7	14.2(1/7)	1.1(1/93)
Del	Late blood fed	100	78	2.6(2/78)	18.2(4/22)
Del-C	Late blood fed	100	5	0(0/5)	1.1(1/95)
Del	Gravid	50	43	16.2(7/43)	0
Del-C	Gravid	50	19	21(4/19)	10(2/19)
Lam	Unfed	100	92	7.6(7/92)	87.5(7/8)
Lam-C	Unfed	100	20	5(1/20)	0(0/80)
Lam	Sugar fed	100	65	4.6(3/65)	25.8(9/35)
Lam-C	Sugar fed	100	10	0(0/10)	1.1(1/90)
Lam	Early blood fed	100	80	11.3(9/80)	90(18/20)
Lam-C	Early blood fed	100	12	0(0/12)	4.5(4/88)
Lam	Late blood fed	100	69	18.8(13/69)	48.3(15/31)
Lam-C	Late blood fed	100	6	16.7(1/6)	6.4(6/94)
Lam	Gravid	100	87	6.8(6/87)	61.5(8/13)
Lam-C	Gravid	100	37	0(0/37)	3.1(2/63)

DDT: 2 g/m² DDT, Del:0.025% Deltamethrin, Lam:0.1% Lambda cyhalothrin, C: Control

TABLE 6

Chemical	Mosquitoes	Number		%Mortality	
		Tested	Escaped	Escaped	Not escaped
DDT	Unfed	100	24	0(0/24)	2.6(2/76)
DDT-C	Unfed	100	15	6.6(1/15)	1.2(1/85)
DDT	Sugar fed	100	8	0(0/8)	1.1(1/92)
DDT-C	Sugar fed	100	6	0(0/6)	0(0/94)
DDT	Early blood fed	100	21	9.6(2/21)	0(0/79)
DDT-C	Early blood fed	100	12	0(0/12)	0(0/88)
DDT	Late blood fed	100	18	0(0/18)	0(0/82)
DDT-C	Late blood fed	100	5	0(0/5)	0(0/95)
DDT	Gravid	50	32	25(8/32)	16.6(3/18)
DDT-C	Gravid	50	22	4.5(1/22)	14.2(4/28)
Del	Unfed	100	20	5(1/20)	1.3(1/80)
Del-C	Unfed	100	6	0(0/6)	1.1(1/94)
Del	Sugar fed	100	7	0(0/7)	0(0/93)
Del-C	Sugar fed	100	5	0(0/5)	0(0/95)
Del	Early blood fed	100	11	18.2(2/11)	1.1(1/89)
Del-C	Early blood fed	100	5	0(0/5)	2.1(2/95)
Del	Late blood fed	100	15	0(0/15)	1.2(1/85)
Del-C	Late blood fed	100	3	0(0/3)	2.1(2/97)
Del	Gravid	50	19	25(2/8)	0
Del-C	Gravid	50	25	16(4/25)	0
Lam	Unfed	100	24	4.2(1/24)	0(0/76)
Lam	Unfed	100	8	0(0/8)	1.1(1/92)
Lam	Sugar fed	100	1	0(0/1)	1(1/99)
Lam-C	Sugar fed	100	1	0(0/1)	4(4/99)
Lam	Early blood fed	100	22	4.5(1/22)	1.3(1/78)
Lam-C	Early blood fed	100	11	9.1(1/11)	4.5(4/89)
Lam	Late blood fed	100	15	13.3(2/15)	3.5(3/85)
Lam-C	Late blood fed	100	4	0(0/4)	2.1(2/94)
Lam	Gravid	100	66	0(0/66)	5.8(2/34)
Lam-C	Gravid	100	26	0(0/26)	1.3(1/74)

DDT: 2 g/m² DDT, Del: 0.025% Deltamethrin, Lam: 0.1% Lambda-cyhalothrin, C: Control

TABLE 7

Insecticide	Nutritional stage	Times of test	Temperature	Humidity	Age
2 g/m ² DDT	UF vs. SF*	E vs. D	L vs. M*	1 vs. 2	Y vs. O
	UF vs. EBF*	E vs. P	L vs. H*	1 vs. 3	
	UF vs. LBF*	E vs. A*	M vs. H	2 vs. 3	
	UF vs. G*	P vs. A*			
	SF vs. EBF	D vs. P			
	SF vs. LBF	D vs. A*			
	SF vs. G				
	EBF vs. LBF				
	EBF vs. G				
	LBF vs. G				
0.025% Deltamethrin	UF vs. SF*	E vs. D	L vs. M*	1 vs. 2	Y vs. O
	UF vs. EBF*	E vs. P	L vs. H*	1 vs. 3	
	UF vs. LBF*	E vs. A*	M vs. H	2 vs. 3	
	UF vs. G*	P vs. A*			
	SF vs. EBF	D vs. P			
	SF vs. LBF	D vs. A*			
	SF vs. G				
	EBF vs. LBF				
	EBF vs. G				
	LBF vs. G				
0.1 Lambda cyhalothrin	UF vs. SF*	E vs. D	L vs. M*	1 vs. 2	Y vs. O
	UF vs. EBF*	E vs. P	L vs. H*	1 vs. 3	
	UF vs. LBF*	E vs. A*	M vs. H	2 vs. 3	
	UF vs. G*	P vs. A*			
	SF vs. EBF	D vs. P			
	SF vs. LBF	D vs. A*			
	SF vs. G				
	EBF vs. LBF				
	EBF vs. G				
	LBF vs. G				

UF: UNFED, SF: SUGAR FED, EBF: EARLY BLOOD FED, LBF: LATE BLOOD FED, G: GRAVID

E: 0500-0730AM, D: 0800-1130AM, P: 1300-1530PM, A: 1800-2030PM L: 20-24°C, H: 25-29°C, M: 30-36°C

1: 40-60%, 2: 61-80%, 3: >80% Y: 3-5 DAYS-OLD, O: 7-10 DAYS-OLD

The * identifies results of log-rank tests with statistically significant (0.05 level of probability) differences in patterns of escape behavior between biological and environmental factors.

TABLE 8

<i>Insecticide</i>	<i>Nutritional stage</i>	<i>Times of test</i>	<i>Temperature</i>	<i>Humidity</i>	<i>Age</i>
2 g/m ² DDT	UF vs. SF	E vs. D	L vs. M*	1 vs. 2	Y vs. O
	UF vs. EBF	E vs. P	L vs. H*	1 vs. 3	
	UF vs. LBF	E vs. A*	M vs. H	2 vs. 3	
	UF vs. G	P vs. A*			
	SF vs. EBF	D vs. P			
	SF vs. LBF	D vs. A*			
	SF vs. G				
	EBF vs. LBF				
	EBF vs. G				
	LBF vs. G				
0.025%Deltamethrin	UF vs. SF*	E vs. D	L vs. M*	1 vs. 2	Y vs. O
	UF vs. EBF*	E vs. P	L vs. H*	1 vs. 3	
	UF vs. LBF*	E vs. A*	M vs. H	2 vs. 3	
	UF vs. G*	P vs. A*			
	SF vs. EBF	D vs. P			
	SF vs. LBF	D vs. A*			
	SF vs. G				
	EBF vs. LBF				
	EBF vs. G				
	LBF vs. G				
0.1Lambdacyhalothrin	UF vs. SF*	E vs. D	L vs. M*	1 vs. 2	Y vs. O
	UF vs. EBF*	E vs. P	L vs. H*	1 vs. 3	
	UF vs. LBF*	E vs. A*	M vs. H	2 vs. 3	
	UF vs. G*	P vs. A*			
	SF vs. EBF	D vs. P			
	SF vs. LBF	D vs. A*			
	SF vs. G				
	EBF vs. LBF				
	EBF vs. G				
	LBF vs. G				

UF: UNFED, SF: SUGAR FED, EBF: EARLY BLOOD FED, LBF: LATE BLOOD FED, G: GRAVID

E: 0500-0730AM, D: 0800-1130AM, P: 1300-1530PM, A: 1800-2030PM L: 20-24°C, H: 25-29°C, M: 30-36°C

1:40-60%, 2:61-80%, 3: >80% Y: 3-5 DAYS-OLD, O: 7-10 DAYS-OLD

The * identifies results of log-rank tests with statistically significant (0.05 level of probability) differences in patterns of escape behavior between biological and environmental factors.

Correspondence proof
Theeraphap Chareonviriyaphap, Ph.D.
Division of Biology
Faculty of Liberal Arts and Science,
Kasetsart University
Kamphaengsaen campus,
Nakhon Pathom 73140 THAILAND
Tel 66-34-351895 ext 458
Fax 66-34-351894
E-mail faasthc@nontri.ku.ac.th

Am Journal of Tropical Medicine and Hygiene

BEHAVIORAL RESPONSES TO DDT AND PYRETHROIDS BY TWO
SUBSPECIES OF *ANOPHELES MINIMUS* COMPLEX (DIPTERA: CULICIDAE),
A MALARIA VECTOR IN THAILAND

JINNAPA POTIKASIKORN¹, THEERAPHAP CHAREONVIRIYAPHAP²

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400 Thailand

² Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900
Thailand

ABSTRACT. The study was designed to compare the behavioral responses between two field populations in *Anopheles minimus* species A and C to 2 g/m² of DDT, 0.02g/m² of deltamethrin, and 0.03 g/m² of lambdacyhalothrin using an improved excito-repellency escape chamber. The first population was collected from Tum Suee County, Mae Sot District, Tak Province and the second was from Pu Teuy County, Tri Yok District, Kanchanaburi Province, west Thailand. Results showed that females of both test populations rapidly escaped from direct contact with DDT, deltamethrin, and lambdacyhalothrin. Repellency function of DDT and 2 pyrethroids was significantly pronounced when tested exclusively against *An. minimus* species A. No strong repellency action was observed on *An. minimus* species C. We conclude that non-contact response plays a significant role in escape responses of *An. minimus* A whereas contact irritant action is limited to *An. minimus* C. Both contact irritancy and non-contact repellency are involved in *An. minimus* escape responses.

Key Words: Avoidance Behavior Excito-repellency Malaria Vector

INTRODUCTION

Anopheles minimus Theobald is one of the most efficient malaria vectors throughout the Oriental Region (Reid 1968 and Rao 1984). In Thailand, *An. minimus* is considered to be the primary vectors of malaria (Ayurakit-Kosol and Griffith 1962, Sucharit et al. 1988) and is found exclusively in the forested hilly and clear forested foothill areas (Nutsathapana et al. 1986). This species was reported to be mostly endophilic and endophagic (Sambasivan et al. 1953). After DDT was used to interrupt the malaria transmission, *An. minimus* appears to be an outdoor feeding and preferably feeds on domestic bovids (Ziegler 1967 and Ismail et al. 1976). Even though DDT provided a considerable effect on reduction of indoor biting mosquitoes, it seems that this method could not completely interrupt the malaria transmission. A certain group of this species remains feeding and resting indoor (Chareonviriyaphap et al. 2003). Similar observation was also reported from Vietnam (Bortel et al. 1999). This raises some questions on behavioral variations in *An. minimus* taxon.

Bases on information on morphological variation and genetic basis, at least two closely related species within this taxon were documented in Thailand (Sucharit et al. 1988 and Green et al. 1990) and all have been incriminated as vectors of malaria. Species A is the predominant species and commonly distributed throughout the country (Green et al. 1990) whereas species C is restricted to the areas along the western Thai-Myanmar border, especially in Tak and Kanchanaburi Provinces (Sucharit et al. 1988 and Baimai 1989). In addition, *An. minimus* species D have been proposed in Thailand by Baimai (1989) but no sufficient information is available to support the species status. Although *An. minimus* species A and C are occurring in sympatry in Thailand, differences in biting, resting and feeding behaviors, anthropophily, and ecology may influence the vector capacity of 2 species in this taxon.

Behavioral divergences of this complex were reported and the differences between two species in terms of biting and resting behavior were observed (Bortel et al. 1999). Specie A demonstrated five time endophilic behavior than those of specie C. In addition, *An. minimus* complex from various areas has been reported to have a different level in responding to intradomiciliary use of insecticides (Harrison 1980, Parajuli et al. 1981, Lien 1991, Chareonviriyaphap et al. 1999 and 2001). In Thailand, indoor house spray has been conducted to interrupt man-vector contact (Chareonviriyaphap et al. 2001). Knowing the behavioral responses to insecticides of different species especially within the same taxon will facilitate the

vector control and help to target disease vector. Behavioral responses (behavioral avoidance) to insecticides can be divided into two important classes, contact irritancy and noncontact repellency. Irritancy is referred to those leave the treated surfaces upon contact with insecticide whereas repellency is those leave the treated area before making contact with insecticides (Roberts et al. 1999). Although, behavioral responses have been conducted to test behavioral responses of various populations of *Anopheles* mosquitoes from Thailand using an excito repellency test box (Chareonviriyaphap et al 1997, 2001, and 2003 and Sungvornyothin et al. 2000 and Kong-Me et al. 2004), none has been performed to compare behavioral responses between two species within *An. minimus* taxon (species A and C). Described herein the results from experimental trials using the excito repellency test system to determine behavioral responses between field populations of *An. minimus* species A and C to field rates of DDT (2 g/m²), deltamethrin (0.02 g/m²) and lambda-cyhalothrin (0.03 g/m²). These experimental observations are subject of this report.

MATERIALS AND METHODS

Anopheles minimus test populations:

1. *Anopheles minimus* Species A: This population was obtained from human collections at Ban Tum Saue, Mae Sot District, Tak Province, West of Thailand in September- December 2004. This population was found physiologically susceptible to DDT, deltamethrin, and lambda-cyhalothrin (Chareonviriyaphap et al. unpublished data).
2. *Anopheles minimus* Species C: This population was obtained from human bait collections at Putuey County, Ta-Soa Village, Tri-Yok District, Kanchanaburi Province, West of Thailand in January-December 2003. This population was physiologically susceptible to DDT, deltamethrin, and lambda-cyhalothrin (Chareonviriyaphap et al. unpublished data).

Mosquito collections

Anopheles minimus species A and C: females were collected as adults by human baits during the night (1800-0600 hrs). Behavioral tests were performed during the next day. Temperature and relative humidity were recorded during the tests. All mosquitoes were starved approximately 4 hours before tests (Chareonviriyaphap et al. 2001).

Mosquito identification

To obtain a correct species, *Anopheles minimus* complex were identified based on morphological keys of Payton and Scanton (1966), Harrison (1980) and Rattananarithkul and Punthusiri (1994). Species A and C were differentiated by the presence or absence of the humeral pale spot on the costal vein on wings. Previous study using diagnostic enzyme (ODH) showed those without HP spots belonged to species A at 95% and species C at 73% (Green et al. 1990). Molecular method was applied to confirmed species C from Kanchanaburi (Manguin Pers Comm.).

Insecticide papers.

Insecticide impregnated papers with field dosages at 2 Al g/m^2 of DDT, 0.02 Al g/m^2 of deltamethrin, and 0.03 Al g/m^2 of lambdacyhalothrin were prepared using diluent according to World Health Organization (WHO) protocol (Busvine 1958).

Behavioral tests.

1. Test chamber. In this study, we used the improved test chamber for all tests as described in a recent publication (Chareonviriyaphap and Aum-Aong 2000).
2. Tests performed. *An. minimus* specimens were used in excito-repellency tests. The wild population was deprived of water for a minimum of 4 hours before tests. Tests were performed during the day and each test was replicated at least 4 times. Tests were conducted to compare two wild populations in contact vs. non-contact against 3 insecticides, DDT, deltamethrin, and lambdacyhalothrin. After a test was completed, the number of dead specimens were recorded separately for exposure and escape chambers. In addition, the escaped specimens and those remaining in the chamber, both controls and treatments, were maintained separately and 24-h mortalities were recorded.
3. Data analysis. Behavioral response data was analyzed using a life table method, a survival analysis approach, to estimate the escape rate and compare differences in mosquito escape response among different populations and insecticides. The mosquito escape rate was estimated at 1-min intervals. Mosquitoes that escape were treated as “deaths” and those remaining in the test chamber were treated as “survivals” (Chareonviriyaphap et al. 1997). The ET_{50} , ET_{75} and ET_{90} , the time in minutes for 50, 75 and 90% of the test population to escape,

respectively, were estimated with the life table method. The log-rank method was used to compare patterns of escape responses (Mantel and Haenzel 1959). A statistical software package, STATA, was used for this analysis as described by Roberts *et al.* (1997).

RESULTS

Behavioral responses of two wild populations of *Anopheles minimus* species A and C against 2g/m^2 DDT, 0.02 g/m^2 deltamethrin, and 0.03g/m^2 lambdacyhalothrin were compared using an excito repellency escape system. Behavioral responses, regarding contact repellency and noncontact repellency, to all three compounds were observed and percent mortalities of escape and non escape specimens from exposed chamber were recorded (Table 1).

In contact trial, percent escape of *An. minimus* species A (92-96%) from the insecticide treated chamber was generally higher than those from *An. minimus* species C (51-97%), regardless of compounds used. Higher number of *An. minimus* specie A (92%) escaped from DDT treated chamber than those of specie C (77%). Similarly, percent escapee of species A was also higher from two synthetic pyrethroids (Table 1). Pattern of escape responses were stronger in *An. minimus* species A than *An. minimus* C for all 3 compounds. Percent mortality of escape mosquitoes from both test populations was low (0-13.3%) whereas those remained in the test chamber (nonescape mosquitoes) gave high percent mortality (42.8-100%). There was a complete mortalities from non escape specimens when tested against deltamethrin and lambdacyhalothrin (Table 1). In noncontact trial, *An. minimus* species A demonstrated dramatically escape responses to all three compounds as compared to specie C. Percent escape responses were 96% for DDT, 92% for deltamethrin, and 87% for lambdacyhalothrin in *An. minimus* A whereas 24% for DDT and deltamethrin and 18% for lambdacyhalothrin. Percent mortalities of escaped and nonescaped specimens were very low, ranging from 1.1-4.5%. For controls, a comparatively low degree of test specimens took off from the chamber (12-23% for contact and 10-15% for noncontact (Table 1).

Times in minutes for test population to escape from the exposure chambers were defined in Table 2. The escape patterns from chambers containing insecticides were determined as times for 50, 75, and 90% of the test population to take off from the exposure chambers (ET50, ET75, and ET90). In contact trial, the ET50, ET75, and ET90 values of *An. minimus* A for 2 g/m^2 DDT were 5, 12.5, and 24, for 0.02 g/m^2 deltamethrin were 2.5, 6, and 16 and for 0.03g/m^2 lambdacyhalothrin were 7, 23.5, and 30 respectively (Table 2). The ET50 value of *An. minimus* C was 5, 8.5 and 6 for 2 g/m^2 DDT, 0.02 g/m^2 deltamethrin and 0.03 g/m^2 lambdacyhalothrin. The ET75 and ET90 values for all three compounds against *An. minimus* C could not be calculated. Likewise, the ET50, ET75 and ET90 values for *An. minimus* C against all

three compounds in noncontact trial could not be estimated (Table 2). For *An. minimus* A in noncontact trial, the ET50, ET75, and ET90 values for 2 g/m² DDT were 5, 4.5, and 14, for 0.02 g/m² deltamethrin were 5.6, 8, and 25 and for 0.03g/m² lambdacyhalothrin were 6.5 and 23.5 (Table 2).

Comparison of escape responses between *An. minimus* species A and C in contact and noncontact trials was analysed with the log rank method at the 0.05 level of probability (Table 3). Statistically significant differences in escape patterns between *An. minimus* A and C were found in noncontact trials for all three compounds ($P < 0.05$). In contact trial, significant differences in escape responses between *An. minimus* A and C were observed when tested against DDT and deltamethrin exclusively ($P < 0.05$) (Table 3). Comparison of escape responses between contact and control, contact and noncontact, and noncontact and control trials for *An. minimus* A and C for all 3 compounds was given in Table 4. No significant difference in escape responses of *An. minimus* A was found when contact and noncontact trials were compared ($P > 0.05$). Escape probabilities in contact and noncontact trials were significant higher than in the controls for all tests (Table 4).

Figures 1-3 show the proportions of mosquitoes remaining in the exposure chambers under different test conditions. These proportions provide the patterns of escape rates and are indicative of escape probabilities between *An. minimus* A and C for DDT (Fig 1), deltamethrin (Fig 2) and lambdacyhalothrin (Fig 3). Significant differences were seen when contact trials were compared with control and noncontact trials ($P < 0.05$). Escape patterns in all noncontact repellency were significantly higher than those from the controls for all three compounds.

DISCUSSION

This is the first finding to demonstrate the behavioral responses of *An. minimus* species A and C.

ACKNOWLEDGMENTS

This research project was supported in full by the Thailand Research Funds (Grant # PDF 67/2540), Thailand.

REFERENCES CITED (PREVIOUS RELATED WORKS prepared for the discussion)

Ayurakit-Kosol L, Griffith ME. 1963. *Progress toward malaria eradication in Thailand*. Proc. 9th Pacific Sci. Congr., 17, 122-136.

Bondareva NI, Artem'ev MM, Gracheva GV. 1986. Susceptibility and irritability caused by insecticides to malaria mosquitoes in USSR. Part 1. *Anopheles pulcherrimus*. *Med Parazitol Parazit Bolezni* 6: 52-55.

Busvine JR. 1958. Experiments concerned with the development of World Health Organization test for resistance in adult mosquitoes. *Indian J Malariol* 12:279-286.

Chareonviriyaphap T, Roberts DR, Andre RG, Harlan HH, Manguin S, Bangs MJ. 1997. Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*, a malaria vector in the Americas. *J Amer Mosq Control Assoc* 13(2) 171-183.

Chareonviriyaphap T, Aum-Aong B, Ratanatham S. 1999. Current insecticide resistant pattern in mosquito vectors. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30: 130-141.

Chareonviriyaphap T, Aum-Aong B. 2000. Improved excito-repellency escape chamber for behavioral tests on mosquitoes. *Mekong Malaria Forum* 5: 82-86.

Davidson G. 1953. Experiments on the effect of residual insecticides in houses against *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Bull Entomol Res* 44: 231-254.

Evans, R.G. 1993. Laboratory evaluation of the irritancy of bendiocarb, lambdacyhalothrin, and DDT to *Anopheles gambiae*. *J Am Mosq Control Assoc* 9: 285-293.

Mantel N, Haenzel W. 1959. Statistic aspects of the analysis of data from retrospective studies of diseases. *J Natl Cancer Inst* 22: 719-748.

Nutsathapana S, Sawasdiwongphorn P, Chiprarop V, Cullen JR. 1986. The behavior of *Anopheles minimus* Theobald (Diptera: Culicidae) subjected to differing levels of DDT selection pressure in northern Thailand. *Bull Entomol Res* 76: 303-312.

Poolsuwan S. 1995. Malaria in prehistoric Southeast Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 26: 3-22.

Prasittisuk M. 1995. *Comparative study of pyrethroids impregnated bednets with DDT residual spraying for malaria control in Thailand*. Ph.D. Thesis, Mahidol University Bangkok Thailand, 225 pp.

Quinones ML, Suarez MF. 1989. Irritability to DDT of natural populations of the primary malaria vectors in Colombia. *J Am Mosq Control Assoc* 5: 56-59.

Reid JA, 1968. *Anopheles* mosquitoes of Malaya and Borneo. Studies of the Institute for Medical Research, Malaysia, No. 31, 520pp.

Rawlings P, Davidson G, 1982. The dispersal and survival of *Anopheles culicifacies* in a Sri Lankan village under malathion spraying. *Bull Entomol Res* 72: 139-144.

Ree HI, Loong KP. 1989. Irritability of *Anopheles farauti*, *Anopheles maculatus*, and *Culex quinquefasciatus* to permethrin. *Jpn J Sanit Zool* 40: 47-51.

Roberts DR, Alecrim WD, Tavares AM, Mc. Neil KM. 1984. Influence of physiological condition on the behavioral response of *Anopheles darlingi* to DDT. *Mosq News* 4: 357-361.

Roberts DR, Andre RG. 1994. Insecticide resistant issues in vectors. *Amer J Trop Med Hyg* 50 (Suppl): 21-34.

Roberts DR, Chareonviriyaphap T, Harlan HH, Hsieh P. 1997. Methods of testing and analyzing excito-repellency responses of malaria vectors to insecticides. *J Amer Mosq Control Assoc* 13(1) 13-17.

Roberts DR, Alecrim WD, Hsieh P, Grieco JP, Bangs M, Andre RG, Chareonviriyaphap T. 2000. A probability model of vector behavior: Effects of DDT repellency, irritancy, and toxicity in malaria control. *J Vector Ecol* 25(1) 48-61.

Rutledge LC, Echara NM, Gupta RK. 1999. Responses of male and female mosquitoes to repellents in the World Health Organization insecticide irritability test system. *J Amer Mosq Control Assoc* 15(1) 60-64.

Sucharit S, Komalamisra N, Leemingsawat S, Apiwathnasorn C, Thongrungrat S. 1988. Population genetic studies on the *Anopheles minimus* complex in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 19: 717-723.

Suwonkerd W, Aum-Aong B, Rimwangtrakul K, Wongkattiyakul S, Kattiyamongkool B, Chitprarop U, Takagi M. 1990. A field study on the response of *Anopheles dirus* to DDT and fenetrothion sprayed to huts in Phetchabun province, Thailand. *Trop Med* 32: 1-5.

Threlkeld SFH. 1985. *Behavioral responses in Drosophila melanogaster associated with permethrin and ectiban*. Proceedings of the thirty-second annual meeting, Canadian Pest Management Society. 1985 June 24-26; Charlottetown, Prince Island. p 29-36.

Table 1.

Condition	Population	Chemical	Number		%Mortality	
			#Test	Escaped(%)	Escaped	not escaped
CONTACT						
	An. minimus A	DDT	85	78(92)	0	42.8
		DDT-C	85	10(12)	0	0
		Del	76	73(96)	0	100
		Del-C	75	17(23)	0	0
		Lam	77	72(94)	1.4	100
		Lam-C	78	18(23)	0	0
	An. minimus C	DDT	100	77(77)	1.3	0
		DDT-C	100	15(15)	13.3	1.2
		Del	98	50(51)	2	0
		Del-C	94	13(14)	0	1.2
		Lam	97	94(97)	1.1	0
		Lam-C	100	18(18)	0	0
NON-CONTACT						
	An. minimus A	DDT	85	82(96)	0	100
		DDT-C	83	22(27)	0	0
		Del	76	70(92)	0	66.7
		Del-C	75	22(29)	4.5	0
		Lam	77	67(87)	1.5	50
		Lam-C	77	21(27)	0	0
	An. minimus C	DDT	100	24(24)	0	0
		DDT-C	100	10 (10)	0	0
		Del	100	20(24)	0	0
		Del-C	100	10(10)	0	1.1
		Lam	95	17(18)	0	0
		Lam-C	95	14(15)	0	0

Codes for chemicals and doses DDT=2g/m² of DDT; Del= 0.02 g/m² of deltamethrin, Lam=0.03 g/m² of lambdacyhalothrin

DDT-C, Del-C and Lam-C are codes for controls (without insecticides).

Table 2.

Test condition	Population/ Colony	DDT ¹			Del ²			Lam ³		
		ET ₅₀ ⁴	ET ₇₅	ET ₉₀	ET ₅₀ ⁴	ET ₇₅	ET ₉₀	ET ₅₀ ⁴	ET ₇₅	ET ₉₀
Contact										
	Min A	5	12.5	24	2.5	6	16	7	23.5	30
	Min C	5	-	-	8.5	-	-	6	12.5	-
Noncontact										
	Min A	2	4.5	14	5.6	8	25	6.5	23.5	-
	Min C	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹DDT at 2 g/m²²Deltamethrin at 0.02/ g/m²³Lamdacyhalothrin at 0.03 g/m²⁴Survival analysis was used to estimate the time in minutes for 50 and 90% of test populations to exit exposure chambers.

Table 3.

Insecticides	Contact trial	Non contact trial
DDT	Min A vs. Min C*	Min A vs. Min C*
Del	Min A vs. Min C*	Min A vs. Min C*
Lam	Min A vs. Min C	Min A vs. Min C*

DDT= 2 g/m² of DDT

Del=0.02 g/m² of deltamethrin

Lam=0.03 g/m² of lambdacyhalothrin

The * identifies results of log-rank tests with statistically significant (0.05 level of probability) differences in patterns of escape behavior.

Table 4.

Population	contact vs. non-contact	contact vs. control	non-contact vs. control
Min A	DDT*	DDT*	DDT*
	Del	Del*	Del*
	Lam	Lam*	Lam*
Min C	DDT*	DDT*	DDT*
	Del*	Del*	Del*
	Lam*	Lam*	Lam*

DDT= 2 g/m² of DDT

Del=0.02 g/m² of deltamethrin

Lam=0.03 g/m² of lambda-cyhalothrin

The * identifies results of log-rank tests with statistically significant (0.05 level of probability) differences in patterns of escape behavior.

TABLE LEGEND

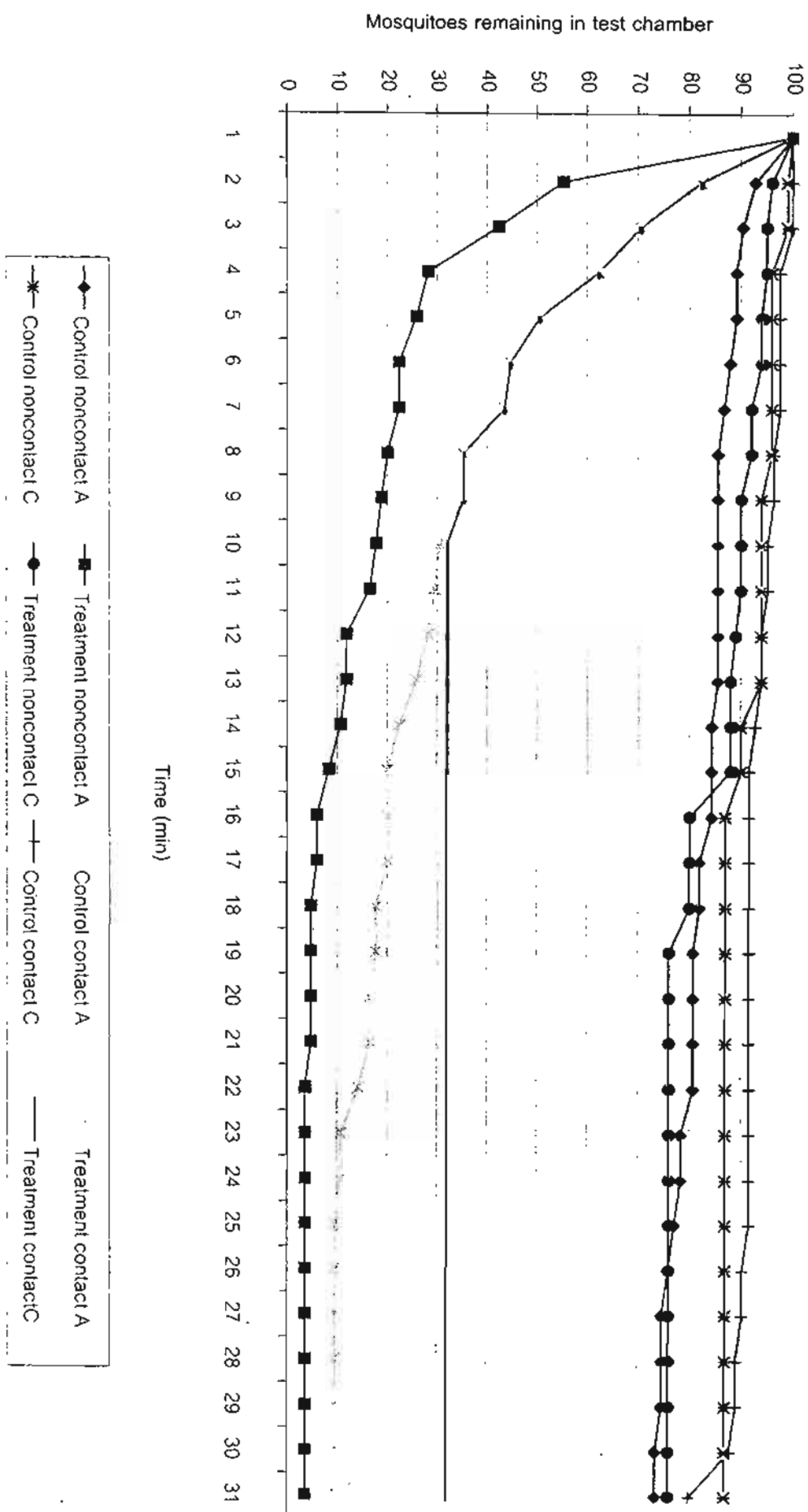
Table 1. Mortalities of *Anopheles minimus* females after a 24-h holding period following exposures in contact trials of excito-repellency tests.

Table 2. Time in minutes for 50 (ET₅₀) and 90% (ET₉₀) of *Anopheles minimus* females to escape from exposure chambers (in excito-repellency tests) treated with 2 g/m² of DDT, 0.02 g/m² of deltamethrin, and 0.03 g/m² of lambdacyhalothrin.

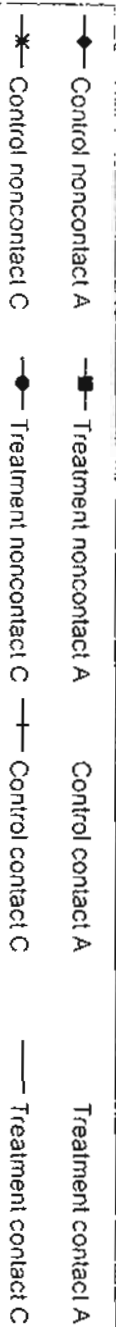
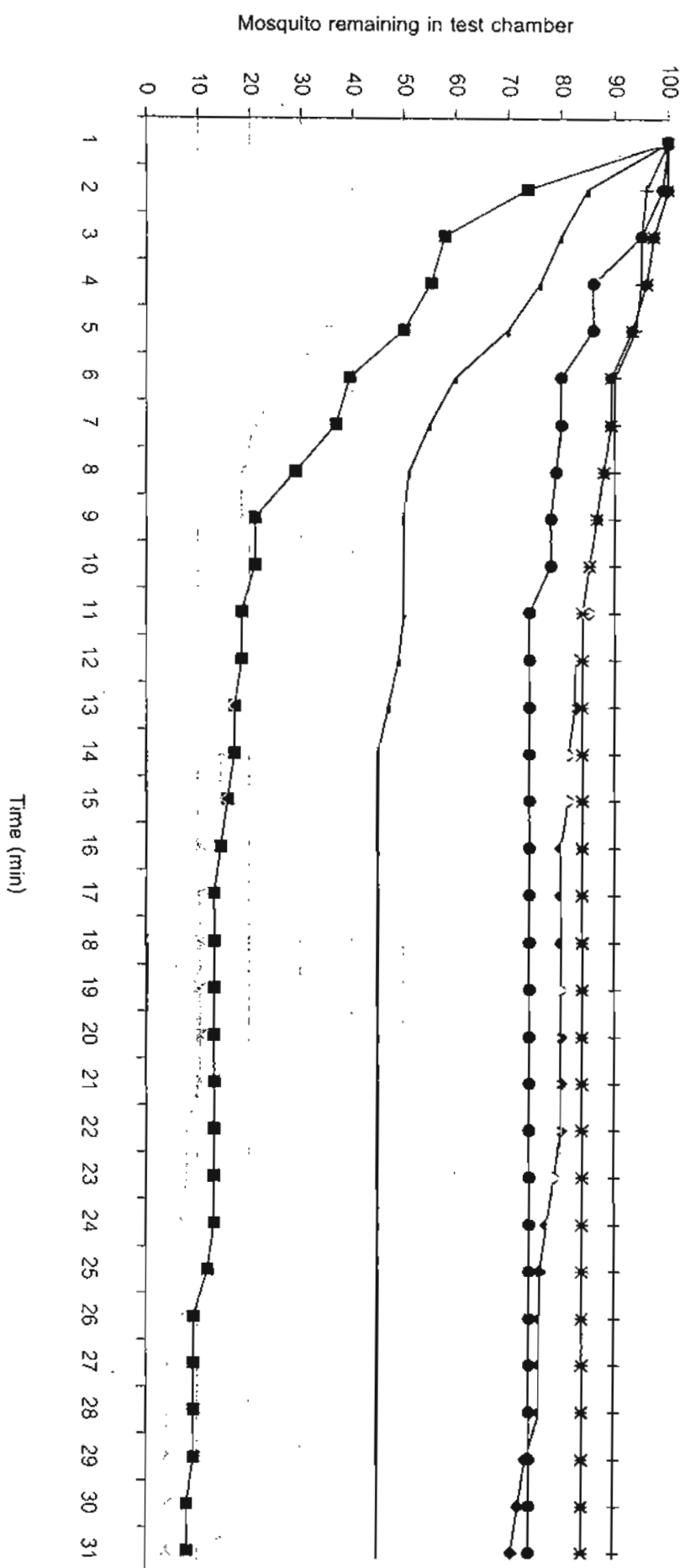
Table 3. Comparison of escape responses between 2 test populations of *Anopheles minimus* females in contact versus non-contact trials by insecticides.

Table 4. Comparison of escape responses between contact versus non-contact, contact versus control and non-contact versus control for 2 test populations.

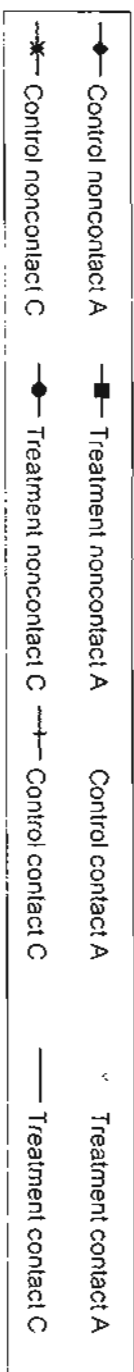
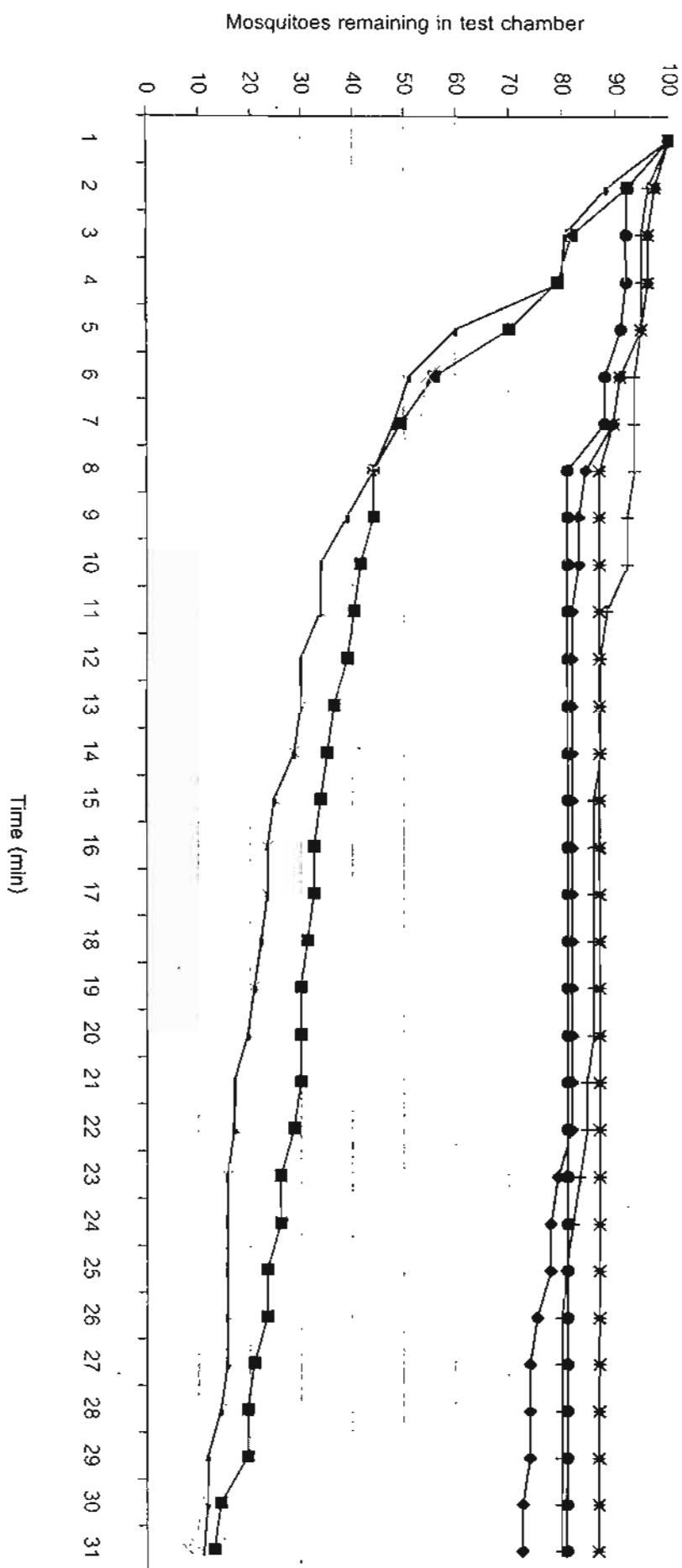
DDT MIN A AND C



Deltamethrin MIN A AND C



LAM MIN A AND C



Scientific Note

An improved excito-repellency test chamber for mosquito behavioral tests

Theeraphap Chareonviriyaphap^{1,3}, Atchariya Prabaripai², and Sungsit Sungvornyothin¹

¹Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhen, Bangkok 10900 Thailand

²Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaengsean Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand

³Corresponding Author

Received 28 February 2002; Accepted 29 April 2002

Despite significant gains in its control, malaria remains a serious threat in Thailand especially in areas that border with neighboring countries (Chareonviriyaphap et al. 2000). The prevention of malaria transmission in Thailand relies on the effective treatment of infections and the reduction of contacts between vectors and humans. Understanding the behavioral responses of malaria vectors, especially avoidance behavior to residual insecticides, is of particular importance to any vector control program. There have been numerous attempts to accurately measure the behavioral responses of mosquitoes to insecticides using various types of excito-repellency test systems (Roberts et al. 1984, Rutledge et al. 1999, Sungvornyothin et al. 2001). However, no test system has been fully accepted as a standardized method of testing and analyzing avoidance responses (Roberts et al. 1984 and Evans 1993). Chareonviriyaphap et al. (1997), using an experimental escape chamber system (Roberts et al. 1997), provided information on both contact irritability and non-contact repellency for behavioral response tests on *Anopheles albimanus* under laboratory and field conditions. Unfortunately, this prototype test system was cumbersome and required extended time to attach the test papers onto the inner walls. To overcome this problem, a collapsible excito-repellency test chamber was developed (Chareonviriyaphap and Aum-Aong 2000). This test system evaluated the behavioral responses of a laboratory colony and field populations of *Anopheles minimus* to DDT, deltamethrin and lambda cyhalothrin (Chareonviriyaphap et al. 2001). Although the chamber

system could be disassembled for transport and results were reproducible, this test system required much time to assemble. Moreover, test paper holders were affected by the assembly screws penetrating the inner chamber, complicating test set-up. To overcome these technical problems, an improved version of the excito-repellency test chamber design was developed as described in this report.

The improved version of the excito-repellency test system is shown in Figure 1. As in previous models, the outer chamber is constructed with four metal sides, each side wall measuring 33.5 x 33.5 cm². Walls are constructed of stainless steel (thickness 0.7 mm) with an aluminum sliding rib on each end. The screened inner chamber is a 4 side-box slightly smaller than the outer chamber walls, measuring 33.5 x 22.5 cm² each. The inner chamber functions as the test paper holder, each wall having 2 functional sides. Each side of the wall has a framed panel to hold the test paper in place. Depending upon the objective of the test, the impregnated papers can be placed on either side of the panel in a position to allow or prevent mosquitoes from making physical contact with the test paper surface. There is a 0.9 cm gap between the test paper and screen barrier to prevent mosquitoes making direct contact with the test paper surfaces during the non-contact repellency test. A PlexiglasTM holding frame is used to hold the Plexiglas panel in place and secure the whole system tightly without the use of metal screws. The panel has a rubber door of 15 cm diameter made of a split sheath of dental dam, allowing mosquitoes to be placed inside the chamber or to remove them after the testing period. A forward exit portal is composed of a horizontal opening, 15 cm long and 2 cm wide, at the end of an outward projecting funnel. A stainless steel

Keyword Index: Excito-repellency, improved system, behavioral test.

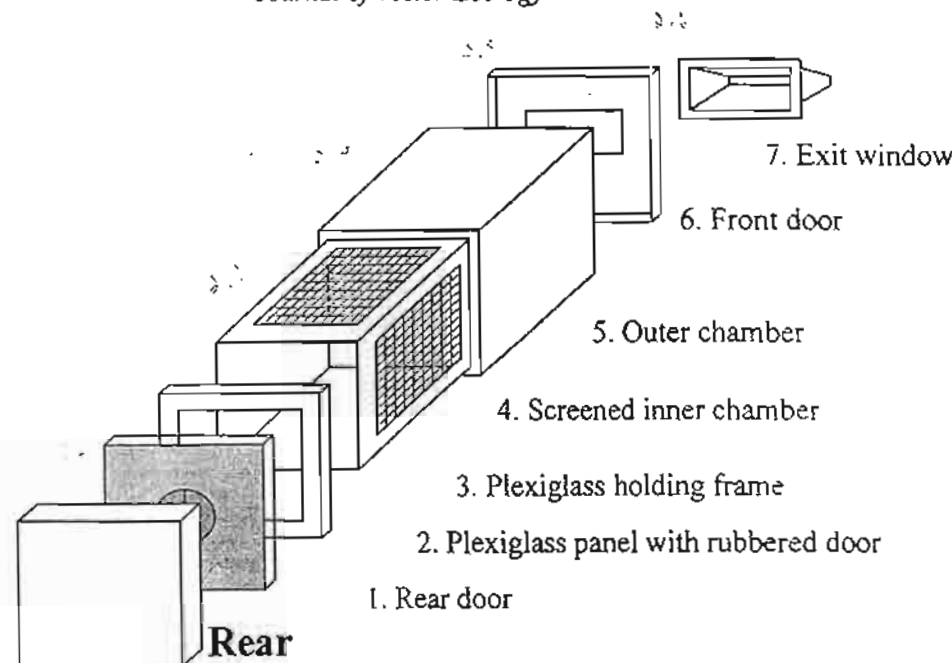


Figure 1. An improved excito-repellency test system for behavioral study.

cover secures the rear door tightly.

Insecticide treated surfaces (insecticide-impregnated or non-impregnated control papers) are attached to one side of each holding frame depending on the test objective (either contact and non-contact test design). There are four small spring clamp mechanisms on each corner to firmly secure the test papers. To assemble the excito-repellency chamber, the four inner walls are connected by sliding the appropriate aluminum tongue and groove elements together to construct the screened inner chamber. Each inner wall also serves as the test paper holder in either the contact or non-contact mode. A spring mechanism on each corner of the wall secures the test paper. The four outer walls are connected by sliding the appropriate corner tongue and groove elements together to form a box. The inner chamber with attached papers is then carefully inserted into the outer chamber so that no part of the inner chamber is exposed outside and the rear door cover can be attached. The front door is then attached to the chamber together with the front escape funnel. The rear metal door cover is attached. A Plexiglas holding frame is attached to secure the entire system. A receiving box, 6 x 6 x 6 cm³, is constructed of stiff paper carton material with screen netting on top for observation of escaped mosquitoes. The box has a square hole the same size of the outward projection of the escape funnel and is attached to the exterior exit portal of the chamber. A hole,

5 cm diameter and sealed with a piece of split dental dam, is placed on the front face of the receiving cage to allow collection of the escaped mosquitoes with an aspirator.

Test methods and analysis have been described elsewhere (Sungvornyothin et. al. 2001, Roberts et al. 1997). Only female specimens are used in excito-repellency tests. After a test is completed (30 or 60-min exposure times), the number of dead and live specimens is recorded separately in the exposure chamber and receiving box. Immediately following the test, all live specimens in control and treatment test chambers are maintained separately by lot (escaped or nonescaped) and given a 10% sucrose diet to observe post-exposure 24-h mortalities.

This recent version of the excito-repellency test system has been used to measure the behavioral responses of *An. minimus* and *Anopheles dirus* laboratory colonies exposed to paper surfaces impregnated with 2 g/m² DDT and 20 mg/m² deltamethrin. Results showed that female *An. minimus* and *An. dirus* demonstrated a dramatic escape response to DDT and deltamethrin compared to mosquitoes exposed to the untreated control chambers. A more rapid response in time to escape to both insecticides was observed with *An. minimus* compared to *An. dirus*. Results revealed that most specimens escaped the test chamber without acquiring a lethal dose at 24-h post-exposure. DDT and deltamethrin demonstrated a small degree of non-contact repellency with both species. Details from these excito-

pellency tests will be reported in a future study. This modified excito-repellency test system is a vast improvement, with more desirable operational attributes compared to previous designs regarding ease of use and reproducibility of test observations. The entire test system is easy to assemble and can be disassembled in minutes. It is also much easier to remove remaining mosquitoes from the test chambers after the test is completed compared to the previous versions. We have found the new test system can generate consistent and standardized results for measuring mosquito behavioral avoidance and separate contact irritancy and non-contact repellency responses.

Acknowledgments

We thank Michael J. Bangs, U.S. Naval Medical Research Unit No.2, Jakarta, Indonesia for his advice during implementation of this work and review of the manuscript. We also thank Dr. D.R. Roberts, Department of Preventive Medicine and Biometrics, the Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland for his valuable comments on the ER test system. Finally, we would like to thank the Thailand Research Fund Organization and the Kasetsart University Research and Development Institute, Bangkok, Thailand for funding support.

REFERENCES CITED

- Chareonviriyaphap, T., D.R. Roberts, R.G. Andre, H. Harlan and M.J. Bangs. 1997. Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus* Wiedemann. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 13:171-183.
- Chareonviriyaphap, T. and B. Aum-Aong. 2000. An improved excito-repellency escape chamber for behavioral test in mosquitoes. *Mekong Malaria Forum* 5: 82-85.
- Chareonviriyaphap, T., M.J. Bangs, and S. Ratanatham. 2000. Status of malaria in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.* 31: 225-237.
- Chareonviriyaphap, T., S. Sungvornyothin, S. Ratanatham, and A. Prabaripai. 2001. Pesticide-induced behavioral responses of *Anopheles minimus*, a malaria vector in Thailand. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 17: 13-22.
- Evans, R.G. 1993. Laboratory evaluation of the irritancy of bendiocarb, lambda-cyhalothrin, and DDT to *Anopheles gambiae*. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 9: 285-293.
- Roberts, D.R., W.D. Alecrim, A.M. Tavares, and K.M. McNeill. 1984. Influence of physiological condition on the behavioral response of *Anopheles darlingi* to DDT. *Mosq. News* 4: 357-361.
- Roberts, D.R., T. Chareonviriyaphap, H.H. Harlan, and P. Hsieh. 1997. Methods for testing and analyzing excito-repellency responses of malaria vectors to insecticides. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 13: 13-17.
- Rutledge, L.C., N.M. Echana, and R.K. Gupta. 1999. Responses of male and female mosquitoes to repellents in the World Health Organization insecticide irritability test system. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 15: 60-64.
- Sungvornyothin S., T. Chareonviriyaphap, A. Prabaripai, V. Trirakhupt, S. Ratanatham, and M.J. Bangs. 2001. Effects of nutritional and physiological status on behavioral avoidance of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) to DDT, deltamethrin and lambda-cyhalothrin. *J. Vector Ecol.* 26: 202-215.

Seasonal Abundance and Blood Feeding Activity of *Anopheles minimus* Theobald (Diptera: Culicidae) in Thailand

THEERAPHAP CHAREONVIRIYAPHAP,¹ ATCHARIYA PRABARIPAI,² MICHAEL J. BANGS,³
AND BOONSERM AUM-AUNG⁴

J. Med. Entomol. 40(6): 876-881 (2003)

ABSTRACT Anopheline mosquito larvae and adults were sampled at Ban Pu Teuy, Tri-Yok District, Kanchanaburi Province, western Thailand, from January 2000 to December 2001. Over the period of 2 yr, *Anopheles minimus* sensu lato was the most commonly collected species, followed by *Anopheles swadiwongporni* and *Anopheles dirus* sensu lato; all three species are important vectors of malaria in Thailand. Attempted blood feeding by *An. minimus* occurred throughout the night, with two distinct feeding peaks: strong activity immediately after sunset (1800-2100 hours), followed by a second, less pronounced, rise before sunrise (0300-0600 hours). *Anopheles minimus* were more abundant during the wet season compared with the dry and hot seasons, although nocturnal adult feeding patterns were similar. *Anopheles minimus* fed readily on humans inside and outside of houses, showing a slight preference for exophagy. The human-biting peak of *An. minimus* in our study area differed from other localities sampled in Thailand, indicating the possible existence of site-specific populations of *An. minimus* exhibiting different host-seeking behavior. These results underscore the importance of conducting site-specific studies to accurately determine vector larval habitats and adult activity patterns and linking their importance in malaria transmission in a given area.

KEY WORDS *Anopheles minimus*, blood feeding, mosquito abundance, exophagy, Thailand

IN THAILAND, MALARIA is still one of the important infectious diseases, with more than 100,000 reported cases each year (Department of Communicable Disease Control 1985-2001). Surveillance data has indicated malaria continues to occur sporadically over much of the country and has reemerged in previously malaria-free localities (Department of Communicable Disease Control 1985-2001). Malaria remains prevalent along the underdeveloped national borders between Thailand and eastern Myanmar and western Cambodia (Chareonviriyaphap et al. 2000). Nearly one half of all reported malaria cases in the country have been from the mountainous western frontier and international borderlines with Myanmar extending from Tak to Kanchanaburi Provinces. These areas are especially vulnerable, because of uncontrolled tribal population movements associated with occupational activities, including gem mining, hunting, and logging. *Anopheles minimus*, a confirmed and important malaria vector in Thailand, is abundant in the border frontier area (Chareonviriyaphap et al. 2000).

The taxon *An. minimus* Theobald represents a complex of closely related species that are difficult to distinguish morphologically (Rattanarithkul and Punthustri 1994). Members of this species complex are common along the Thai-Myanmar border, particularly in Kanchanaburi Province (Green et al. 1990). In Thailand, at least three related species are present (Sucharit et al. 1988, Baimai 1989, Green et al. 1990): species A is found throughout the country; whereas species C and D are more commonly collected along the western Thai-Myanmar border, including Kanchanaburi Province (Baimai 1989). This complex has been reported to be primarily zoophilic in feeding habits, preferring to feed and rest out of doors, especially in response to indoor residual spraying (IRS) of insecticides (Nutsathapana et al. 1986). Behavioral avoidance of structures by the *An. minimus* group in response to IRS also has been reported from Vietnam (Van Bortel et al. 1999). During the past two decades, disease vector research in Thailand had been reorganized and gained useful information on the public health importance of vectors. As a consequence, the number of *Anopheles* species and species complexes reported has increased (Baimai 1989). In recent years, infrastructural development, expanded housing, and facility-based tourism in forest and forest-fringe areas has resulted in the adaptation of many malaria vectors to these ecological changes. Information on the life history, blood feeding activity, and ecological relationships for pathogens transmission by *An. minimus*

¹ Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand.

² Division of Mathematics, Biostatistics and Computer, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaengsean, Nakhon Pathom 73140 Thailand.

³ U.S. Naval Medical Research Unit No. 2, Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta, 10560, Indonesia.

⁴ Malaria Division, Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000 Thailand.

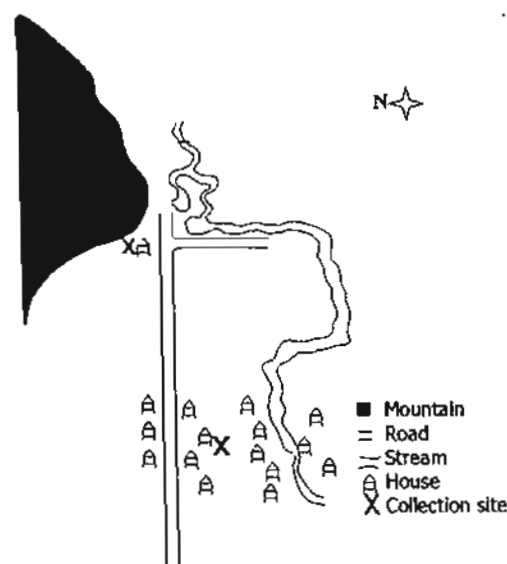


Fig. 1. Map of Ban Pu Teuy and collection sites (marked X).

requires careful study and reassessment, especially in areas in which sympatric sibling species coexist. Taking a stratified approach, the host-locating habits of mosquito vectors in malaria endemic areas are of particular concern for vector incrimination and to acquire information on the epidemiological factors related to high malaria risk areas. Research on larval habitat variability related to seasonal adult density and blood feeding behavior of *An. minimus* s.l. were conducted in Ban Pu Teuy, Tri-Yok District, Kanchanaburi Province to provide information on this malaria vector in relation to malaria transmission.

Materials and Methods

Study Area. The study was conducted at Ban Pu Teuy, Tri Yok District, Kanchanaburi Province (14°17'N, 99°11'E), ~50 km southwest of Bangkok. The site is located in mountainous terrain surrounded by deep forest (Fig. 1). Local occupations are linked closely with the forests, principally logging, hunting, and forest preservation. The area was determined to be an excellent habitat for *An. minimus* (Baimai 1989). There was a narrow, slow moving stream (~2 m in width and average of 1 m in depth) with native vegetation along its margins, running through the low hill zone across the village that served as reference point for all collection activities. IRS using DDT (2 g/m²) had been routinely applied in homes for 40 yr (1960–2000), but was not done during the investigation period.

Larval Surveys. All potential aquatic habitats associated with the stream were surveyed every month from January 2000 to December 2001. Surveys took place during morning (0800–1200 hours) and afternoon (1300–1600 hours) hours, 3 d each month. Two collectors sampled the margin of the stream for ~300 m

upstream (2 m width) from the field laboratory station using a 500-ml dipper. Approximately 20–30 dips were taken by each collector along a designated area of the stream. All samples were kept alive in plastic bags and returned to the laboratory at the Department of Entomology, Kasetsart University, Bangkok, for processing and species identification.

Adult Surveys. Collections during the first year were made ~200 m from the stream bank by two teams of four persons each. One team collected mosquitoes from 1800 to 2400 hours, followed by the second team collecting from midnight to dawn (0000–0600 hours). Each group including both indoor and outdoor collectors was rotated between early and late collection periods to decrease bias. Paired, outdoor and indoor landing collections from human volunteers (two collectors per site) were conducted in a uniform manner throughout hourly collection intervals of 50 min/h with a 10-min break. Each collector exposed their lower legs and collected all landing mosquitoes individually in glass vials. Outdoor collection sites were ~10 m from the dwellings where the indoor collections were conducted. Specimens were recorded by collection hour and identified to species the following morning. Human-landing collections were made two nights each month from the same localities. Adult collections during the second year were shifted to the village, which is ~400 m from the first year collection site. All collection methods were the same as described for the first year. Hourly ambient outdoor temperature and humidity readings were made during the period of mosquito collection. Rainfall data were obtained from the local Meteorological Station located in the Tri Yok District, Kanchanaburi Province.

Data Analysis. Three main factors, involved in human landing collections, are selected for analysis including, seasons [wet (June to November), dry (December to February), and hot (March to May)], time periods [evening (1800–2100 hours), late night (2100–2400 hours), before dawn (0100–0300 hours), and dawn (0300–0600 hours)] and indoors and outdoors.

Nocturnal blood-feeding cycles of *An. minimus* were tabulated by number per human per hour for indoor and outdoor collections during the 2-yr period. The differences in number for mosquitoes landing were analyzed by three-way analysis of variance, with year as a block factor and differences among groups determined by Duncan multiple range test. All data were analyzed using SAS program package (SAS Releases 6.10, SAS Institute, Cary, NC).

Results

Mosquito larval survey results from January 2000 to December 2001 are summarized in Table 1. All *Anopheles* mosquitoes were identified to species using illustrated morphological keys to adult *Anopheles* in Thailand (Harrison 1980, Rattanarithikul and Panthusiri 1994, Department of Communicable Disease Control 1985–2001). Three genera, *Anopheles*, *Culex*, and *Aedes*, were collected along the grassy margins of the

Table 1. Monthly collection of larval mosquitoes of three *Anopheles* species by two collectors in a stream at Ban Pu Teuy, Kancharaburi Province, 2000 and 2001

Year	Month	<i>An. minimus</i> s.l. Total (%)	<i>An. dirus</i> Total (%)	<i>An. swadiwongporni</i> Total (%)	Total
2000	January	985 (99.7)	2 (0.2)	1 (0.1)	988
	February	1295 (99.6)	2 (0.2)	2 (0.2)	1299
	March	587 (98.2)	3 (0.5)	8 (1.3)	598
	April	773 (97.8)	5 (0.6)	13 (1.6)	791
	May	1276 (96.4)	2 (0.2)	18 (1.4)	1296
	June	967 (97.5)	2 (0.2)	23 (2.3)	992
	July	623 (95.9)	6 (0.9)	21 (3.2)	650
	August	856 (98.5)	1 (0.1)	12 (1.4)	869
	September	445 (94.7)	1 (0.2)	24 (5.1)	470
	October	645 (91.9)	1 (0.1)	56 (8.0)	702
	November	142 (89.9)	4 (2.5)	12 (7.6)	158
	December	132 (85.2)	0 (0)	23 (14.8)	155
2001	January	555 (99.6)	1 (0.2)	1 (0.2)	557
	February	665 (99.7)	0 (0)	2 (0.3)	667
	March	543 (99.3)	1 (0.2)	3 (0.5)	547
	April	1224 (99.7)	1 (0.1)	3 (0.2)	1228
	May	976 (99.1)	1 (0.1)	8 (0.8)	985
	June	897 (99.5)	2 (0.2)	3 (0.3)	902
	July	923 (98.6)	1 (0.1)	12 (1.3)	936
	August	623 (99.5)	0 (0)	3 (0.5)	626
	September	434 (99.3)	1 (0.2)	2 (0.5)	437
	October	443 (98.5)	1 (0.2)	6 (1.3)	450
	November	189 (96.4)	0 (0)	7 (3.6)	196
	December	156 (99.4)	0 (0)	1 (0.6)	157

slow running stream. Both margins of the stream contained shallow, stagnant water, often covered with dense vegetation along the edges, which served as habitats for *An. minimus* and *An. swadiwongporni*. Mosquito larvae were more abundant in the first half of the year (January–July) than in the second half of the year (August–December). Low numbers of larvae were collected in November and December. *Anopheles minimus* was the most common species encountered, comprising 84–99% of the total larval mosquito collected. *Anopheles swadiwongporni* larvae were relatively abundant, ranging from 0.1 to 17.4% of total anophelines depending upon time of year. Larvae of *Anopheles dirus* s.l. were uncommon in this stream environment compared with the other two species (generally <1%). Because of the relatively low number of larvae and adult *An. swadiwongporni* and *An. dirus* s.l., results focused on *An. minimus*.

Human-landing collection (HLC) rates of *An. minimus* were recorded from indoor and outdoor collections over a 2-yr period. Generally, outdoor collection of *An. minimus* exceeded indoor collection. During the first year, the outdoor HLC began to increase in June, reaching a peak in October, before dramatically decreasing in November. Similarly, indoor catches showed an elevated peak in October and November. In the second year, the outdoor landing rate was consistently higher than the indoor landing rate throughout the year. An outdoor activity peak was observed in April, without a corresponding indoor peak that followed much later in November. The lowest indoor and outdoor activity was observed in February. The mean HLC was higher in October than in all other months of the year (Fig. 2).

Indoor and outdoor feeding cycles of *An. minimus* were observed during the 2-yr period. In the first year,

peak outdoor biting activity was observed from 1800 to 2100 hours, with a maximum at 1900–2000 hours. Lowest outdoor biting activity of *An. minimus* was observed from 0100 to 0300 hours. Indoor collections consistently peaked in the early evening between 1800–1900 hours, with only a moderate peak observed just before dawn at 0100–0300 hours. In the second year, outdoor feeding activity was ~2 times greater than that of the paired indoor collections. The mean HLCs were elevated at dusk (1800–2000 hours) and dawn (0300–0600 hours) in both indoor and outdoor collections over the period of 2 yr (Fig. 3).

Total numbers landing per hour were used in a three-way analysis of variance, with seasons, indoors and outdoors, and time periods as main effects. No significant differences ($P > 0.05$) in HLCs were observed between the 2 yr of collection. Significant differences were found among seasons ($F = 13.09$; $df = 2, 23$; $P < 0.001$), between indoor and outdoor ($F = 8.02$; $df = 1, 23$; $P = 0.009$), and among time periods ($F = 6.12$; $df = 3, 23$; $P = 0.003$). Strong interactions between seasons and indoors and outdoors were observed [$F = 4.15$; $df = 2, 23$; $P = 0.029$, Fig. 4). There was no interaction between seasons and time periods ($F = 2.1$; $df = 6, 23$; $P = 0.092$), between time periods and indoors and outdoors ($F = 1.95$; $df = 3, 23$; $P = 0.15$), and among seasons, time periods, and indoors and outdoors ($F = 0.99$; $df = 6, 23$; $P = 0.457$) (Fig. 4).

Discussion

Anopheles minimus s.l. is regarded as an important malaria vector in forest fringe and hill areas of Thailand (Reid 1968, Ismail et al. 1978). Members of this widely dispersed species complex are indistinguishable morphologically from one another (Rattana-

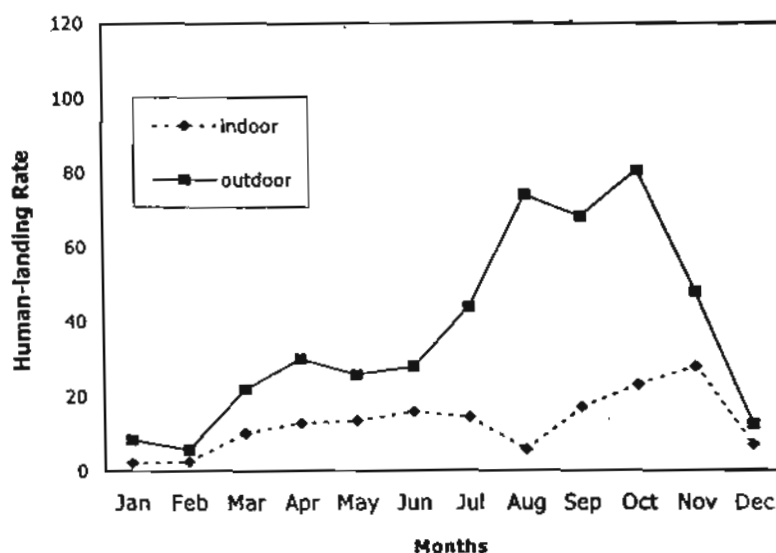


Fig. 2. Monthly indoor and outdoor human-landing rates of *Anopheles minimus* over the 2-yr period.

rithikul and Punthusiri 1994). In Thailand, this group contains at least three genetically related species, designated *An. minimus* A, C, and D (Sucharit et al. 1988, Baimai 1989, Green et al. 1990, Baimai et al. 1996, Kengne et al. 2001).

In our study, *An. minimus* s.l. was the most commonly collected mosquito species along the stream margins and represented more than 95% of the total larvae collected for each month of the 2-yr period. Low numbers in November and December were attributed to the removal of water plants along the stream to improve drainage. This activity commonly was conducted at the end of wet season and temporarily modified larval habitats. In Kanchanaburi Province, *An. minimus* generally is abundant throughout the year (Department of Communicable Disease Control 1955–2001). As seen in our study, ambient temperature, humidity, and rainfall patterns appear to

impact the abundance of *An. minimus*. As the mean air temperature decreased, a corresponding reduction in number of adult mosquitoes was observed.

In Ban Pu Teuy, *Anopheles minimus* A, C, and D are sympatric, with species C the most common species during preliminary sampling at our study site (Baimai 1989). Because of routine IRS using DDT, *An. minimus* populations have decreased dramatically along the peninsula and have almost disappeared from the central plains of Thailand (Nutsathapana et al. 1986). The species complex, however, remains abundant in the foothill and forest fringe areas. Explanations range from poor coverage by IRS to differences in adult vector behavior (greater exophagy) in areas in which IRS has been applied (Nutsathapana et al. 1986). It has been speculated that the feeding habits of *An. minimus* have changed to include a greater preference for host-seeking outdoors and feeding on domestic animals

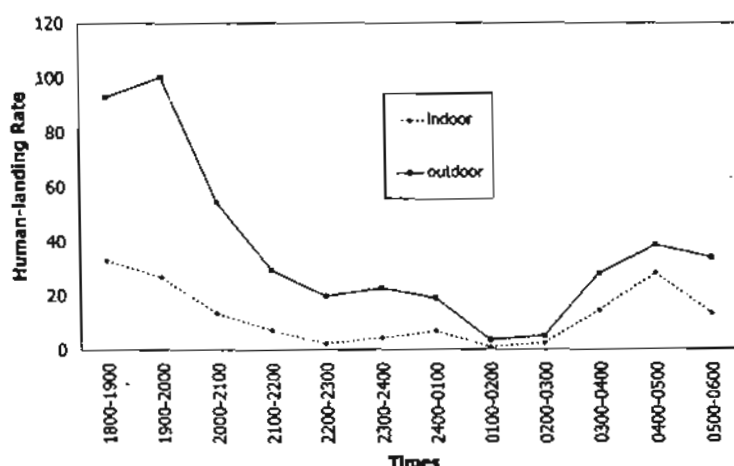


Fig. 3. Hourly indoor and outdoor human-landing frequency of *Anopheles minimus* over the 2-yr period.

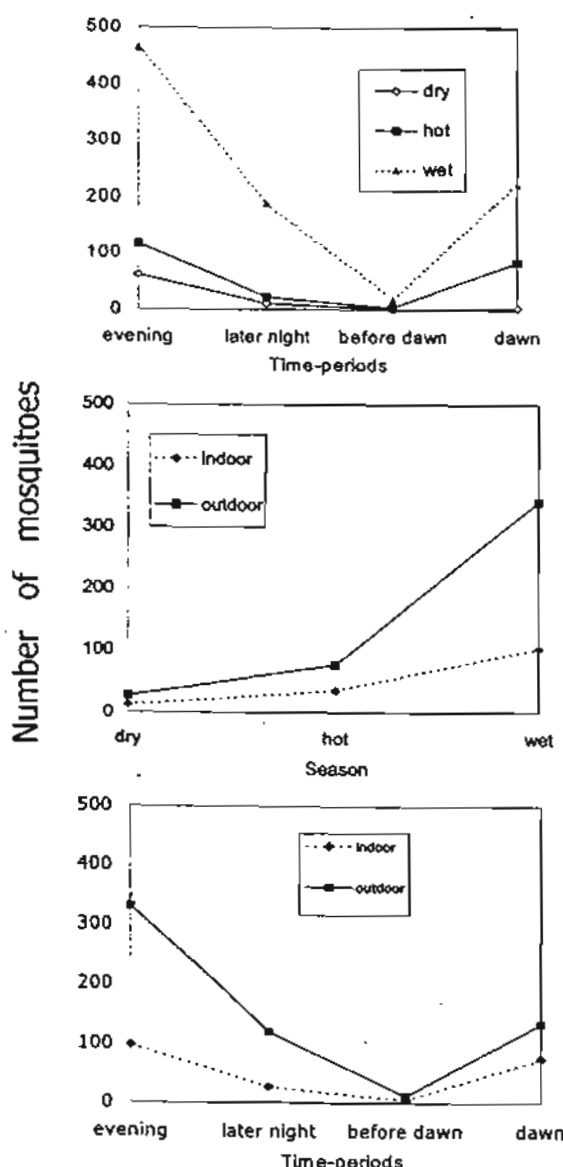


Fig. 4. Interaction of main factors between seasons and time periods, seasons and in-out doors, and in-out doors and time periods.

(Harrison 1980). Ismail et al. (1978) reported that the outdoor biting of *An. minimus* from Muallek District, Saraburi Province was 4.4–5.8 times greater than indoor biting in studies conducted in 1972–1974. The outdoor biting rate of *An. minimus* in Pakchong District, Nakhon Rachseema Province, was 2.5 times greater than the indoor biting rate (Ratanatham et al. 1988). In our study, outdoor biting was 2.8 and 2.1 times greater than indoor biting during the first and second year collections, respectively. Despite changing collection locations between the first and second years, exophagy was the predominant behavior. Mi-

crohabitats differed between the two collection sites in our study. In the first year, adult mosquito collections were made near the forest fringe, ~100 m from the stream, and were surrounded by dense vegetation and shrub trees. There was only one house in the area, which served as the collection point. The house was sprayed with DDT once each year until 2000. Because of conditions beyond our control, the second year collection was moved to the village area of Ban Pu Teuy, ~400 m from the first year collection site (Fig. 1). In the village, there were ~50 houses clustered in small groups of ~4–5 houses; most houses were sprayed with DDT once each year until 2000. Again, outdoor feeding activity was higher than indoor entering and feeding. The relative predominance of exophagic behavior by *An. minimus* could have been the result of the annual IRS activities, because of behavioral avoidance of sprayed structures by these vectors (Chareonviriyaphap et al. 2001).

The blood feeding activity of *An. minimus* has been reported in Thailand. In Mae Tha Waw Village, Tak Province, this species exhibited feeding activity throughout the night with peaks between 2100–2200 hours (Harbach et al. 1987). Ratanatham et al. (1988) reported two feeding peaks for *An. minimus* collected in Pakchong District, Nakhon Ratchasima Province; the first and largest peak occurring during early evening (1900–2200 hours), and a second much weaker morning peak occurring at dawn (~0500 hours). Rattanarithikul et al. (1996) also reported two outdoor feeding periods for *An. minimus* from southern Thailand, one beginning from 1800 to 2300 hours, and a second, more moderate, peak beginning at 0100 hours and declining throughout the second half of the night. In our study, feeding activity in Ban Pu Teuy differed from previously published observations. Two peaks of activity were seen in indoor and outdoor collections, regardless of season. The first peak was seen immediately after the sunset (1800–1900 hours) and the second peak was at dawn (0500 hours). However, the feeding pattern during the first half of the night was limited in duration (1800–1900 hours) compared with the broad time period (1800–2200 hours) of increased activity seen by Ratanatham et al. (1988). The biting peak in the second half of the night in our study occurred close to 0500 hours, whereas it was less distinct in the study of Ratanatham et al. (1988) with activity elevated between 0100–0500 hours, depending upon the season of the year. These marked differences in feeding patterns between studies may be the result of normal biological variability between populations of the same species or the result of adaptation or selection induced by focal extrinsic events. At Kanchanaburi Province, there are at least two different sibling species of *An. minimus*, species A and C. Therefore, it becomes important to determine the biting activity of different field populations and sibling species of *An. minimus* to provide site-specific activity patterns estimating the relative risk of malaria transmission.

Acknowledgments

We thank all students of Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University and entomological staff of Malaria Division, Ministry of Public Health, Nontaburi for their assistance in mosquito collections. Special thanks to Dr. P. Hsieh of Uniformed Services University of the Health Science for his valuable assistance and suggestions for data analysis. We gratefully thank the Thailand Research Fund (TRF), Center of Agricultural Biotechnology (CAB), and the Research and Development Institute (KURDI), Kasetsart University, Bangkok for the generous funding support.

References Cited

- Baimai, V. 1989. Speciation and species complexes of the *Anopheles* malaria vector in Thailand. Chiang Mai, Thailand. The Third Conference on Malaria Res., Thailand, 18–20 October 1989: 146–162.
- Baimai, V., U. Kijchalao, and R. Rattanarithikul. 1996. Metaphase karyotypes of *Anopheles* of Thailand and Southeast Asia: V. The *Myzomyia* series, subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). J. Am. Mosq. Cont. Assoc. 12: 97–105.
- Chareonviriyaphap, T., S. Ratanatham, and M. J. Bangs. 2000. Status of malaria in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth. 31: 225–237.
- Chareonviriyaphap, T., S. Sungvornyothin, S. Ratanatham, and A. Prabaripai. 2001. Insecticide-induced behavioral responses of *Anopheles minimus*, a malaria vector in Thailand. J. Amer. Mosq. Cont. Assoc. 17: 13–22.
- Department of Communicable Disease Control. 1985–2001. Annual Malaria Reports. Malaria Division, Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health, Nontaburi, Thailand.
- Green, C. A., R. F. Gass, E. Munstermann, and V. Baimai. 1990. Population genetic evidence for two species in *Anopheles minimus* in Thailand. Med. Vet. Entomol. 4: 25–34.
- Harbach, R. E., J. B. Gingrich, and W. P. Lorrin. 1987. Some entomological observations on malaria transmission in a remote village in Northwestern Thailand. J. Amer. Mosq. Cont. Assoc. 3: 296–301.
- Harrison, B. A. 1980. Medical entomology studies XIII. The *Myzomyia* Series of *Anopheles* (*Cellia*) in Thailand, with emphasis on intra-interspecific variations (Diptera: Culicidae). Contrib. Am. Entomol. Inst. (Ann Arbor) 17(4): 1–195.
- Ismail, I. A. H., S. Phinichpongse, and P. Boonrasri. 1978. Responses of *Anopheles minimus* to DDT residual spraying in a clear forested foothill area in central Thailand. Acta Trop. 35: 69.
- Kengne, P., H. D. Trung, V. Baimai, M. Coosemans, and S. Manguin. 2001. A multiplex PCR-based method derived from random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the identification of species of the *Anopheles minimus* group in Southeast Asia. Insect Mol. Biol. 10: 427–435.
- Nutsathapana, S., P. Sawadiwongphorn, U. Chitprarop, and J. R. Cullen. 1986. The behavioral of *Anopheles minimus* subjected to different levels of DDT selection pressure in Northern Thailand. Bull. Entomol. Res. 76: 313–320.
- Reid, J. A. 1968. *Anopheles* mosquitoes of Malaya and Borneo. Studies of the Institute for Medical Research, Malaysia, no. 31.
- Ratanatham, S., E. S. Upatham, C. Prasittisuk, W. Rojanasunanan, N. Theerasilp, A. Tremongkol, and V. Viyanant. 1988. Bionomics of *Anopheles minimus* and its role in malaria transmission in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth. 19: 283–289.
- Rattanarithikul, R., and P. Punthusiri. 1994. Illustrated keys to the medically important mosquitoes of Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth. 25 (Suppl): 1–66.
- Rattanarithikul, R., E. Konishi, and K. Linthicum. 1996. Observations on nocturnal biting activity and host preference of *Anophelinae* collected in southern Thailand. J. Amer. Mosq. Cont. Assoc. 12: 52–57.
- Sucharit, S., N. Komalamisra, S. Leemingsawat, C. Apiwathnasorn, and S. Thongrungrat. 1988. Population genetic studies on the *Anopheles minimus* complex in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth. 19: 717–723.
- Van Bortel, W., H. D. Trung, N. D. Manh, P. Roelants, P. Verle, and M. Coosemans. 1999. Identification of two species within the *Anopheles minimus* complex in northern Vietnam and their behavioural divergences. Trop. Med. Int. Health. Apr. 4: 257–65.

Received for publication 2 November 2002; accepted 3 May 2003.

EXCITO-REPELLENCY OF DELTAMETHRIN ON THE MALARIA VECTORS, *ANOPHELES MINIMUS*, *ANOPHELES DIRUS*, *ANOPHELES SWADIWONGPORNI*, AND *ANOPHELES MACULATUS*, IN THAILAND

THEERAPHAP CHAREONVIRIYAPHAP,¹ ATCHARIYA PRABARIPAI² AND MICHAEL J. BANGS³

ABSTRACT. This study compared the behavioral avoidance responses of 4 mosquito malaria vectors, *Anopheles minimus*, *Anopheles dirus*, *Anopheles maculatus* form B, and *Anopheles swadiwongporni*, to deltamethrin, the primary insecticide used for indoor residual spraying for malaria vector control in Thailand. Six test populations, representing 4 laboratory colonies and 2 wild-caught populations, were observed during and after exposure to deltamethrin at the operational dose (0.02 g active ingredient/m²) in excito-repellency escape chambers. The laboratory colonies included a deltamethrin-susceptible colony and a deltamethrin-resistant colony of *An. minimus* species A, 1 colony of *An. dirus* species B, and 1 colony of *An. maculatus* form B. The 2 wild-caught populations included *An. swadiwongporni* and members of the *An. dirus* complex. Times to escape by female mosquitoes during 30 min of exposure to deltamethrin-treated papers were observed in all populations and compared to nontreated paired controls in contact and noncontact test configurations. Strong behavioral avoidance was observed in the deltamethrin-resistant colony of *An. minimus*, followed by *An. swadiwongporni* and *An. maculatus*. The slowest escape response was observed in the colony of *An. dirus* species B. All 6 populations of *Anopheles* showed marked contact irritancy to deltamethrin compared to paired controls and noncontact repellency trials, in both controlled laboratory colonies and field-caught populations. The degree of repellency was less profound than irritancy but, in most cases, produced a significant escape response compared to paired controls. Avoidance behavior appears to be an innate behavior of mosquitoes, as indicated by the general avoidance response detected in all 4 species, regardless of deltamethrin susceptibility status, age, or nutritional and physiological status. Excito-repellency assays of the type described in this study should become an integral part of the overall assessment of an insecticide's ability to control disease transmission in any given area.

KEY WORDS. Behavioral avoidance, irritancy, repellency, deltamethrin, *Anopheles minimus*, *Anopheles maculatus*, *Anopheles dirus*, *Anopheles swadiwongporni*, Thailand

INTRODUCTION

In Thailand, malaria remains a major and re-emerging health problem (Charonviriyaphap et al. 2001). The primary vectors in Thailand include *Anopheles dirus* Peyton and Harrison, *Anopheles minimus* Theobald, *Anopheles maculatus* Theobald, and *Anopheles swadiwongporni* Rattanarithikul and Green, all members of the subgenus *Cellia*. Each species represents a member in broader species complexes, including *An. dirus*, *An. minimus*, and *An. maculatus* (which contains *An. swadiwongporni*), respectively (Rattanarithikul and Green 1986, Subbarao 1998). Many members within these species complexes exhibit both endophagous and exophagous behavioral patterns conducive for efficient malaria transmission (Pinichpongse and Bullner 1967, Suwonkerd et al. 1990, Charonviriyaphap et al. 2000). *Anopheles dirus* and *An. minimus* are members representing individual species complexes, of which the respective sibling species often are not distinguishable morphologically from one another (Baimai 1989, Rattanarithikul and Panthusiri 1994). *Anopheles maculatus* and *An. swa-*

diwongporni are morphologically distinct members in the *An. maculatus* group (Rattanarithikul and Green 1986). One of the principal methods of malaria abatement in Thailand has been use of various methods of vector control to reduce transmission risk. For many years, DDT was the chemical of choice and was used extensively in malaria-endemic areas. Because of reported adverse impact on the environment and general negative public attitudes, DDT use was gradually phased out between 1995 and 2000 for the control of malaria vectors in Thailand (Charonviriyaphap et al. 1999).

Deltamethrin, a common synthetic pyrethroid, is frequently and widely used for indoor residual spraying of house surfaces to control anopheline mosquitoes (Patipong 2000). This compound generally is applied in 1 or 2 spray rounds per year in malaria-endemic areas of Thailand (Ministry of Public Health 2000). The true mode of action of deltamethrin on the control of vectors and malaria is still open to investigation in terms of the relative importance of the lethal properties and behavioral responses of vector populations (Roberts et al. 2000). Because most pyrethroids demonstrate a significant and immediate excito-repellency action on exposed mosquitoes, the proposed wide-scale use of deltamethrin for malaria control in Thailand has stimulated the need for well-designed studies on the significance of pyrethroid avoidance behavior and its overall efficacy in reducing human-vector contact. Moreover, the respective roles of irritability and repellency of deltamethrin against the impor-

¹ Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Bangkok, 10900, Thailand.

² Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaengsean Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand.

³ U.S. Naval Medical Research Unit No. 2, Jl. Persekutuan Negara No. 29, Jakarta, Indonesia.

tant malaria vectors in Thailand merit careful investigation before launching programs that use this compound exclusively.

Two different types of behavioral avoidance responses by mosquitoes are recognized: irritancy and repellency (Rutledge et al. 1999, Roberts et al. 2000). Irritancy occurs when insects actually make physical contact with chemical residues before eliciting a stimulus-mediated response, whereas repellency is defined as a stimulus acting from a distinct distance from the insecticide-treated surface that deters insects from entering treated areas or otherwise disrupts normal patterns of behavior. Excito-repellency bioassays for describing and quantifying the irritant effects of insecticides on mosquitoes were developed beginning in 1963 and have been modified over the years (Rachou et al. 1963, Shalaby 1966, WHO 1970). Initial laboratory investigations on behavioral response of *Anopheles* to various insecticides were conducted by using the World Health Organization (WHO) excito-repellency test box design (Coluzzi 1963, Bondareva et al. 1986, Pell et al. 1989, Quinones and Suarez 1989, Ree and Loong 1989). Presently, no method for the assessment of mosquito behavioral responses has been universally endorsed as a standard for conducting excito-repellency testing, data analysis, and interpretation (Brown 1964, Roberts et al. 1984, Evans 1993, Rutledge et al. 1999, Roberts et al. 2000, Chareonviriyaphap et al. 2001). Recently, a controlled-design excito-repellency box was developed for testing both contact irritancy and noncontact repellency (Roberts et al. 1997, Chareonviriyaphap et al. 2001). This initial system has been modified further into a collapsible chamber designed for greater ease of use (Chareonviriyaphap et al. 2002). Described herein are the behavioral responses when using contact and noncontact assays and colonized *An. minimus* species A, *An. maculatus* form B, and *An. dirus* species B, and 2 field populations, 1 of *An. swadiwongporni* and the other of members of the *An. dirus* complex, against the standard field dosage of deltamethrin (0.02 g/m²).

MATERIALS AND METHODS

The irritability and repellency of deltamethrin were determined by observing the number of mosquitoes escaping from matched test and control chambers when using 4 species of *Anopheles* mosquitoes considered vectors of malaria in Thailand. Of the 6 different populations tested (Chareonviriyaphap, unpublished data), only 1 was considered to be resistant to residual deltamethrin based on the standard WHO contact bioassay (WHO 1975). All behavioral tests were conducted under near-identical laboratory-controlled conditions (temperature and humidity), between 0800 and 1630 h, at the Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Test populations: *Anopheles dirus* species B

(DISB) originally was collected from wild-animal footprints in Ban Paung District, Chantaburi Province, eastern Thailand, in 1987, and was maintained in insectary-controlled conditions at the Armed Forces Research Institute of Medical Science (AFRIMS), Bangkok, Thailand. The colony was obtained by the Malaria Division, Department of Communicable Disease Control (CDC), Ministry of Public Health, Nontaburi, Thailand, in 1995 and obtained in 1998 by the Department of Entomology, Kasetsart University, for the purposes of this study. This colony was found to be completely susceptible to deltamethrin at the field operational dosage of 0.02 g/m² when using the standard WHO contact bioassay and impregnated papers supplied by WHO. Susceptible *An. minimus* species A (MISA) originally was collected from animal quarters in Rong Klang District, Prachinburi Province, northern Thailand, in 1993 and maintained in insectary-controlled conditions at the CDC, Nontaburi, beginning in 1995. The colony was received from the CDC in 1998 and raised in the Department of Entomology, Kasetsart University. This colony was determined to be completely susceptible to the field dosage of deltamethrin. The origins and colonization of resistant *An. minimus* species A (MIRA) have been described in a previous study (Sungvornothrin et al. 2001). This colony exhibited between 50 and 60% resistance to deltamethrin at the operational dosage based on standard contact bioassay. *Anopheles maculatus* form B (MASB) was obtained from resting collections in animal quarters at Ban Khun Haay, Mae Sot District, in 1999. The colony was initially maintained at the Department of Entomology, AFRIMS, and was provided to the Department of Entomology, Kasetsart University, in February 2002. The colony was found to be completely susceptible to deltamethrin. *Anopheles swadiwongporni* (SASA) was collected by evening resting collections from animal quarters in Ban Pu Teuy, Tri Yok Noi, Kanchanaburi Province, during January and February 2001. The wild-caught females were determined to be completely susceptible to deltamethrin. *Anopheles dirus* complex (DISC) was obtained from human-landing collections in the foothill area of Ban Pu Teuy during January and February 2001. A determination of the ratio of *An. dirus* species A, B, C, and D in the collection was not made. The field-caught females were determined to be susceptible to deltamethrin.

Mosquito rearing: Mosquito colonies were reared by following the method of Chareonviriyaphap et al. (1997), with only minor modifications. Each colony was maintained in separated rooms within a common insectary under controlled conditions (25 ± 5°C; 80 ± 10% relative humidity) at the Department of Entomology, Kasetsart University. Adult insects were provided cotton pads soaked with 10% sugar solution from the day of emergence and were maintained in 12 × 12 × 12-in. screened cages. Female mosquitoes were per-

mitted to imbibe a blood meal from restrained laboratory hamsters on the 4th day after emergence. Depending on the mating requirements, some strains required forced copulation before oviposition. Approximately 2–3 days after bloodfeeding, oviposition dishes (moist filter paper in petri dishes) were placed in the cages with the gravid females. Larval stages were reared in enameled pans under identical physical and nutritional conditions throughout the study period.

Insecticide-impregnated papers: Only a single standard field dose of deltamethrin was used in this investigation, based on current malaria control policy in Thailand. The amount of active ingredient varied only slightly from the dosage (0.025 g/m²) generally recommended by WHO (WHO 1992). Test papers (27.5 × 35.5 cm²), impregnated with 0.02 g/m², were purchased from WHO, Vector Control Unit, Penang, Malaysia. All papers were treated at the rate of 2.75 ml of the insecticide solution per 180 cm² and used before their specified time of expiration.

Behavioral tests: Tests were conducted to compare the behavioral responses (irritancy and repellency) of *An. minimus* species A, *An. dirus* s.l. and species B, *An. maculatus* form B, and *An. swadlowpomi* to an operational dosage of deltamethrin applied to a paper surface. For all bioassays, slightly modified test chambers from those previously described were used in paired control and treatment trials (Chareonviriyaphap et al. 2002). Details of the chamber design and test methodology follow closely those of Sungvornyothin et al. (2001) and Roberts et al. (1997). For colonized populations, only unfed, nulliparous female specimens were used in excito-repellency tests, whereas field-collected mosquitoes represented a mix of different physiological and nutritional states. All tests were performed during the day (0800–1630 h) based on availability of mosquitoes.

Each test series consisted of 2 insecticide test chambers and 2 paired control boxes. Mosquitoes were maintained in holding cups approximately 2–3 h before testing. For a complete test, 25 mosquitoes, 3–5 days old, were carefully introduced into each of 4 chambers by using a mouth aspirator, after which the outer rear door was closed and secured. A receiving cage (6 × 6 × 6-cm paper box) was connected to the exit portal for collecting any escaped mosquitoes. Mosquitoes were allowed a 3-min resting period to permit adjustment to test chamber conditions, after which the escape funnel was opened to begin the observation period. Mosquitoes escaping from the chamber into the receiving cage were recorded at 1-min intervals for a period of 30 min.

All trials were replicated 3 or more times for each particular test combination. Immediately after 30 min of exposure, the number of dead specimens remaining inside the chamber and those that had escaped to the receiving cage were recorded for

treatment and control chambers. Additionally, all live specimens that had escaped or remained inside the chamber after 30 min were collected, provided sugar solution, and held in separate lots to record mortality during the 24-h postexposure period.

Data analysis: A survival analysis method described by Roberts et al. (1997) was used to analyze and interpret the behavioral response data (Chareonviriyaphap et al. 1997). The escape response data were subjected to Kaplan–Meier survival analysis as the preferred and most robust statistical treatment for excito-repellency data (Kleinbaum 1995). Unlike other methods of analysis that have attempted to quantitatively describe the behavioral responses (irritability) to insecticide deposits, the generation of survival curves minimizes the loss of useful information and allows an estimation of mosquito escape probability over time of exposure. A log-rank method (Mantel and Haenszel 1959) was used to compare patterns of escape behavior within and between different treatment groups and biological conditions.

RESULTS

Excito-repellency patterns of 4 important malaria vector species in Thailand exposed to field-rate deltamethrin (0.02 g/m²) were performed in contact and noncontact exposure chambers. Overall percentage and rate of escape response was found to be higher in contact trials compared to noncontact and control trials in all test populations (Table 1). Contact rate of escape patterns from treated chambers allowing physical contact with residual deltamethrin were significantly higher than those from paired controls, although escape rates varied by test populations (Figs. 1 and 2). For example, a rapid escape response during the 30-min exposure was observed in populations MIRA (100%), MASB (99%), MISA (96%), and SASA (90%), whereas a more subdued response 70 and 80% escape, respectively, was observed in DISB and DISC test populations. Comparatively low numbers of female mosquitoes (≤25%) departed from the control chambers, with the exception of the DISB control where almost 60% escaped during the test time (Fig. 2). Unusually high escape patterns in control tests occur from time to time for reasons that are unclear. Repeated trials under the same or nearly identical conditions normally see these high rates of escape among controls as an unexplained anomaly.

In the noncontact trials, marked escape responses were observed in MISA (75%), DISB (72%), and DISC (58%) test populations, compared to the MASB (33%), SASA (49%), and MIRA (50%) populations after 30 min of exposure (Figs. 1 and 2). In some cases, a higher percentage of mosquitoes escaped from the control chambers, as observed in DISB (62%), MISA (58%), and SASA (25%) test populations when compared to MIRA

Table 1. Summary of escape response and mortality of female *Anopheles* species exposed to deltamethrin at 0.02 g/m² in contact and noncontact trials.

Test ¹	No. observed			% mortality	
	Tested	Escaped	% escaped	Escaped ²	Not escaped ³
Contact					
DISB-C	200	114	57	6.1 (7/114)	0
DISB	200	140	70	1.4 (2/140)	96.7 (58/60)
MISA-C	100	21	21	0	0
MISA	100	98	98	3.1 (3/98)	100 (2/2)
MIRA-C	200	22	11	0	0
MIRA	200	200	100	2.0 (4/200)	0
MASB-C	75	10	13	0	0
MASB	75	74	99	0	100 (1/1)
SASA-C	200	50	25	0	0
SASA	200	180	90	0	100 (20/20)
DISC-C	200	8	4	0	0
DISC	200	160	80	3.1 (5/160)	100 (40/40)
Noncontact					
DISB-C	200	124	62	1.6 (2/124)	0.13 (1/76)
DISB	200	144	72	0	0.053 (3/56)
MISA-C	100	58	58	0	0
MISA	100	75	75	0	0
MIRA-C	200	28	14	0	0
MIRA	200	100	50	2.0 (2/100)	0.04 (4/100)
MASB-C	75	5	7	0	0
MASB	75	25	33	0	0
SASA-C	100	25	25	4.0 (1/25)	0
SASA	100	49	49	2.0 (1/49)	0
DISC-C	100	8	8	0	0
DISC	100	58	58	0	0

¹ DISB, *An. dirus* species B (laboratory population); MISA, *An. minimus* species A; MIRA, *An. minimus* species A; MASB, *An. maculatus* form B; SASA, *An. swadiwongporni*; DISC, *An. dirus* complex (field population); C, control test without insecticide.

² Dead/no. escaped given in parentheses.

³ Dead/no. remaining inside chamber given in parentheses.

(14%), MASB (7%), and DISC (8%) populations. As noted in other studies, the repellent effect on mosquito behavior is far less evident compared to the irritant effect caused by direct physical contact with an insecticide in the pyrethroid class or DDT.

Times of escape from treated and control chambers, measured in 1-min intervals, were defined as escape time (ET), in terms of the time elapsed for 50% (ET₅₀) and 75% (ET₇₅) of the test population to depart the exposure chamber from the single exit aperture (Table 2). Because contact tests showed a greater and more rapid response than noncontact trials, escape patterns reflected this in time of escape. In contact trials, all 6 populations had ET₅₀ values of between 2 and 9 min, and an ET₇₅ of ≤13 min (3–13 min) for 5 of the populations. As noted in the within and between population comparisons, DISB had the lowest percent escape and highest mortality in contact trials compared to the other populations. In the noncontact trial, the ET₅₀s for DISB, MISA, MIRA, and DISC are 7, 18, 5, and 12, respectively (Table 2). The ET₇₅ values for DISB could not be calculated. In noncontact trials, some ET₅₀ and ET₇₅ values for test populations could not be calculated for a 30-min exposure pe-

riod because a few specimens escaped from the exposure chamber.

Female mosquito mortality from different test populations after a 24-h postexposure holding period in all contact and noncontact treatment and control trials are provided in Table 1. In general, low percent mortality was observed in females from all test populations managing to escape in both contact (0–6.1%) and noncontact trials (0–4%). All females that remained inside the chambers after 30 min of exposure in contact trials had died within 24 h, whereas most noncontact test specimens survived with a low percent mortality (0.04–0.13%) after the 24-h holding period.

Within-population comparisons of escape responses between contact trials and paired controls, contact and noncontact trials, and noncontact and paired controls for the 6 test populations are shown in Table 3. Significant differences were observed in all combination comparisons except in DISB. This population showed no difference when comparing irritancy and repellency responses ($P = 0.962$) or any differences between noncontact and paired control designs ($P = 0.07$), indicating that this long-

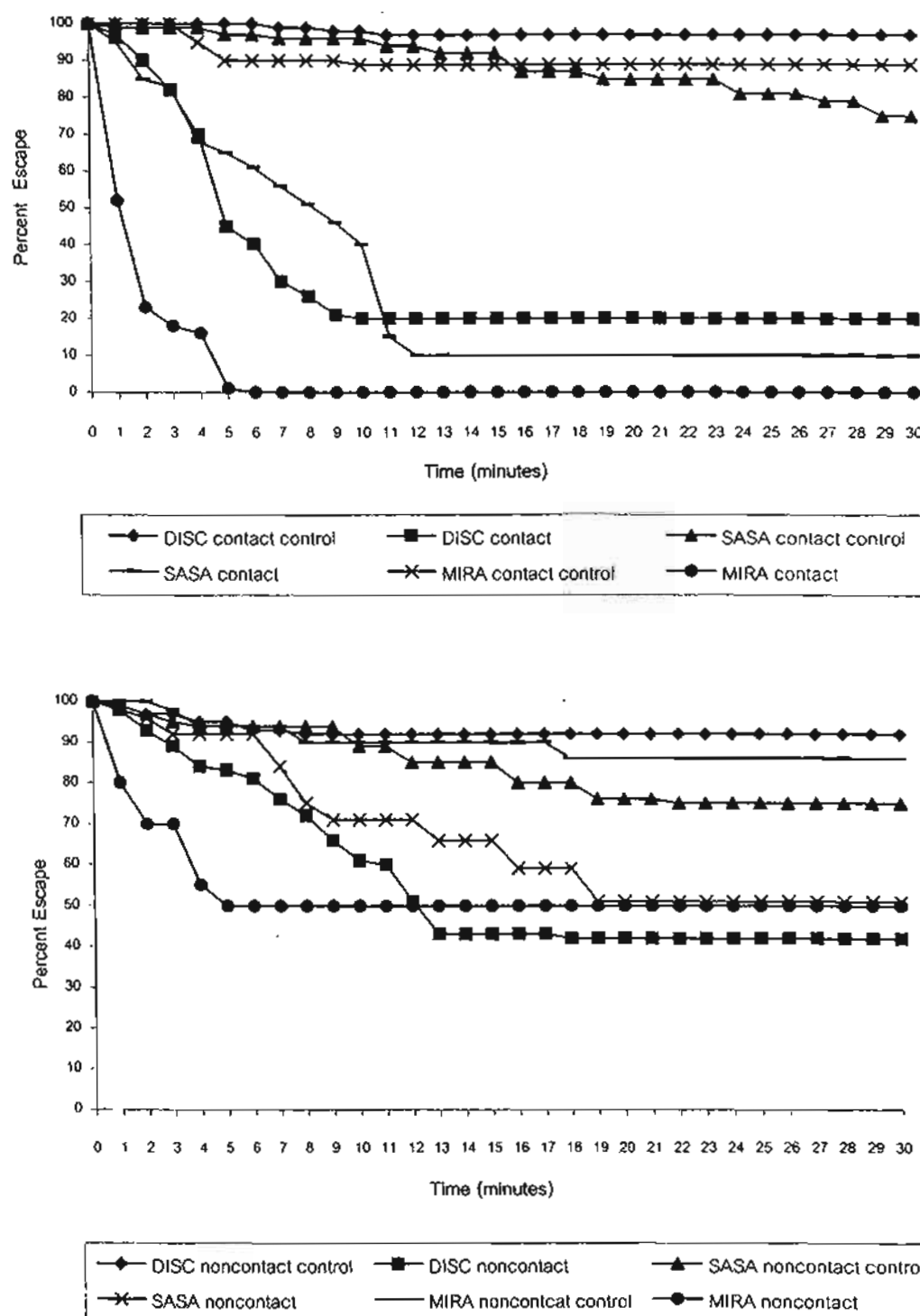


Fig. 1. Escape probability of *Anopheles dirus* complex (DISC), *An. swadiwongporni* (SASA), and resistant *An. minimus* species A (MIRA)-mosquito populations in contact and noncontact trials and respective paired controls when using deltamethrin at 0.02 g/m².

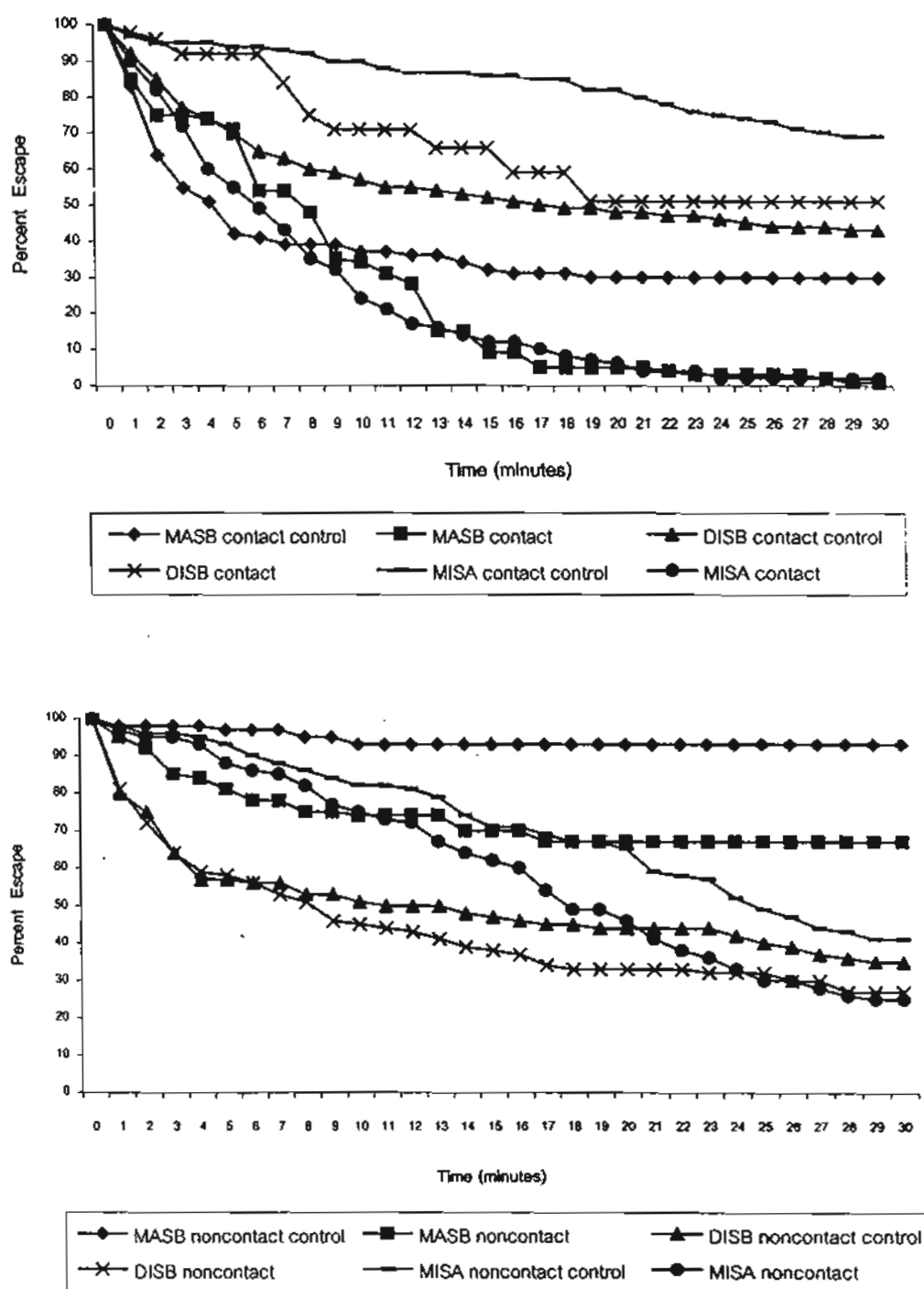


Fig. 2. Escape probability of *Anopheles dirus* species B (DISB), susceptible *Anopheles minimus* species A (MISA), and *Anopheles maculatus* form B (MASB) mosquito populations in contact and noncontact trials and respective paired controls when using deltamethrin at 0.02 g/m³.

Table 2. Escape time in minutes for 50% (ET₅₀) and 75% (ET₇₅) of female *Anopheles* species to escape from exposure chambers treated with deltamethrin.¹

Test	DISB		MISA		MIRA		SASA		MASB		DISC	
	ET ₅₀	ET ₇₅	ET ₅₀	ET ₇₅	ET ₅₀	ET ₇₅	ET ₅₀	ET ₇₅	ET ₅₀	ET ₇₅	ET ₅₀	ET ₇₅
Contact	5	—	6	10	2	3	9	11	9	13	5	9
Noncontact	7	—	18	—	5	—	—	—	—	—	12	—

¹ DISB, *An. dirus* species B (laboratory population); MISA, *An. minimus* species A; MIRA, *An. minimus* species A; MASB, *An. maculatus* form B; SASA, *An. swadiwongporni*; DISC, *An. dirus* complex (field population). A dash indicates that too few specimens escaped from exposure chambers to allow calculation of an ET₅₀ or ET₇₅.

standing laboratory colony showed no marked repellent response to deltamethrin.

Multiple comparisons of escape patterns (rate of escape) between the 6 test populations of female *Anopheles* in contact and noncontact trials were analyzed with the log-rank method at the 0.05 level of probability (Table 4). In contact trials, significant differences were found in all cases, except for DISB vs. SASA, DISB vs. DISC, and MISA vs. DISC population comparisons. For noncontact trials, only 2 paired population comparisons failed to show a significant difference (MIRA vs. MASB and MASB vs. SASA). In this study, only *An. minimus* (MIRA) was found to be physiologically resistant to deltamethrin and significant differences were found in escape responses between MIRA and the 5 deltamethrin-susceptible populations in contact tests.

DISCUSSION

The mathematical framework for understanding the repellent, irritant, and toxic properties of insecticides on mosquitoes and how they function in control of malaria has been proposed by Roberts et al. (2000). This work, along with other related stud-

ies, has clearly suggested that the excito-repellent and toxicological actions must be accurately assessed by using different vectors and chemical insecticides throughout malaria-endemic areas (Charoenviriyaphap et al. 2001, Sungvornyothin et al. 2001). This study observed the behavioral responses of 4 important malaria vectors from Thailand to the standard operational field dose of residual deltamethrin, the currently approved indoor residual insecticide for malaria control in Thailand. These results contribute to the ongoing work to optimize and standardize an excito-repellency test system that is deemed an essential component for assessing public health insecticides and their mode of action in disease vector and transmission control. We also compared the behavioral responses between a deltamethrin-susceptible and deltamethrin-resistant laboratory population of *An. minimus* species A.

Significant avoidance responses were observed in contact trials, compared to noncontact and control trials, and significant differences in escape responses were documented between noncontact trials and contemporaneous paired controls. The most dramatic behavioral avoidance response after phys-

Table 4. Comparison of escape patterns between test populations of female *Anopheles* in contact and noncontact trials with deltamethrin.¹

Test population comparisons	Contact trial (P)	Noncontact trial (P)
DISB vs. MISA	0.0001	0.0001
DISB vs. MIRA	0.0001	0.0004
DISB vs. MASB	0.0001	0.0001
DISB vs. SASA	NS	0.0001
DISB vs. DISC	NS	0.0009
MISA vs. MIRA	0.0001	0.0001
MISA vs. MASB	0.0001	0.0121
MISA vs. SASA	0.0469	0.0032
MISA vs. DISC	NS	0.0001
MIRA vs. MASB	0.0020	NS
MIRA vs. SASA	0.0001	0.0287
MIRA vs. DISC	0.0001	0.0001
MASB vs. SASA	0.0001	NS
MASB vs. DISC	0.0001	0.0001

Table 3. Within-population comparison of escape response between paired control and contact trials, contact and noncontact trials, and paired noncontact and control trials for 6 test populations of female *Anopheles* against deltamethrin at the field rate of 0.02 g/m².¹

No replicates	Test population	Control vs. contact (P)	Contact vs. noncontact (P)	Noncontact vs. control (P)
8/8	DISB	0.0120	NS	NS
4/4	MISA	0.0001	0.0001	0.0080
8/8	MIRA	0.0001	0.0001	0.0001
3/3	MASB	0.0001	0.0001	0.0001
8/4	SASA	0.0001	0.0001	0.0010
8/4	DISC	0.0001	0.0001	0.0001

¹ DISB, *An. dirus* species B (laboratory population); MISA, *An. minimus* species A; MIRA, *An. minimus* species A; MASB, *An. maculatus* form B; SASA, *An. swadiwongporni*; DISC, *An. dirus* complex (field population); P < 0.05 indicates log-rank tests with significant differences in avoidance behavior patterns; NS = P > 0.05.

¹ DISB, *An. dirus* species B (laboratory population); MISA, *An. minimus* species A; MIRA, *An. minimus* species A; MASB, *An. maculatus* form B; SASA, *An. swadiwongporni*; DISC, *An. dirus* complex (field population); P < 0.05 indicates log-rank tests with significant differences in avoidance behavior patterns; NS = P > 0.05.

ical contact with deltamethrin was observed in MIRA, followed by MASH, and SASA test populations. A colonized population DISB demonstrated the weakest responses to deltamethrin. Noncontact repellency was detected at significant levels compared to paired controls, except in the DISB colony. Strong repellency was observed in MIRA and DISC, with more than 50% of the test population escaping from the test chambers within 30 min. Repellency was less pronounced in MASH, SASA, and MISA but remained significant compared to the controls. These observations on repellency action are in agreement with the results from previous studies (Chareonviriyaphap et al. 1997, 2000; Sungvornyothin et al. 2001), which reported an intermediate avoidance response compared to irritancy, yet significant overall repellency effects of deltamethrin to *Anopheles albimanus* Wiedemann from Central America and *An. minimus* from Thailand, respectively. Mortality was low in mosquitoes escaping the treated chambers in contact and noncontact trials, an indication that behavioral avoidance greatly reduces the opportunity for residual insecticides to impact survival through toxicity.

Of the mosquitoes under study, DISB produced higher numbers of escaped mosquitoes from the control chambers compared to the other 5 test populations. The reason for this is unclear. Because this colony has been maintained in the laboratory for more than 16 years, it may have lost some ability to respond normally to insecticides. A similar phenomenon was observed in the 20-year-old colony of *An. albimanus* from the Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR). The WRAIR colony showed virtually no response to all chemicals tested, and all mosquitoes that remained in the treated test chamber did not survive past the 24-h postexposure holding period (Chareonviriyaphap et al. 1997). The poorer escape response compared to the other populations appears to be colony-related, because DISB has been continuously maintained under artificial conditions in the laboratory for nearly 2 decades before this study. Long-term colonization possibly has unintended effects on normal behavioral patterns in mosquitoes, although this would not appear to be the case with *An. dirus* when comparing contact escape responses between colony and field populations ($P = 0.56$).

Irritancy, a result of physical contact with insecticide-treated surfaces, by mosquitoes were recognized even before the early stages of broad-scale use of insecticides to control vector mosquitoes (Kennedy 1946). Subsequent observations indicated that some insecticides also could induce a repellent effect, without actual physical contact with a treated surface. Repellency effects to insecticides used in malaria control have been reported in several anopheline species (Roberts and Alecrim 1991, Roberts et al. 1997, Chareonviriyaphap et al. 1997). One of the 1st species of mosquitoes to demonstrate a repellent effect, *Anopheles culicifacies* Giles from

India, provided further evidence of noncontact repellency in mosquito vectors, a phenomenon that has been long been ignored or discounted as important in malaria control. One of the reasons for the poor understanding of avoidance behavior in mosquitoes was the lack of an adequate test system to measure both irritancy and noncontact repellency, which eventually was satisfied by Roberts et al. (1997) with the development of a true excito-repellency test system. When properly configured, this test system allows observations that distinguish irritancy and repellency, and was 1st used to measure behavioral responses of *An. albimanus* to DDT and some pyrethroids under laboratory and natural field conditions (Chareonviriyaphap et al. 1997). Subsequently, improved excito-repellency escape chambers have been developed that provide information on both irritant and repellent responses (Chareonviriyaphap and Aum-Aung 2000; Chareonviriyaphap et al. 2002). Improved test systems have been used to quantify the insecticide-induced behavioral responses of wild-caught *An. minimus* in Thailand (Chareonviriyaphap et al. 2001).

Our findings on behavioral responses of malaria vectors to insecticides are similar to those of previous studies (Ree and Loong 1989; Evans 1993; Chareonviriyaphap et al. 1997, 2001; Bangs 1999). The behavioral responses to deltamethrin by female mosquitoes from different test populations varied depending on innate characteristics of each test population. Although the nutritional and physiological status of laboratory mosquitoes was carefully controlled, field-caught mosquitoes were naturally heterogeneous in age and nutritional status. Because avoidance behavior is significantly influenced by the nutritional and physiological condition of the mosquito, the interpretation of avoidance responses to insecticides derived from field populations should be interpreted with caution (Sungvornyothin et al. 2001).

Pyrethroid-class insecticides have long been known to elicit excito-repellent responses in insects (Threlkeld 1985). The combined effects of irritancy and repellency produced in the presence of an insecticide can have a dramatic impact on the effectiveness of chemical control of mosquito vectors, thus profoundly impacting the local transmission of disease. Behavioral avoidance of treated surfaces, especially irritancy, generally prevents sufficient contact with a residual insecticide, thus greatly reducing the risk of premature mortality in blood-seeking anophelines. However, a reduction in the toxic effects of a chemical may not necessarily equate to an increase in risk of human-vector contact inside houses (Roberts et al. 2000). We believe a convincing argument exists that the consequence of the combined effect of repellency and irritancy in reducing house-entering mosquito densities and interrupting patterns of bloodfeeding behavior exerts a profound influence on transmission, likely overriding the influence of contact toxicity. The im-

plications of these and other findings that describe the dramatic display of mosquito avoidance of insecticide-treated surfaces (wall surfaces and impregnated bed-nets) warrant continued study. We believe excito-repellency assays of the type described in this study should become an integral part of the overall assessment of an insecticide's ability to control disease transmission.

In conclusion, deltamethrin exerted remarkable excito-repellency in 4 species of *Anopheles*, all of which are regarded as important vectors of malaria in Thailand. All 6 populations showed vigorous contact irritancy to the operational dosage of deltamethrin compared to paired controls and noncontact repellency trials, in both controlled laboratory colonies and field-caught populations, regardless of nutritional and physiological status of the test populations. However, the degree of repellency was less profound than that of irritancy, and in most cases produced a significant avoidance response compared to paired controls. The differences in escape responses between the long-standing colony of *An. dirus* and the other species tested appear to be a consequence of prolonged colonization and isolation from varying natural stimuli. Additional efforts are currently underway to promote development of standardized excito-repellency response tests.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of the Malaria Division, CDC, Ministry of Public Health, for providing the colonies of *An. minimus* and *An. dirus*. Special thanks are extended to the Department of Entomology, AFRIMS, for kindly providing *An. maculatus* form B. We are grateful to all anonymous reviewers for comments and suggestions on this manuscript. This project was funded by the Thailand Research Fund, Kasetsart University Research and Development Institute, and Center of Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

REFERENCES CITED

- Baimai V. 1989. Speciation and species complexes of the *Anopheles* malaria vector in Thailand. In: Proceedings of The Third Conference on Malaria Research, Thailand, 1989 October 18-20; Chiang Mai, Thailand. Bangkok, Thailand: Malaria Division. p 146-162.
- Bangs MJ. 1999. The susceptibility and behavioral response of *Anopheles albimanus* Weidemann and *Anopheles vestitipennis* Dyar and Knab (Diptera: Culicidae) to insecticides in northern Belize, Central America. Ph.D. dissertation. Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD.
- Bondareva NL, Artem'ev MM, Gracheva GV. 1986. Susceptibility and irritability caused by insecticides to malaria mosquitoes in the USSR. Part 1. *Anopheles pulcherrimus*. *Med Parazitol Parazit Bozest* 6:52-55.
- Brown AWA. 1964. Experimental observations governing the choice of test method for determining the DDT-irritability of adult mosquitoes. *Bull WHO* 30:97-111.
- Chareonviriyaphap T, Aum-Aung B. 2000. Improved excito-repellency escape chamber for behavioral tests on mosquitoes. *Mekong Malaria Forum* 5:82-86.
- Chareonviriyaphap T, Aum-Aung B, Ratanatham S. 1999. Current insecticide resistance patterns in mosquito vectors in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30:184-194.
- Chareonviriyaphap T, Bangs MJ, Ratanatham S. 2000. Status of malaria in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 31:225-237.
- Chareonviriyaphap T, Prabaripai A, Sungvornyothin S. 2002. An improved excito repellency for mosquito behavioral test. *J Vector Ecol* 27:250-252.
- Chareonviriyaphap T, Roberts DR, Andre RG, Harlan H, Bangs MJ. 1997. Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus* Wiedemann, a malaria vector in the Americas. *J Am Mosq Control Assoc* 13:171-183.
- Chareonviriyaphap T, Sungvornyothin S, Ratanatham S, Prabaripai A. 2001. Pesticide-induced behavioral responses of *Anopheles minimus*, a malaria vector in Thailand. *J Am Mosq Control Assoc* 17:13-22.
- Coluzzi M. 1963. Studies on irritability of DDT to anopheline mosquitoes. *WHO Vector Control* 33:1-22.
- Evans RG. 1993. Laboratory evaluation of the irritancy of bendiocarb, lambda-cyhalothrin, and DDT to *Anopheles gambiae*. *J Am Mosq Control Assoc* 9:285-293.
- Kennedy JS. 1946. The excitant and repellent effects on mosquitos of sublethal contacts with DDT. *Bull Entomol Res* 37:593-607.
- Kleinbaum DG. 1995. *Survival analysis*. New York: Springer-Verlag.
- Mantel N, Haenzel W. 1959. Statistic aspects of the analysis of data from retrospective studies of diseases. *J Natl Cancer Inst* 22:719-748.
- Ministry of Public Health. 2000. *Annual malaria report 2000*. Available from Malaria Division, Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health, Nontaburee, Thailand. 186 p.
- Patipong S. 2000. Protecting against mosquito bites. *Mekong Malaria Forum* 5:86-88.
- Pell JK, Spinney MA, Ward KJ. 1989. Observations on the behavior of adult *Anopheles gambiae* encountering residual deposits of lambda-cyhalothrin compared with the other major classes. In: Fourth Annual Conference of the Society for Vector Ecology European Region. p 1-18.
- Pinichpongse S, Bullner GR. 1967. The current status of malaria entomology in Thailand. *Warasan Malar* 11: 43.
- Quinones ML, Suarez MF. 1989. Irritability to DDT of natural populations of the primary malaria vectors in Colombia. *J Am Mosq Control Assoc* 5:56-59.
- Rachou RG, Moura LM, Duret JP, Kerr JR. 1963. Experiences with the excito-repellency test box—model OPS. In: Proceedings of the 50th Annual Meeting of the New Jersey Mosquito Exterminators Association and the 19th Annual Meeting of the American Mosquito Control Association. p 442-447.
- Rattananarithkul R, Green CA. 1986. Formal recognition of the species of the *Anopheles maculatus* group (Diptera: Culicidae) occurring in Thailand, including the description of two new species and a preliminary key to females. *Mosq Syst* 18:246-278.
- Rattananarithkul R, Panthusiri P. 1994. Illustrated keys to the medically important mosquitoes of Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 25:60-183.
- Ree HI, Loong KP. 1989. Irritability of *Anopheles farauti*,

- Anopheles maculatus*, and *Culex quinquefasciatus* to permethrin. *Jpn J Sanit Zool* 40:47-51.
- Roberts DR, Alecrim WD. 1991. Behavioral response of *Anopheles darlingi* to DDT sprayed house walls in Amazonia. *PAHO Bull* 25:210-217.
- Roberts DR, Alecrim WD, Tavares AM, McNeill KM. 1984. Influence of physiological condition on the behavioral response of *Anopheles darlingi* to DDT. *Mosq News* 4:357-361.
- Roberts DR, Chareonviriyaphap T, Harlan HH, Hsieh P. 1997. Methods for testing and analyzing excito-repelling responses of malaria vectors to insecticides. *J Am Mosq Control Assoc* 13:13-17.
- Roberts DR, Alecrim WD, Hsieh P, Grieco J, Bangs M, Andre RG, Chareonviriyaphap T. 2000. A probability model of vector behavior: effects of DDT repellency, irritability, and toxicity in malaria control. *J Vector Ecol* 25:48-61.
- Rutledge LC, Echana NM, Gupta RK. 1999. Responses of male and female mosquitoes to repellents in the World Health Organization insecticide irritability test system. *J Am Mosq Control Assoc* 15:60-64.
- Shalaby AM. 1966. Observations on some responses of *Anopheles culicifacies* to DDT in experimental huts in Gujarat State, India. *Ann Entomol Soc Am* 59:938-944.
- Subbarao SK. 1998. *Anopheline species complexes in South-East Asia* Technical Publication, Southeast Asia Regional Office 18. p 82. Available from the World Health Organization, New Delhi, India.
- Sungvornyothin S, Chareonviriyaphap T, Prabaripai A, Trirakhuat T, Ratanatham S, Bangs MJ. 2001. Effects of nutritional and physiological status on behavioral avoidance of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) to DDT, deltamethrin and lambda-cyhalothrin. *J Vector Ecol* 26:202-215.
- Suwonkerd W, Aum-Aong B, Rimwangtrakul K, Wongkattiyakul S, Kattiyamongkool B, Chiraprap U, Takagi M. 1990. A field study on response of *Anopheles dirus* to DDT and fenitrothion sprayed to huts in Phetchabun Province, Thailand. *Trop Med (Nagasaki)* 32:1-5.
- Threlkeld SFH. 1985. Behavioral responses in *Drosophila melanogaster* associated with permethrin and ectiban. In: Proceedings of the 32nd Annual Meeting, Canadian Pest Management Society. 1985 June 24-26; Charlottetown, Prince Edward Island, Canada.
- WHO [World Health Organization]. 1970. Insecticide resistance and vector control (17th report of the WHO Expert Committee on Insecticides). Instructions for determining the irritability of adult mosquitoes to insecticide. *WHO Tech Rep Ser* 433:158-163.
- WHO [World Health Organization]. 1975. Manual on practical entomology in malaria. Part II. Methods and techniques. *WHO Offset Publ* 13:1-191.
- WHO [World Health Organization]. 1992. Vector resistance to pesticides. *WHO Tech Rep Ser* 818. p. 2-50.

VECTOR CONTROL, PEST MANAGEMENT, RESISTANCE, REPELLENTS

Behavioral Responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Exposed to Deltamethrin and Possible Implications for Disease ControlMONTHATHIP KONGMEE,¹ ATCHARIYA PRABARIPAI,² PONGTHEP ARKARATANAKUL,^{1,3} MICHAEL J. BANGS,⁴ AND THEERAPHAP CHAREONVIRIYAPHAP¹

J. Med. Entomol. 41(6): 000-000 (2004)

ABSTRACT Behavioral responses of nine *Aedes aegypti* (L.) strains, six from recent field collections and three from the long-established laboratory colonies, were tested under laboratory-controlled conditions by using an excito-repellency test system. All nine strains showed significant behavioral escape responses when exposed to deltamethrin at the standard field dose (0.02 g/m²), regardless of background insecticide susceptibility status (susceptible or tolerant/resistant). Insecticide contact irritancy played a predominant role in overall female mosquito escape responses, whereas noncontact repellency was not observed at levels significantly different from paired noncontact control tests ($P > 0.01$). Among the six field populations, the Jakarta (Indonesia) Toba (north Sumatra), and Bangkok female mosquitoes showed rapid exit (>78%) during 30 min of direct contact with insecticide-treated surfaces, whereas the other three strains demonstrated only moderate escape responses (32-56%) from the chambers. Moderate escape responses during direct insecticidal contact also were observed in the three laboratory test populations (44-60%). Higher percentage of mortality was observed from laboratory strains (8-33%) that failed to escape compared with nonescape females of field strains (2-16%), possibly a reflection of background deltamethrin susceptibility status. We conclude that contact irritancy is a major behavioral response of *Ae. aegypti* when exposed directly to deltamethrin and that rapid flight escape from areas exposed to space sprays or surfaces treated with residual pyrethroids could have a significant impact on the effectiveness of adult mosquito control and disease transmission reduction measures.

KEY WORDS *Aedes aegypti*, behavioral avoidance, excito-repellency, deltamethrin

BILLIONS OF PEOPLE, ESPECIALLY in the tropical and subtropical world, are at risk of infection for dengue fever and dengue hemorrhagic fever. Annually, 50-100 million people are estimated as being infected with dengue viruses worldwide (Gubler 1997). The viruses responsible for dengue disease in humans are transmitted primarily by *Aedes aegypti* (L.), a notoriously efficient vector mosquito that often resides in and near human dwellings and preferentially feeds on humans (Gubler 1997). Despite research progress, a completely effective and commercially available dengue vaccine is not yet available. Prevention of this disease remains almost entirely dependent on using vector control, most methods of which remain the most effective means of reducing virus transmission potential in the usually densely populated and impoverished regions of the world (Reiter and Gubler 1997, WHO 1999). Unfortunately, *Ae. aegypti* has proven tremen-

dously difficult to control because of its close association and exploitation of domestic and peridomestic human environments. The most effective proven methods for disease prevention has been by vector reduction, either through larval habitat elimination ("source reduction"), or control of habitats, often using more expensive (and less efficient) approaches for mosquito vector control by various chemical or biological means.

Although some populations of *Ae. aegypti* have been found physiologically resistant to a wide range of insecticides (Brown and Pal 1971, WHO 1992), the true impact of resistance on adult and larval vector control has been circumstantial. In addition to toxicity, many synthetic pyrethroids have inherent properties that irritate (excite) and/or repel insects (Threlkeld 1985). Dating back >25 yr, reports have documented the excito-repellency properties of deltamethrin on mosquitoes, mainly examining behavioral responses of *Anopheles* species (Coosemans and Sales 1977, Pell et al. 1989, Roberts et al. 2000, Chareonviriyaphap et al. 2001). Relatively little has been published on the avoidance behavior of *Ae. aegypti* exposed to any insecticide (Kennedy 1947, Lal et al. 1965, Hadaway et al. 1970, Moore 1977).

¹ Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand.

² Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Nakhonpathom, 73140 Thailand.

³ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Bangkok, 10900 Thailand.

⁴ U.S. Naval Medical Research Unit No. 2, Jl. Percetakan Negara No. 29, Jakarta, 10560, Indonesia.

The majority of insecticide studies have concentrated on the direct toxicological effects of chemicals on mosquitoes, whereas little focus has been placed on the behavioral response and outcome to exposure. Many insecticides are locomotor stimulants, causing profound excitation and premature movement of insects away from sprayed surfaces, a kinetic mechanism resulting in "avoidance." In general, behavioral responses by insects to insecticides can be classified into two categories: irritability and repellency (Davidson 1953; Lockwood et al. 1984; Roberts and Andre 1994; Chareonviriyaphap et al. 1997, 2001; Rutledge et al. 1999). Irritability is defined as insects leaving an insecticide-treated surface after physical (tarsal) contact with the residual chemical, whereas repellency is strictly a function of an insecticide to act from a distance (area effect), diverting insects away from treated surfaces without actual physical contact with the chemical (Roberts et al. 1997).

Several insecticides that have long been used in public health control programs have been shown to exert behavioral responses by mosquitoes and other insects, most notably DDT and the synthetic pyrethroids (Kennedy 1947; Roberts and Alecrim 1991; Chareonviriyaphap et al. 1997, 2001, 2004). Deltamethrin is currently one of the most commonly used insecticides in public health programs and has been the mainstay for the emergency control of *Ae. aegypti* adults in Thailand since 1994. Deltamethrin formulations are also commercially available to the general public for use in homes for protection against indoor biting mosquitoes and other arthropod pests. Given its common usage, it is important to investigate how deltamethrin might influence *Ae. aegypti* behaviorally; an understanding that could dramatically impact the success of a vector control program.

Behavioral responses can be objectively and quantitatively assessed by using an excito-repellency test system (Roberts et al. 1997). The World Health Organization (WHO) first developed a behavioral test system attempting to access the behavioral responses of mosquitoes to insecticides (WHO 1970) and was later referred to as an "excito-repellency" box (Rachou et al. 1963). The test system was further modified to evaluate the behavioral responses of several mosquito species to DDT and some of the prototypic synthetic pyrethroids (Bondareva et al. 1986; Quinones and Suarez 1989; Ree and Loong 1989; Evans 1993). Up to that time, however, no test system had been specifically designed to accurately discriminate between contact (irritancy) and noncontact (repellency) behavioral responses. In 1997, an improved test system was developed to distinguish between these two distinct types of behavioral responses, irritancy and repellency, and tested using *Anopheles albimanus* (Chareonviriyaphap et al. 1997; Roberts et al. 1997). Subsequently, a more field-friendly test system that was more both easily transportable and set up was designed (Chareonviriyaphap et al. 2002). With this improved test chamber system, assays can better demonstrate the innate avoidance response of mosquitoes

exposed to environmental conditions with varying doses of residual insecticides.

There is a lack of information about how *Ae. aegypti* responds after contact with potentially toxic chemicals. We investigated the active properties (toxic and nontoxic) of deltamethrin, one of the more commonly used insecticides for dengue vector control in Asia, by using nine *Ae. aegypti* test populations. Irritancy and repellency responses were quantitatively assessed using the improved excito-repellency test system.

Materials and Methods

Mosquito Strains. Nine populations of *Ae. aegypti* were used to evaluate excito-repellency responses. All mosquitoes were reared at the Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Thailand until testing.

1. *Bangkok* strain was collected in January 2003 as larvae from indoor habitats in Bangkean (13° 51' 4.8" N, 100° 34' 7.3" E), an urban area of Bangkok.
2. *Pathumthani* strain was obtained in November 2002 as larvae from outdoor container habitats in Lad Luangkaew District (13° 57' 23" N, 100° 24' 28" E), Pathumthani Province, east of Bangkok in November 2002.
3. *Nonthaburi* strain was obtained in February 2003 as larvae from outdoor container habitats in Bang Yai District (13° 54' 42.8" N, 100° 26' 58" E), Nonthaburi Province, an area west of Bangkok.
4. *Jakarta* strain was collected as larvae from an urban area in west Jakarta (06° 11' 27" S, 106° 51' 30" E), Java, Indonesia. The colony was obtained from the U.S. Naval Medical Research Unit No. 2 (NAMRU-2), Jakarta as F1 eggs.
5. *Cepu* strain was collected as larvae from an urban area located in eastern Java (07° 11' 29" S, 111° 42' 57" E), Indonesia. The colony was obtained from NAMRU2 in July 2003 as F1 eggs.
6. *Toba* strain was collected as larvae from a rural village area of north Sumatra (02° 33' 15" S, 98° 43' 34" E), Indonesia on Sinosir Island located on Lake Toba. The colony was obtained from NAMRU-2 in July 2003 as F1 eggs.
7. *Bora Bora* strain from the Society Islands (French Polynesia) was obtained from the Institute of Research and Development (IRD), France. It had been maintained in an insectary for >25 yr before obtaining eggs.
8. *CDC (Thailand)* strain was originally collected as larvae from Ayutthaya Province, Central Thailand, and continuously maintained in the laboratory for nearly 10 yr at the Malaria Division, Center for Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand. Colony material was provided in June 2003.
9. *AFRIMS* strain was originally collected as larvae from urban Bangkok in 1987 and continuously maintained at the U.S. Armed Forces Research Institute and Medical Sciences (AFRIMS), Bangkok, Thailand. Colony material was provided in June 2003.

Witel

Insecticide-Impregnated Papers. A single standard field dose of deltamethrin (0.02 g/m^2), impregnated onto test papers measuring 27.5 by 35.5 cm, were obtained from the WHO Collaborating Center, Vector Control Unit, Penang, Malaysia. All papers were treated at the rate of 2.75 ml of the insecticide solution per 180 cm^2 and used before their specified expiration date.

Insecticide Susceptibility Tests. The susceptibility of each population to deltamethrin was assessed by exposing unfed, 3–5-d-old female mosquitoes to a single diagnostic dose (0.05%) on insecticide-treated test papers, as recommended by World Health Organization and following standard testing procedures (WHO 1996). After 60-min exposure, test and control mosquitoes were transferred to separate clean holding containers and mortality recorded after 24-h postexposure. The test was repeated three times and an average susceptibility level was derived for each strain. Based on percentage of mortality in each population, mosquito survival was indicative of the degree of physiological resistance.

Behavioral Avoidance Tests. Tests were carried out to compare the behavioral responses of nine strains of *Ae. aegypti* exposed to 0.02 g/m^2 deltamethrin applied to a paper surface as described above. For all experiments, test chambers from those described previously were used in paired control and treatment trials (Chareonviriyaphap et al. 2002). Test chambers were modified slightly to allow for quicker assembly of the devices but did not alter the inner surfaces and general design of the chambers. Details of the chamber design and test methodology are described elsewhere (Chareonviriyaphap et al. 2002). Only nonblooded 3–5-d-old nulliparous female mosquitoes were used in excito-repellency tests. All tests were conducted between 0800 and 1630 hours.

Each test series consisted of two deltamethrin-treated test chambers and two paired control chambers. Female mosquitoes were kept in 1-pt holding cups for ~8–10 h before testing, being provided only water soaked on cotton. For each test chamber, 25 starved mosquitoes were carefully introduced into each of four chambers by using a mouth aspirator followed by closure of the outer rear door. A receiving cage (6 by 6 by 6-cm paper carton) was connected to the exit portal for collecting exiting mosquitoes. Mosquitoes were allowed a 3-min resting period to permit adjustment to inside conditions of the test chamber before opening the escape funnel to begin the observation period. Mosquitoes escaping from the chamber into receiving cage were recorded at 1-min intervals for a period of 30 min.

All trials were replicated four times. Immediately after the 30-min exposure, the number of dead or knock-down specimens remaining inside the chamber and those that had escaped into the receiving cage were recorded for each treated and control chamber. All live specimens were collected, transferred to clean holding cups, and provided a 10% sugar solution for nutrition. All test mosquitoes were maintained sepa-

Table 1. Mean susceptibility of *Ae. aegypti* field and laboratory strains to a diagnostic dosage (0.05%) deltamethrin

Strains tested	% mortality ^a
Field	
Nonthaburi	68
Pathumthani	64
Cepu	48
Jakarta	84
Bangkok	77
Toba	95
Laboratory	
AFRIMS	97
Bora Bora	100
CDC	94

^a Sample size each test $n = 100$.

rately in lots during the 24 h postexposure period to record mortality.

Data Analysis. In contact susceptibility tests, for control mortalities exceeding 5%, Abbott's formula was used to adjust and report the baseline susceptibility level in the test population (Finney 1964). A Kaplan-Meier survival analysis method was used to analyze and interpret the behavioral response data (Roberts et al. 1997, Chareonviriyaphap et al. 2002). Survival analysis is the preferred and most robust statistical treatment for excito-repellency data (Kleinbaum 1995). Unlike other methods of analysis that have attempted to quantitatively describe the behavioral avoidance to residual insecticides, the generation of survival curves helps to minimize the loss of useful information while allowing an estimation of mosquito escape probability over time. A log-rank method was used to compare patterns of escape behavior within and between difference treatment groups and biological conditions (Mantel and Haenszel 1959). Statistical significance for all tests was set at $P < 0.05$.

Results

Nine test populations of *Ae. aegypti*, six from the field and three from the laboratory, were exposed to 0.02 g/m^2 deltamethrin-treated papers to assess susceptibility to the compound. Field populations demonstrated varying levels of physiological resistance to deltamethrin (23–52% survival after 24-h postexposure), whereas laboratory colonies proved highly susceptible (94–100% mortality). The one exception was the Toba (north Sumatra) population that showed 95% mortality (Table 1).

Escape responses of *Ae. aegypti* to deltamethrin were measured using contact and noncontact exposure test chambers. The *Ae. aegypti* escape responses varied significantly, depending upon populations tested (Table 2). The three field test populations, one from Thailand (Bangkok) and two from Indonesia (Jakarta and Toba), showed dramatic contact escape responses (>78% within 30 min) compared with two Thai populations (Nonthaburi and Pathumthani) and one other population from Indonesia (Cepu). The Pathumthani population demonstrated the weakest contact response to deltamethrin (32% escape during

T1

T2

Table 2. Summary mean escape response and mortality of female *Ae. aegypti* exposed to 0.02 g/m² deltamethrin in contact and noncontact trials

Test condition/test population	% escaped*	% mortality	
		Escape	Not Escape
Contact			
Field			
Nonthaburi	56	1.8 (1/56)	2.3 (1/44)
Pathumthani	32	0	0
Cepu	36	0	3.1 (2/64)
Jakarta	61	1.23 (1/81)	16.7 (2/12)
Bangkok	50	0	0
Toba	78	5.1 (4/78)	0
Laboratory			
AFRIMS	44	4.5 (2/44)	8.9 (5/56)
Bora Bora	60	5.0 (3/60)	32.5 (13/40)
CDC	51	5.8 (3/51)	26.5 (13/49)
Noncontact			
Field			
Nonthaburi	3	0	0
Pathumthani	2	0	0
Cepu	2	0	0
Jakarta	8	0	0
Bangkok	0	0	0
Toba	4	0	0
Laboratory			
AFRIMS	0	0	0
Bora Bora	1	0	0
CDC	3	0	0

* Sample size each test series $n = 100$.

30-min exposure), followed by *Cepu* (36% escape). The number of escaped females was relatively low for the three laboratory test populations, ranging from 44 to 60%; the AFRIMS strain demonstrated the weakest overall response to deltamethrin (44%). In contact trials, percent age of mortality of escape mosquitoes was very low, ranging from 0 to 5.8%, whereas mortality was higher from those female remaining in the test chamber, varying from 0 to 32.5% (Table 2). In general, percentage of mortalities of nonescape females from laboratory colonies were relatively higher (9–32.5%) compared with a recently collected field population (2.2–16.7%). In all noncontact trials, mortality was not recorded during the 24-h posttest holding period and only a small number of escapees were observed for all test populations (0–8%). Among field test strains, *Jakarta* showed the greatest repellency response to deltamethrin (8% escape).

The time required in minutes for *Ae. aegypti* females to escape from contact chambers treated with deltamethrin were calculated and escape patterns were defined as percentages 30% (ET30), 50% (ET50), and 75% (ET75) of the test population that escaped the test chamber during 30-min period as defined by Kaplan-Meier survival analysis (Table 3). For field populations, ET30 were recorded at <6 min for *Jakarta*, *Bangkok*, *Toba*, and *Nonthaburi*, with greater delay (18 min) seen with *Cepu* and *Pathumthani* strains. For the laboratory populations, the ET30 ranged from 2 to 10 min. ET₅₀ values ranged from 6 to 21 min for six strains analyzed. Because of low percentage of escapees during testing, only two popula-

Table 3. ET in minutes for ET30, ET50, and ET75 of *Ae. aegypti* females to escape contact chamber treated with deltamethrin during 30-min exposure

Test pop	ET30	ET50	ET75
Nonthaburi	6	16	—*
Pathumthani	18	—	—
Cepu	18	—	—
Jakarta	2	6	11
Bangkok	2	12	—
Toba	3	6	18
AFRIMS	10	—	—
Bora Bora	2	7	—
CDC	4	21	—

* Insufficient number of mosquitoes escape from test chamber. ET50 and ET75 could not be calculated.

tions (*Jakarta* and *Toba*) could provided a reliable ET75.

Significant differences in escape patterns were observed in comparisons of paired control versus contact, and contact versus noncontact tests for all populations ($P < 0.001$). In paired noncontact versus control, there were no statistically significant escape responses between any two pairs ($P > 0.05$), indicating a very weak repellency response. Comparison events could not be analyzed for the test populations from *Bangkok* and *AFRIMS*. In contact trials, significant differences were observed between *Jakarta* compared with *Nonthaburi*, *Pathumthani*, *Cepu*, *AFRIMS*, and *CDC*, and between *Toba* compared with *Pathumthani*, *Cepu*, and *AFRIMS* ($P < 0.0001$). In noncontact trials, no significant differences were seen between any population pairs except for *Jakarta* and *Toba* compared with *Bangkok* and *AFRIMS* ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively).

Figures 1–2 illustrate the proportion of *Ae. aegypti* females remaining in the exposure chambers treated with deltamethrin during a 30-min exposure period. The proportions used to develop patterns of escape were used to calculate the escape probabilities for the nine mosquito strains in contact (Fig. 1) and noncontact (Fig. 2) tests. In contact trials, two field strains from Indonesia, *Jakarta* and *Toba*, showed significantly greater escape responses compared with the other field and laboratory strains ($P < 0.001$). Among field populations from Thailand, *Pathumthani* demonstrated the weakest contact behavioral response. In noncontact trials, very few mosquitoes escaped from the treated and control chambers. Although a greater number of *Jakarta* and *Toba* mosquitoes escaped, the exit was not significantly different from their respective paired controls ($P > 0.05$).

Discussion

Behavioral responses of insects exposed to insecticides remain poorly studied and relatively little understood. We believe this area of research is often neglected, yet an important aspect to understanding how vector control methods function and to making sound decisions on pesticide selection. Mosquito behavior is of prime epidemiological importance to the

FIG2

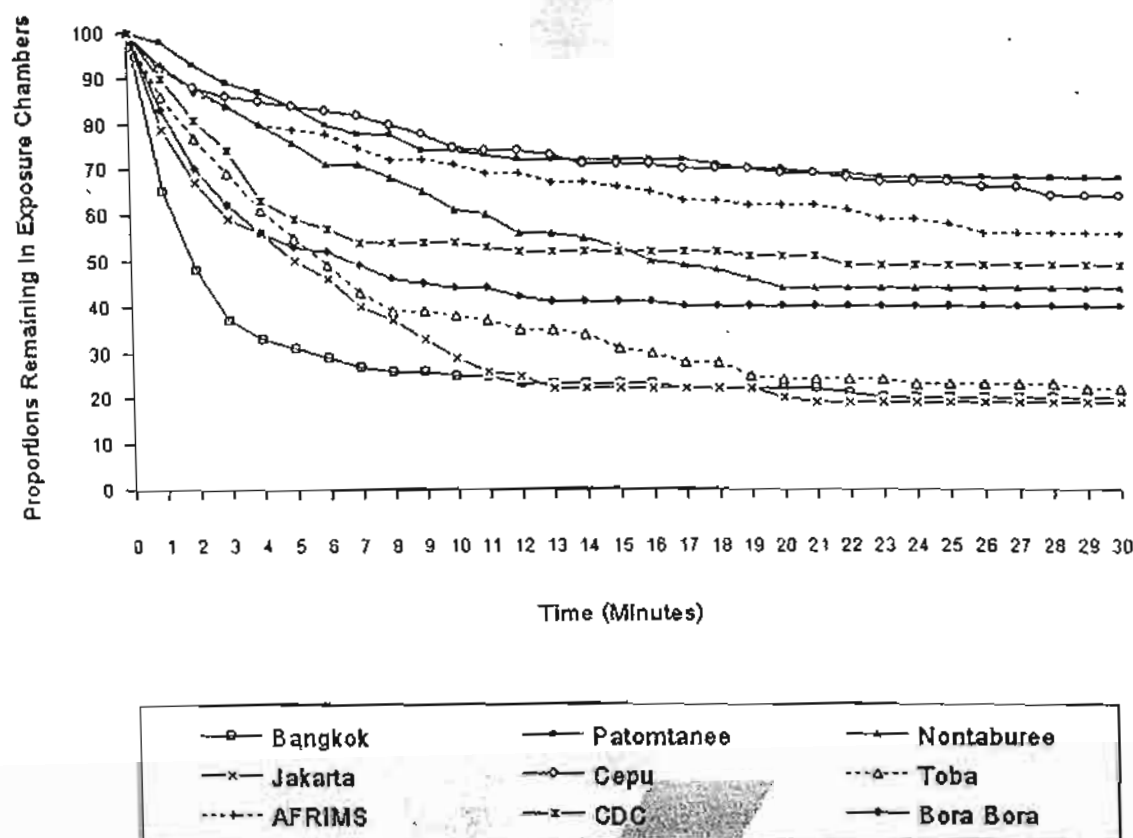


Fig. 1. Survival analysis showing cumulative proportions of nine strains of *Ae. aegypti* escaping test chambers during 30-min contact exposure to 0.02 g/m² deltamethrin.

extent it either favors or arrests a mosquito feeding on a human, potentially imbibing an infectious blood meal or transmitting a pathogen to a susceptible host. An excito-repelling evaluation of *Ae. aegypti* to deltamethrin (or other pyrethroids) has not been adequately documented, despite the general notion that behavioral avoidance by mosquito vectors in the presence of insecticides has been considered a detriment to effective mosquito vector control programs (Davidson 1953, Rawlings and Davidson 1982, Quinones and Suarez 1989, Ree and Loong 1989). Evidence to the contrary, however, has shown that excito-repelling properties and the interference caused by toxic residues on mosquito behavior can actually advance control efforts by reducing vector-human contact and thus the risk of pathogen transmission (Roberts and Andre 1994, Roberts et al. 2000). Quantitatively, the combined effects of repellency and irritancy can potentially exert the dominant actions of an insecticide on an insect vice the lethal properties that are more commonly attributed to a chemical's effectiveness. For example, in Brazil, the excito-repelling action of DDT afforded almost complete protection of humans indoors from *Anopheles darlingi* for nearly 2 mo after the houses had been sprayed (Roberts and Alecrin 1991). Long recognized in importance, the actual

amount of study concerning mosquito behavior has been inadequate in relation to insecticides' impact on limiting disease transmission (Muirhead-Thomson 1960, Mattingly 1962).

In this study, all *Ae. aegypti* strains demonstrated clear behavioral avoidance responses to deltamethrin, regardless of background insecticide susceptibility status present at the time of the assays. Greater escape responses from deltamethrin-treated chambers were documented among field populations compared with the laboratory-adapted colonies. Most tests showed mosquitoes departed treated surfaces and chambers before acquiring a lethal dose of insecticide. Higher percentages of mortalities were observed in non-escape versus escape females in laboratory (8–32%) and field (2–16%) populations. The three laboratory strains used in this study had been colonized continuously for 15–20 yr and seem to have lost some of the natural behavioral avoidance response to deltamethrin. Similarly, suppressed avoidance responses were observed in two colonized populations of *An. albimanus* from Panama and El Salvador (Brown 1958, Chareonviriyaphap et al. 1997). Both populations had been maintained in laboratories for more than two decades and showed much less avoidance to insecticide exposure compared with wild-caught popula-

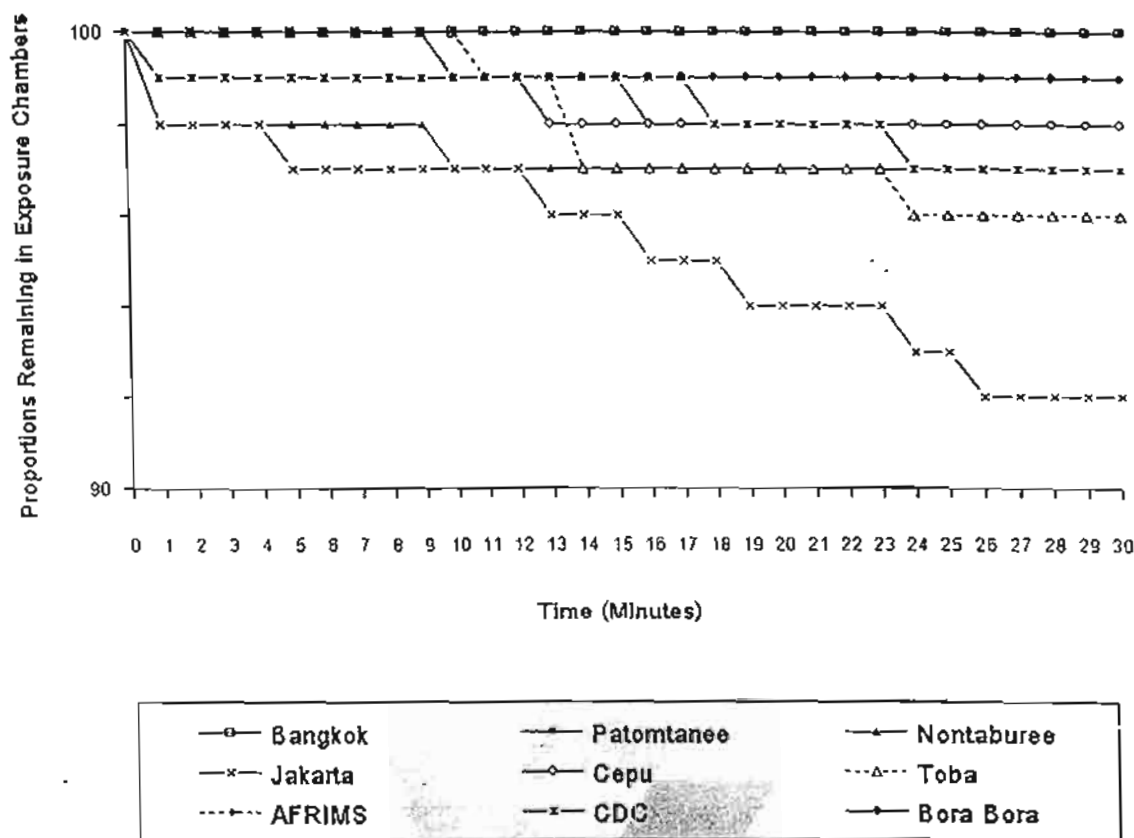


Fig. 2. Survival analysis showing cumulative proportions of nine strains of *Ae. aegypti* escaping test chambers during 30-min noncontact exposure to 0.02 g/m² deltamethrin.

tions. A long-term (~15-yr) colonized strain of *Anopheles dirus* also demonstrated a lower escape response to deltamethrin compared with other strains from Thailand (Chareonviriyaphap et al. 2004). Use of long-established colonized mosquito populations should be carefully considered before extrapolation of findings to "normal" wild-type behavioral patterns of mosquitoes in natural settings.

All nine *Ae. aegypti* populations showed significant irritancy responses to deltamethrin contact, whereas showing no significant repellency when comparing paired noncontact and control tests. In all populations, repellency did not seem to play a significant role in behavioral escape patterns regardless of background toxicological susceptibility patterns. *Ae. aegypti* mosquitoes may have greater tolerance (i.e., less sensitive) to exogenous chemicals detected from a distance compared with some *Anopheles* species. Previous work on several populations of *Anopheles* mosquitoes from both field and laboratory demonstrated a strong contact irritancy to several insecticides compared with a weaker noncontact repellency; however, in many cases repellency was shown to be significantly different compared with paired noncontact controls. (Chareonviriyaphap et al. 1997, 2001, 2004; Sungvornyothin et al. 2001). Nevertheless, noncontact

repellency has consistently been shown to be far less pronounced with all insecticides tested compared with irritancy.

In Thailand and Indonesia, chemical means of control is still regarded as a primary method to combat *Ae. aegypti* larval and adult mosquitoes. In Thailand's national vector control program, temephos (Abate) has been used in great measure to control larvae and deltamethrin for control the adult mosquitoes (CDC 2003). Additionally, many insecticides, including synthetic pyrethroids are commonly used by homeowners to control household mosquitoes and other arthropod pests. We demonstrated that *Ae. aegypti* field test populations from Thailand had some degree of physiological resistance (27–36%) to deltamethrin (Table 1). A high degree of resistance also was observed in the Indonesian Cepu population (52%). The resistance seen was likely the result of selection pressure generated from agricultural use of similar insecticides. *Ae. aegypti* demonstrated significant contact irritancy to deltamethrin, regardless of background susceptibility status, making it unclear what role, if any, behavioral avoidance may play in selection of resistance. We surmise our results would be reflective of other *Ae. aegypti* populations in Thailand where

insecticide resistance has been reported (Chareonviriyaphap et al. 1999, Somboon et al. 2003).

Two possible origins of behavioral responses have been proposed by Chareonviriyaphap et al. (1997); either behavioral and physiological resistance occurs in tandem, but under different genetic control, or the responses evolve independently. Although resistance and behavioral avoidance have been considered an outcome from insecticide selection pressure (Lockwood et al. 1984), as yet, no directly linked relationship between the two responses was apparent in our investigations. The strong contact irritancy observed in two Indonesian field strains (Jakarta and Toba) seems to be an innate avoidance response, given the relatively low level of background physiological resistance seen. Similarly, the lower excito-repellency to deltamethrin in one field population from Indonesia (Cepu) and one from Thailand (Pathumthani), both of which presented the highest levels of resistance, may have influenced the overall escape response because of greater tolerance to insecticide and ability to withstand increased exposure. The escaped females from Cepu also had among the lowest percentage of mortality compared with other strains (Table 2). The relatively high physiological resistance in the Pathumthani population (36%) also may have contributed to the zero mortality in both nonescape and escape individuals. Moreover, the possibility that nonescapes could have survived by avoiding prolonged contact with insecticide-treated surfaces seems unlikely (Chareonviriyaphap et al. 2002).

The poor sustainability of *Ae. aegypti* control in most areas of the world is well documented (Gubler and Clark 1994, Gubler 1997, Reiter and Gubler 1997). The predictable host-seeking activities, indoor resting habits, and high predilection to feed on humans inside houses would presumably lend this species to be more easily controlled. However, the strongly endophilic/endophilic behavior of *Ae. aegypti* has presented a huge challenge to vector control professionals to devise new or improved methods to effectively reduce mosquito populations and disease transmission risk. Evidence has shown residual insecticides applied indoors by using conventional portable ultralow-volume devices, mist blowers, and thermal fogging machines can provide longer lasting control of adult *Aedes* (Pant et al. 1974, Sulaiman et al. 1993, Reiter and Gubler 1997, Perich et al. 2001). Pant et al. (1974) reported up to 7 mo of effective control of *Ae. aegypti* indoor densities by using fenitrothion applied by aerosol mist blower. Former antimalarial campaigns that relied heavily on indoor residual insecticide applications also documented the dramatic reduction of *Ae. aegypti* populations (Giglioli 1948, Brown and Pal 1971).

Many chemical compounds, including organophosphates, carbamates, and synthetic pyrethroids, have long been used in public health vector control programs (Reiter and Gubler 1997). In 1994, deltamethrin was introduced in Thailand for controlling household nuisance and vector mosquitoes, including *Ae. aegypti* (Chareonviriyaphap et al. 1999). Deltamethrin also has been used to attempt interruption of mosquito

virus transmission after reports of dengue cases. The need for more effective residual formulations and application technology is an area of continued investigation for adult mosquito control. We would strongly encourage others examining the use of residual insecticides to carefully document the behavioral responses of *Ae. aegypti* in the study design. An understanding of behavioral avoidance by mosquitoes that can interfere with vector feeding and alter other behavioral patterns (e.g., oviposition site preference) of adult mosquitoes, must be considered when assessing the true effect of insecticides on dengue control, remembering the primary measure of successful control should be reduction of disease transmission (case incidence), not simply the quantitative reduction of vector mosquito densities.

Despite over a century of study, there remains much to understand about the biology and behavior of *Ae. aegypti* that influences dengue transmission. The behavioral responses of mosquito vectors to insecticides are of great importance to better understand the mechanisms involved that may influence transmission and support the rationale for ongoing mosquito control activities and expenditures. We believe excito-repellency assays should be an integral component of any evaluation of an insecticide's full capabilities and potential to abate disease transmission.

Acknowledgments

We thank the Malaria Division, Communicable Disease Control, the Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, and the Dengue Vaccine Institute for providing some of *Ae. aegypti* strains used in this study. We also thank Rapeepun, Mahidol University for providing three field strains of *Ae. aegypti*. This project was funded by the Thailand Research Fund and the Center of Agricultural Biotechnology, Bangkok, Thailand.

References Cited

- Bondareva, N. L., M. M. Artem'ev, and G. V. Gracheva. 1956. Susceptibility and irritability caused by insecticides to malaria mosquitoes in the USSR. Part 1. *Anopheles pulcherrimus*. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni (Moskva) 6: 52-55.
- Brown, A. W. A. 1958. Laboratory studies on the behavioristic resistance of *Anopheles albimanus* in Panama. Bull. World Health Organ. 19: 1053-1061.
- Brown, A. W. A., and R. Pal. 1971. Insecticide resistance in arthropods, ed. 2. Monogr. Ser. 38. World Health Organization.
- Chareonviriyaphap, T., D. R. Roberts, R. G. Andre, H. Harlan, and M. J. Bangs. 1997. Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus* Wiedemann. J. Am. Mosq. Control Assoc. 13: 171-183.
- Chareonviriyaphap, T., B. Aum-Aung, and S. Ratanatham. 1999. Current insecticide resistance patterns in mosquito vectors in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 30: 184-194.
- Chareonviriyaphap, T., S. Sungvornyothin, S. Ratanatham, and A. Prabaripai. 2001. Pesticide-induced behavioral responses of *Anopheles minimus*, a malaria vector in Thailand. J. Am. Mosq. Control Assoc. 17: 13-22.

- Chareonviriyaphap, T., A. Prabaripai, and S. Sungvornyothin. 2002. An improved excito-repellency for mosquito behavioral test. *J. Vector Ecol.* 27: 250-252.
- Chareonviriyaphap, T., A. Prabaripai, and M. J. Bangs. 2004. Excito-repellency of deltamethrin on the malaria vectors, *Anopheles minimus*, *Anopheles dirus*, *Anopheles suwattawongporni*, and *Anopheles maculatus*, in Thailand. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 20: 45-54.
- [CDC] Communicable Disease Control. 2003. Vector-borne Disease Annual Report. CDC, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand.
- Coosemans, M. H., and S. Siles. 1977. Stage VI evaluation of five insecticide-OMS-1821, OMS-1825, and OMS-1988 against Anopheline mosquitoes at the Soumouso Experimental Station, Bobo Dioulasso, Upper Volta. *WHO/VBC/77.663*, Geneva, Switzerland.
- Davidson, G. 1953. Experiments on the effect of residual insecticides in houses against *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Bull. Entomol. Res.* 44: 231-255.
- Evans, R. G. 1993. Laboratory evaluation of the irritancy of bendiocarb, lambda-cyhalothrin, and DDT to *Anopheles gambiae*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9: 285-293.
- Finney, D. J. 1964. Statistical methods in biological assays. Charles Griffin Co. Ltd., London, United Kingdom.
- Giglioli, G. 1948. An investigation of the house-frequenting habits of mosquitoes of the British Guiana coastland in relation to the use of DDT. *Am. J. Trop. Med.* 28: 43-70.
- Gubler, D. J. 1997. Dengue and dengue haemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem, pp. 1-22. In D. J. Gubler and C. Kuno [eds.], *Dengue and dengue haemorrhagic fever*. CAB International, New York.
- Gubler, D. J., and G. C. Clark. 1994. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50 (suppl.): 50-60.
- Hadaway, A. B., F. Barlow, J. E. H. Grose, C. R. Turner, and L. S. Flower. 1970. Evaluation of compounds for insecticidal activity on adult mosquitoes. Part I: Response of adult mosquitoes to some new insecticides. *Bull. World Health Organ.* 42: 353-368.
- Kennedy, J. S. 1947. The excitant and repellent effects on mosquitoes of sub-lethal contacts with DDT. *Bull. Entomol. Res.* 37: 593-607.
- Kleinbaum, D. G. 1995. Survival analysis. Springer, New York.
- Lal, H., S. Ginocchio, and E. J. Hawrylewicz. 1965. Effect of allethrin on feeding behavior of insects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120: 441-443.
- Lockwood, J. A., T. C. Sparks, and R. N. Story. 1984. Evolution of insect resistance to insecticide: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 30: 41-51.
- Mantel, N., and W. Haenszel. 1959. Statistic aspects of the analysis of data from retrospective studies of diseases. *J. Natl. Cancer Inst.* 22: 719-748.
- Mattingly, P. F. 1962. Mosquito behavior in relation to disease eradication programmes. *Annu. Rev. Entomol.* 7: 419-436.
- Moore, C. G. 1977. Insecticide avoidance by ovipositing *Aedes aegypti*. *Mosq. News* 37: 291-293.
- Muirhead-Thomson, R. C. 1960. The significance of irritability, behaviouristic avoidance and allied phenomena in malaria eradication. *Bull. World Hlth. Organ.* 22: 721-734.
- Pant, C. P., H. L. Mathis, M. J. Nelson, B. Phanthumachinda. 1974. A large-scale field trial of ultra-low-volume fenitrothion applied by a portable mist blower for the control of *Aedes aegypti*. *Bull. World Health Organ.* 51: 409-415.
- Pell, J. K., M. A. Spinne, and K. J. Ward. 1989. Observations on the behavior of adult *Anopheles gambiae* encountering residual deposits of lambda-cyhalothrin compared with the other major classes, p. 18. In *Proceedings, 18th Annual Conference of the Society for Vector Ecology*. European Region, Society for Vector Ecology, Santa Ana, CA.
- Perich, M. J., C. Sherman, R. Burge, E. Gill, M. Quintana, and R. A. Wirtz. 2001. Evaluation of the efficacy of lambda-cyhalothrin applied as ultra-low volume and thermal fog for emergency control of *Aedes aegypti* in Honduras. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 17: 221-224.
- Quinones, M. L., M. F. Suarez. 1989. Irritability to DDT of natural populations of the primary malaria vectors in Colombia. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5: 56-59.
- Rachou, R. G., M. Moura Lima, J. P. Duret, and J. R. Kerr. 1963. Experiences with the excito-repellency test box—model OPS, pp. 442-447. In *Proceedings, 50th Annual Meeting of the New Jersey Mosquito Exterminators Association and the 19th Annual Meeting of the American Mosquito Control Association*. P 442-447.
- Rawlings, P., and G. Davidson. 1982. The dispersal and survival of *Anopheles culicifacies* Giles (Diptera: Culicidae) in a Sri Lanka village under malathion spraying. *Bull. Entomol. Res.* 72: 139-144.
- Ree, H. J., and K. P. Loong. 1989. Irritability of *Anopheles farauti*, *Anopheles maculatus*, and *Culex quinquefasciatus* to permethrin. *Jpn. J. San. Zool.* 40: 47-51.
- Reiter, P., and D. J. Gubler. 1997. Surveillance and control of urban dengue vectors, pp. 425-462. In D. J. Gubler and C. Kuno [eds.], *Dengue and dengue haemorrhagic fever*. CAB International, New York.
- Roberts, D. R., and W. D. Alecrim. 1991. Behavioral response of *Anopheles darlingi* to DDT sprayed house walls in Amazonia. *PAHO Bull.* 25: 210-217.
- Roberts, D. R., and R. G. Andre. 1994. Insecticide resistance issues in vector-borne disease control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50: 21-34.
- Roberts, D. R., T. Chareonviriyaphap, H. H. Harlan, and P. Hsieh. 1997. Methods for testing and analyzing excito-repellency responses of malaria vectors to insecticides. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 13: 13-17.
- Roberts, D. R., W. D. Alecrim, P. Hsieh, J. Grieco, M. J. Bangs, R. G. Andre, and T. Chareonviriyaphap. 2000. A probability model of vector behavior: effects of DDT repellency, irritability, and toxicity in malaria control. *J. Vector Ecol.* 25: 48-61.
- Rutledge, L. C., N. M. Echani, and R. K. Gupta. 1999. Responses of male and female mosquitoes to repellents in the World Health Organization insecticide irritability test system. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15: 60-64.
- Somboon, P., L. Prapanthadara, and W. Suwanakerd. 2003. Insecticide susceptibility tests of *Anopheles minimus*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 34: 87-93.
- Sulaiman, S., M. A. Karim, B. Omar, J. Jeffery, and F. Mansor. 1993. The residual effects of the synthetic pyrethroids lambda-cyhalothrin and cyfluthrin against *Aedes aegypti* (L.) in wooden huts in Malaysia. *Mosq. Borne Dis. Bull.* 10: 128-131.
- Sungvornyothin, S., T. Chareonviriyaphap, A. Prabaripai, T. Trirakhuat, S. Ratanatham, and M. J. Bangs. 2001. Effects of nutritional and physiological status on behavioral avoidance of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) to DDT, deltamethrin and lambda-cyhalothrin. *J. Vector Ecol.* 26: 202-215.
- Threlkeld, S. F. H. 1985. Behavioral responses in *Drosophila melanogaster* associated with permethrin and ectiban.

November 2004

KONGMEET ET AL.: *Ae. aegypti* BEHAVIORAL RESPONSES TO DELTAMETHRIN

9

pp. 29-36. In Proceedings, 32nd Annual Meeting of the Canadian Pest Management Society, 24-26 June, 1985, Charlottetown, Prince Island, Canada.

[WHO] World Health Organization. 1970. Insecticide resistance and vector control. 17th report of the WHO Expert Committee on Insecticide. Instructions for determining the irritability of adult mosquitoes to insecticide. WHO Tech. Rep. Ser. 433, Geneva, Switzerland.

[WHO] World Health Organization. 1992. Vector resistance to pesticides. WHO Tech. Rep. Ser. 818. WHO, Geneva, Switzerland.

[WHO] World Health Organization. 1998. Report of WHO informal consultation. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors. WHO, Geneva, Switzerland.

[WHO] World Health Organization. 1999. Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever: comprehensive guidelines. WHO Regional Publ., SEARO No. 29, New Delhi, India.

AQ:7

Received 23 March 2004; accepted 7 September 2004.

WHO 1998

Test procedure for ~~test~~ insecticide resistance monitoring in malaria vectors; bio-efficacy and persistence of insecticide on treated surfaces.

Document WHO/CDS/CPG/MAL/98.12. Geneva, Switzerland

พฤติกรรมการหลีกเลี่ยงของยุงพาหะนำโรคมาลาเรียชนิด เอ ต่อดังสารเคมีด้าเมทริน
Avoidance Behavior of deltamethrin by *Anopheles minimus* Species A, a malaria vector
in Thailand

อัจฉริยา ปรามอริพาย ¹

Atchariya Prabaripai ¹

อมรา นาคสัทธิต ²

Amara Naksathit ²

ณัฐวรรณ พุทธางกูรสันตติ ³

Nutthawan Putthangkoon Santati ³

ธีรภาพ เจริญวิริยะภาพ ³

Theeraphap Chareonviriyaphap ³

ABSTRACT

The behavioral responses of a colonized population of *Anopheles minimus* to deltamethrin were characterized using an excito-repellency escape chamber test system. A full test compared the escape responses of test population from each of 4 chambers; one with direct contact with insecticide treated surface, one without direct contact with treated surfaces and 2 control boxes (one with and one without direct contact with surfaces) treated with the carrier only. A dramatic escape response of test population was seen in test chambers that affording direct contact with deltamethrin treated surfaces. Female mosquito escaped in greater numbers from chambers without direct contact with treated surfaces than escaped from the 2 controls. Results also revealed that significant differences of escape responses were found in the test system between that used WHO impregnated papers and those from our own-made impregnated papers. We conclude that behavioral responses of *An. minimus* are important in insecticide-malaria control program equation.

Key words : Avoidance behavior, Excito – repellency, Pyrethroid, *Anopheles minimus*

¹ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Division of Mathematics, Statistics and Computer, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaengsean Campus, Nakhon Pathom 73140

² คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Bangkok 10400

³ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามพฤติกรรมการตอบสนองของยุงมินิมัส เอ เมื่อทดสอบกับสารเคลือบเมทธริน ทั้งที่มีโอกาสสัมผัสและที่ไม่มีโอกาสสัมผัสกับสารเคมี โดยใช้ชุดทดสอบพฤติกรรมการหลีกหนีสาร นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระดาษทดสอบที่สั่งซื้อจากองค์การอนามัยโลกและที่ทำขึ้นใหม่ในห้องปฏิบัติการของภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารเคลือบเมทธรินมีประสิทธิภาพในการขับไล่ยุงก้นปล่องมินิมัสได้ หลังจากที่ยุงได้สัมผัสกับสารเคมีฆ่าแมลงโดยตรง อย่างไรก็ตามพบว่ายุงมินิมัสที่ไม่ได้สัมผัสสารเคมีบินออกจากชุดทดลองมากกว่าในชุดควบคุมด้วย การศึกษาเปรียบเทียบกระดาษทดสอบสองชนิดพบว่า มีประสิทธิภาพในการใช้งานต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ายุงมินิมัสมีพฤติกรรมหลีกหนีต่อสารเคมีอย่างรุนแรง และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการวางแผนควบคุมยุงพาหะนำโรคมาลาเรียต่อไป

คำหลัก: พฤติกรรมหลีกหนีสารเคมี ไพรีทรอยด์, ยุงก้นปล่องมินิมัส

คำนำ

โรคมาลาเรียเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขของประเทศในแถบร้อนชื้นมาตลอด และพบว่าประเทศไทยมีโรคมาลาเรียระบาดมากในจังหวัดตามแนวชายแดนที่ติดกับประเทศพม่า กัมพูชา โดยเฉพาะในแถบป่าเขา ป่าขึ้นเขตร้อน (Chareonviriyaphap et al., 2000) โดยประชากรกลุ่มเสี่ยงคือ วัยทำงาน อายุ 15-57 ปี มีเชื้อปรสิต *Plasmodium spp.* เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค (Rattanarithikul and Panthusiri, 1994) และมียุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค พบว่ายุงก้นปล่องมินิมัสมีความสำคัญมากในการแพร่เชื้อและมีความใกล้ชิดกับมนุษย์ค่อนข้างมากในขณะนี้

ยุงมินิมัสในบางพื้นที่ชอบเข้าไปดูดกินเลือดเหยื่อภายในบ้านในตอนกลางคืน (Nutsathapana and Sawadiwongphorn, 1986; Poolsuwan, 1995) แหล่งเพาะพันธุ์โดยทั่วไปเป็นแหล่งน้ำตามธรรมชาติบริเวณชายป่า ดังนั้นมาตรการหลักในการควบคุมยุงพาหะนำโรคมาลาเรียสำหรับประเทศไทยตั้งแต่ปี 2492 จนถึงปัจจุบัน คือการใช้สารเคมีฆ่าแมลงฉีดพ่นตามฝาผนังบ้านด้านในปีละ 1-2 ครั้ง โดยสารเคมีตัวแรกที่ใช้คือ ดีดีที (Hongvivatana et al., 1982) แต่ปัญหาที่ตามมาหลังจากการใช้ดีดีทีติดต่อกันเป็นเวลานานคือ ปัญหาสิ่งแวดล้อมเนื่องจากดีดีทีสลายตัวช้า มีพิษตกค้างในธรรมชาติได้นาน มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และที่สำคัญพบว่ายุงก้นปล่องบางชนิดเริ่มสร้างความต้านทานต่อดีดีที (WHO, 1992) ประเทศไทยจึงยกเลิกการสั่งซื้อดีดีทีตั้งแต่ปี 2538 ทำให้ต้องหาสารเคมีอื่นขึ้นมาทดแทนโดยเฉพาะสารเคมีในกลุ่มไพรีทรอยด์

สังเคราะห์ เช่น เพอร์เมทรีน เดลต้าเมทรีน เป็นต้น ซึ่งสารเคมีในกลุ่มนี้มีความเป็นพิษต่อสัตว์ เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำ สลายตัวง่ายในธรรมชาติ (Prasittisuk, 1994) และมีคุณสมบัติเด่นในการขับไล่ ยุงพาหะเช่นเดียวกับดีดีที (Chareonviriyaphap et al., 1997)

เดลต้าเมทรีนเป็นสารเคมีฆ่าแมลงในกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูงออกฤทธิ์ได้อย่างรวดเร็วและนำมาใช้ควบคุมยุงพาหะนำโรคมาลาเรียในประเทศไทยตั้งแต่ปี 2537 โดยฉีดพ่นตามฝาผนังบ้านด้านใน เพื่อให้ยุงที่เข้ามากัดคนในบ้าน และเกาะพักบนฝาผนังได้รับพิษของสารเคมี และตายก่อนที่จะขยายพันธุ์ต่อไป แต่ผลจากการศึกษาบางแห่งพบว่า ยุงก้นปล่องจะบินเข้าไปในบ้านที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีฆ่าแมลงน้อยกว่าบ้านที่ไม่ได้ฉีดพ่นหรือ ยุงพาหะจะบินหนีออกจากบ้านที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีฆ่าแมลง นักกีฏวิทยายังไม่พบว่ามียุงตายในบ้านที่พ่นสารเคมีฆ่าแมลง (Roberts and Andre, 1994) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยุงแสดงพฤติกรรมการหลีกเลี่ยงหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า "การต้านทานเชิงพฤติกรรมของยุงต่อสารเคมีฆ่าแมลง" (Roberts and Andre, 1994; Chareonviriyaphap et al., 1997; Roberts et al., 2000) ซึ่งพฤติกรรมการต้านทานต่อสารเคมีของยุงพาหะนี้อาจจะสามารถช่วยลดโอกาสที่ยุงจะเข้ากัดคนและถ่ายทอดเชื้อมาลาเรียลงได้ แต่การศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้มีน้อยมาก ส่วนหนึ่งเพราะขาดแคลนเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพและการวิเคราะห์ผลที่ดี ทำให้ไม่ได้รับการยอมรับ ซึ่งดูได้จาก ไม่มีรายงานที่แสดงให้เห็นชัดเจนว่า ยุงมีพฤติกรรมการตอบสนองต่อสารเคมีอย่างไรในระหว่างที่เข้าไปหาเหยื่อในบ้าน

ชุดทดสอบพฤติกรรมการต้านทานสารเคมีฆ่าแมลงนี้ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาให้มีความพิเศษจากรูปแบบเดิมในอดีต โดย Chareonviriyaphap et al., (2001) คือสามารถพับเก็บได้และสะดวกในการเคลื่อนย้ายสำหรับการทดสอบในภาคสนาม โดยเลียนแบบบ้านหรือกระท่อมในธรรมชาติที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีฆ่าแมลง ชุดทดสอบนี้จะช่วยอธิบายกลไกทางด้านพฤติกรรมการตอบสนองต่อสารเคมีฆ่าแมลงของยุงพาหะนำโรคมาลาเรียทั้งสองแบบคือ ยุงที่มีโอกาสสัมผัสและไม่มีโอกาสสัมผัสกับสารเคมีฆ่าแมลงได้อย่างชัดเจน

ในการทดลองครั้งนี้ใช้กระดาสุบสารเคมีฆ่าแมลงชนิดเดลต้าเมทรีน ซึ่งสั่งซื้อมาจากองค์การอนามัยโลก และทำขึ้นใหม่ในห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตอบสนองของยุงก้นปล่อง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์คือ

- (1) เพื่อติดตามพฤติกรรมการตอบสนองต่อสารเคมีฆ่าแมลงชนิดเดลต้าเมทรีนของยุงก้นปล่อง มิโนมัส เอ โดยใช้ชุดกล่องทดสอบพฤติกรรมการหลีกเลี่ยงสารเคมีฆ่าแมลง
- (2) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระดาสุบเดลต้าเมทรีนที่สั่งซื้อจากองค์การอนามัยโลกและที่ทำขึ้นใหม่ในห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ยุงก้นปล่องมินิมัส เอ

ประชากรยุงที่ใช้ในการทดลองได้นำมาจากกองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุขในปี 2542 ซึ่งจับมาจากคอกสัตว์ที่ ต.ร้องกวาง จ.แพร่ เป็นยุงมินิมัส เอ เมื่อปี 2536 พบว่าเป็นประชากรยุงที่มีความไวต่อสารเคมีฆ่าแมลงชนิดเดลต้าเมทธริน

ยุงมินิมัส เอ ถูกเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลงที่อุณหภูมิ $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ และความชื้นสัมพัทธ์ $80 \pm 10\%$ ตามวิธีการของ Chareonviriyaphap (et al., 1997) โดยนำลูกน้ำอายุ 1 วันที่ฟักภายในถ้วยไซ่งลงในภาตพลาสติกสำหรับเลี้ยงลูกน้ำซึ่งมีน้ำสูงประมาณ $\frac{3}{4}$ ของภาต ให้อาหารลูกน้ำอย่างน้อยวันละ 1 ครั้ง และเพิ่มขึ้นตามระยะและขนาดของลูกน้ำจนเข้าสู่ระยะตัวโม่ง จะถูกแยกใส่ถ้วยขนาดเล็กไว้ในกรงเล็กจนกลายเป็นตัวเต็มวัย เมื่อตัวเต็มวัย อายุครบ 4 วัน นำหนูตะเภามาให้ยุงดูดเลือดเพื่อจะวางไข่ต่อไป โดยตั้งแต่เข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยยุงจะได้รับสารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 10% (น้ำหวาน) เป็นอาหารด้วย

สำหรับยุงที่ใช้ในการทดลองนี้ คือยุงตัวเต็มวัยเพศเมียอายุ 3-6 วันที่ไม่ได้กินเลือด ให้เฉพาะน้ำหวานเป็นอาหารเท่านั้น และก่อนการทดลองต้องให้ยุงอดน้ำหวานก่อนประมาณ 10 ชั่วโมง

2. กระดาษชุบสารเคมีฆ่าแมลง

กระดาษชุบสารเดลต้าเมทธริน ความเข้มข้น 0.02 กรัมต่อตารางเมตร ขนาด 27.5×35.5 ซม.² มีแหล่งที่มา 2 แหล่ง คือ

(1) สั่งซื้อจากองค์การอนามัยโลก (กระดาษ WHO) ซึ่งผลิตขึ้นในเดือนธันวาคม ปี 2544

(2) ทำขึ้นใหม่ในห้องปฏิบัติการของภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัย

เกษตรศาสตร์ (กระดาษ KU) ในเดือนมีนาคม ปี 2545 โดยใช้อัตราความเข้มข้น เท่ากัน กับ

กระดาษขององค์การอนามัยโลก

3. ชุดทดสอบพฤติกรรมการหลีกหนีสารเคมีฆ่าแมลงในยุงพาหะนำโรค

ชุดทดสอบพฤติกรรมการหลีกหนีสารเคมีฆ่าแมลงของยุงประกอบด้วยกล่องทดสอบสี่เหลี่ยม ทำจากโลหะอลูมิเนียม 4 กล่อง ขนาด $40.5 \times 33.5 \times 33.5$ ซม.³ สามารถถอดแยกชิ้นส่วนและประกอบขึ้นเป็นกล่องได้ มีช่องประตูทางเข้าและช่องหน้าต่างสำหรับให้ยุงบินออกอย่างละหนึ่งช่อง ส่วนผนังขึ้นในทำด้วยแผ่นลวดตาข่ายเพื่อกีดขวางไม่ให้ยุงได้สัมผัสกับสารเคมีฆ่าแมลงและมีที่ยึดกับกระดาษทดสอบด้วย (Chareonviriyaphap et al., 2001)

การทดสอบพฤติกรรมการหลีกหนีสารเคมีฆ่าแมลงของยุงมี 2 ลักษณะคือ

(1) การหลีกเลี่ยงของยุงก่อนการสัมผัส (Repellency) คือสภาพที่ไม่ให้ยุงได้มีโอกาสสัมผัสกับสารเคมีฆ่าแมลง ประกอบด้วยกล่องทดสอบ 2 กล่อง กล่องแรกจะยัดกระดาษชุบสารเคมีฆ่าแมลงไว้ระหว่างผนังชั้นในกับผนังชั้นนอก เพื่อไม่ให้ยุงมีโอกาสสัมผัสกับสารเคมีฆ่าแมลง และอีกกล่องหนึ่งใช้กระดาษที่ไม่ชุบสารเคมีฆ่าแมลงเป็นกล่องควบคุม (Noncontact)

(2) การหลีกเลี่ยงของยุงหลังจากได้สัมผัส (Irritancy) คือสภาพที่ยุงมีโอกาสสัมผัสกับสารเคมีฆ่าแมลง ประกอบด้วยกล่องทดสอบ 2 กล่อง กล่องแรกจะยัดกระดาษชุบสารเคมีฆ่าแมลงไว้ด้านในกล่อง เพื่อให้ยุงมีโอกาสสัมผัสกับสารเคมีฆ่าแมลงโดยตรง และอีกกล่องหนึ่งให้ยุงมีโอกาสสัมผัสกับกระดาษที่ไม่ชุบสารเคมีเป็นกล่องควบคุม (Contact)

โดยแต่ละลักษณะจะทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างกล่องที่ยัดกระดาษชุบสารเคมีฆ่าแมลง (Treatment) และกระดาษที่ไม่มีสารเคมีฆ่าแมลง (Control) อย่างละ 1 กล่อง

4. วิธีการทดลอง

การดำเนินการทดลองจัดสภาพการทดลอง 2 ลักษณะ โดยใช้ชุดทดสอบ EREC ซึ่งมีกล่องทดลอง 4 กล่อง คือ

(1) ให้ยุงมีโอกาสสัมผัสกับสารเคมี จำนวน 2 กล่อง ให้กล่องหนึ่งมีกระดาษชุบสารเคมีดำเมทธริน 0.02 กรัมต่อตารางเมตร บุที่ผนังด้านในกล่องทดลอง (Contact Treatment) และอีกกล่องหนึ่งมีกระดาษชุบน้ำมัน บุที่ผนังด้านในกล่องเป็นกล่องควบคุม (Contact Control)

(2) ให้ยุงไม่มีโอกาสสัมผัสกับสารเคมี จำนวน 2 กล่อง ให้กล่องหนึ่งมีกระดาษชุบสารเคมีดำเมทธริน 0.02 กรัมต่อตารางเมตร บุที่ระหว่างผนังชั้นนอกและผนังชั้นในของกล่องทดลอง (Noncontact Treatment) และอีกกล่องหนึ่งมีกระดาษชุบน้ำมัน บุที่ระหว่างผนังชั้นนอกและผนังชั้นในของกล่องทดลองเป็นกล่องควบคุม (Noncontact Control)

ทำการทดลองในช่วงเวลากลางวันระหว่างเวลา 08.00 – 16.00 น. และบันทึกอุณหภูมิกับความชื้นสัมพัทธ์ขณะทำการทดลองด้วยทุกครั้ง ทำซ้ำ 4 ครั้ง การทดลองแต่ละครั้งจะใช้แอลกอฮอล์ชุบสำลีเช็ดทำความสะอาดกล่องทดลองก่อนใช้ แล้วสุ่มกล่องทดลองให้ได้รับสภาพการทดลองอย่างใดอย่างหนึ่งข้างต้น ดำเนินการทดลองโดยนำยุงใส่เข้าไปในกล่องทดลองแต่ละกล่อง ๆ ละ 25 ตัว และปิดประตูทางเข้าและทางออกเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ยุงปรับสภาพแวดล้อมภายในกล่องทดลอง หลังจากนั้นเปิดช่องทางให้ยุงบินออก และนับจำนวนยุงที่บินหนีออกจากกล่องทั้ง 4 กล่อง บันทึกจำนวนยุงที่บินหนีออกจากกล่องทดลองทุก ๆ 1 นาที ใช้เวลาในการทดลอง 30 นาที ตามวิธีการของ Charoenviriyaphap et al., (1997) หลังจากนั้นนำยุงที่บินหนี

ออกจากกล่อง และที่คงเหลืออยู่ในกล่องมาเลี้ยงต่อ ให้น้ำหวานตามปกติ และบันทึกจำนวนยุงที่ตายภายหลังการทดลอง 24 ชั่วโมง

ทำการทดลองโดยใช้กระดาษชุบสารเคลด้าเมทริน 0.02 กรัมต่อตารางเมตร ที่สั่งซื้อจากองค์การอนามัยโลก (กระดาษ WHO) และทำการทดลองอีกครั้งโดยใช้กระดาษชุบสารเคลด้าเมทริน 0.02 กรัมต่อตารางเมตร ที่ทำขึ้นใหม่ในห้องปฏิบัติการของคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (กระดาษ KU) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระดาษทั้งสองแหล่งนี้

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

จำนวนยุงที่บินหนีออกจากกล่องทดลองแต่ละกล่องวิเคราะห์โดยใช้ Probit analysis เพื่อหา เวลาที่ประชากรยุงจำนวน 50% (ET_{50}) และ 90% (ET_{90}) บินหนีออกไปจากกล่องทดลอง แล้วใช้วิธีการวิเคราะห์การอยู่รอด (Survival analysis) โดยใช้วิธีการทดสอบ Log-Rank test เพื่อเปรียบเทียบพฤติกรรมการตอบสนองต่อสารเคลด้าเมทริน ระหว่างกระดาษ WHO และกระดาษ KU

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้พบว่าสารเคลด้าเมทรินมีผลต่อพฤติกรรมการตอบสนองของยุงมีนิมัสทั้งก่อนและหลังการสัมผัส โดยดูจากจำนวนการหลีกหนีของยุงจากชุดทดลอง ตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าสารเคลด้าเมทรินมีความเป็นพิษต่ำต่อยุง โดยดูจาก เปอร์เซ็นต์การตายของยุงที่บินหนีออกมา หลังจากสิ้นสุดการทดลอง (0-27%) ดังนั้นสารเคลด้าเมทริน 0.02 กรัมต่อตารางเมตร มีฤทธิ์ในการฆ่ายุงมีนิมัสเพียงเล็กน้อยหรือแทบจะไม่มีเลย แต่มีฤทธิ์ในการขับไล่ยุงมากกว่า โดยเฉพาะเมื่อยุงมีโอกาสสัมผัสกับสารเคลด้าเมทรินโดยตรง (Contact Treatment) ซึ่งทำให้ยุงเกิดการระคายเคือง มียุงที่บินหนีออกมาขณะทดลองถึง 96% เมื่อใช้กระดาษ WHO และ 98% เมื่อใช้กระดาษ KU ในขณะที่หลังจากมีการสัมผัสกับกระดาษที่ไม่มีสารเคมีฆ่าแมลง (Contact Control) มีเพียง 7% ในกระดาษ WHO และ 32% ในกระดาษ KU ส่วนการทดลองที่ยุงไม่ได้สัมผัสกับสารเคลด้าเมทรินโดยตรง (Noncontact Treatment) ก็สามารถขับไล่ยุงให้บินหนีออกจากกล่องทดลองภายใน 30 นาทีได้เช่นกัน โดยจำนวนยุงที่บินหนีออกจากกล่องที่ทดลองมีถึง 31% ในกระดาษ WHO และ 75% ในกระดาษ KU ซึ่งมากกว่าจำนวนยุงที่บินหนีออกจากกล่อง Noncontact Control แต่ก็ยังน้อยกว่ากล่อง Contact Treatment

ตารางที่ 2 เป็นการศึกษาในสภาพที่ยุงมีโอกาสสัมผัสกับสารเคลด้าเมทริน (Contact Treatment) จำนวนยุงที่บินหนีออกจากกล่องทดลองจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ (ET_{50}) เท่ากับ 3 และ 5 นาทีเมื่อใช้กระดาษ WHO และ KU ตามลำดับ ส่วนค่า ET_{90} เท่ากับ 13 และ 17 นาที เมื่อใช้

กระดาษ WHO และ KU ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่า ET_{50} และ ET_{90} ในสภาพที่ยุงไม่มีโอกาสสัมผัสกับสารเคลือบเมทรีน (Noncontact Treatment) คือ ET_{50} ของกระดาษ KU เท่ากับ 18 นาที ในขณะที่ ET_{50} ของกระดาษ WHO และ ET_{90} ทั้งกระดาษ WHO และ KU ไม่สามารถหาค่าได้ ภายใน 30 นาที เนื่องจากจำนวนยุงที่บินหนีออกมาจากกล่องทดลองมีไม่ถึง 50% และ 90% ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบพฤติกรรมการตอบสนองของยุงทั้งแบบก่อนสัมผัส และ หลังการสัมผัสสารเคลือบเมทรีนระหว่างกระดาษ WHO และ KU ในการทดลองให้ยุงมีโอกาสสัมผัสกับสารเคมี 2 การทดลอง คือ Contact Treatment และ Contact Control และในการทดลองที่ให้ยุงไม่มีโอกาสสัมผัสกับสารเคมี 2 การทดลอง คือ Noncontact Treatment และ Noncontact Control โดยใช้วิธีการทดสอบ Log – Rank test ผลการทดสอบพบว่า ยุงแสดงพฤติกรรมการตอบสนองด้วยการหลีกเลี่ยงก่อนการสัมผัสกับสารเคลือบเมทรีนระหว่างกระดาษของ WHO กับ KU แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.0001$) ทุกการทดลองยกเว้นในการทดลอง Contact Treatment

ตารางที่ 4 พฤติกรรมการตอบสนองของยุงมีนิมิตต่อสารเคลือบเมทรีน 0.02 กรัมต่อตารางเมตร ระหว่างทรีทเมนต์ต่าง ๆ เมื่อใช้กระดาษ WHO และ KU พบว่า ยุงมีพฤติกรรมการตอบสนองต่อกระดาษ WHO และ KU เปรียบเทียบระหว่าง Contact Treatment กับ Noncontact Treatment และระหว่าง Contact Treatment กับ Contact Control แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.0001$) และระหว่าง Noncontact Treatment กับ Noncontact Control มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.0080$) ยุงแสดงพฤติกรรมการตอบสนองในการทดลองที่ให้ยุงมีโอกาสสัมผัสกับสารเคมีด้วยการบินหนีออกจากกล่องทดลองแบบ Contact Treatment มากกว่า Contact Control อย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.0001$) ทั้งกระดาษ WHO และ KU เช่นเดียวกับในการทดลองที่ยุงไม่มีโอกาสสัมผัสกับสารเคมี พบว่ามียุงบินหนีออกจากกล่องทดลองแบบ Noncontact Treatment มากกว่า Noncontact Control อย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.0080$) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างยุงที่มีโอกาสสัมผัส และไม่มีโอกาสสัมผัสกับสารเคมี พบว่า มียุงบินหนีออกจากกล่องทดลองแบบ Contact Treatment แตกต่างจาก Noncontact Treatment อย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.0418$) ทั้งกระดาษ WHO และ KU แสดงให้เห็นว่าสารเคมีฆ่าแมลงชนิดเคลือบเมทรีนมีฤทธิ์ในการขับไล่ โดยเฉพาะเมื่อยุงมีโอกาสสัมผัสกับสารเคมีโดยตรง (Contact Treatment)

ถึงแม้ว่าสถานการณ์ของโรคมาลาเรียในประเทศไทยในปัจจุบันนี้ได้ลดความรุนแรงลง แต่โรคมาลาเรียยังคงจัดเป็นโรคติดต่อที่สำคัญโรคหนึ่ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยเสริมหลายปัจจัย ทำให้ยากต่อการจัดการควบคุม ยุงอาจมีการพัฒนาการต้านทานเชิงพฤติกรรมขึ้นตามชีววิสัยในการหาเหยื่อ นอกเหนือจากการได้รับสารเคมีฆ่าแมลงที่ต่อเนื่องกันเป็นประจำ ซึ่งอาจทำให้เกิด

การต้านทาน (physiology resistance) เช่นยุงมินิมัส ที่มีนิสัยชอบเข้าไปหาเหยื่อในบ้านในบางพื้นที่ เมื่อบ้านมีการฉีดพ่นด้วยสารเคมีฆ่าแมลงทำให้ยุงเกิดการระคายเคืองเมื่อได้สัมผัสกับสารเคมี และบินหนีออกไป หรือถูกขับไล่ออกจากบ้านโดยที่ไม่ได้สัมผัสกับสารเคมีโดยตรงแต่อาจเนื่องมาจากกลิ่นของสารเคมีหรือเกิดขึ้นทั้ง 2 แบบ ทำให้ยุงมีพฤติกรรมตอบสนองโดยการสร้างการต้านทานเชิงพฤติกรรมขึ้นมา โดยยุงจะบินหนีออกจากบ้านนั้นทันที การต้านทานเชิงพฤติกรรมนี้อาจมีบทบาทในการช่วยลดโอกาสในการถ่ายทอดเชื้อมาลาเรียลงได้ (Roberts et al., 2000)

จากพฤติกรรมตอบสนองของยุงต่อกระดาษชุบเดลด้าเมทธรินทั้งกระดาษ WHO และ KU โดยที่ขาของยุงได้สัมผัสกับสารเคมีโดยตรง จนเกิดการระคายเคืองต้องบินหนีออกจากกล่องทดสอบและบางส่วนก็สลบไป แต่หลังจากการทดสอบผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่ายุงที่สลบส่วนใหญ่จะฟื้น ทำให้ทราบค่าเดลด้าเมทธริน 0.02 กรัมต่อตารางเมตร ไม่ได้มีฤทธิ์ในการฆ่ายุงแต่ทำให้ยุงเกิดการระคายเคือง ดูได้จากอัตราการหนีของยุงออกจากกล่อง Contact Treatment มากกว่า Contact Control ($P < 0.05$) ส่วนการที่ยุงไม่ได้สัมผัสโดยตรงจากกระดาษชุบเดลด้าเมทธรินและมีฤทธิ์ในการขับไล่ยุง ดูได้จากอัตราการหนีของยุงออกจากกล่องที่มีทรีทเมนต์ Noncontact Treatment แตกต่างจากกล่องควบคุม Noncontact Control ($P < 0.05$) ซึ่งช่วยลดโอกาสในการเข้ากัดคนของยุงมินิมัสได้ และจากผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระดาษชุบเดลด้าเมทธรินระหว่างกระดาษ WHO และ KU โดยพิจารณาจากการแสดงพฤติกรรมตอบสนองของยุงทุกทรีทเมนต์แล้วพบว่าให้ผลที่แตกต่างกันทั้งสิ้น ($P < 0.05$) ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปคงจำเป็นต้องใช้กระดาษ WHO ซึ่งเป็นที่ยอมรับในเชิงคุณภาพ หรือต้องปรับปรุงพัฒนาวิธีการผลิตกระดาษทดลองขึ้นใหม่ให้มีประสิทธิภาพในการใช้งานไม่แตกต่างจากกระดาษขององค์การอนามัยโลก

ในการศึกษาครั้งนี้ยุงมินิมัส ที่ได้สัมผัสโดยตรงกับสารเคมีเดลด้าเมทธรินที่ชุบกระดาษทั้งกระดาษ WHO และ KU มีพฤติกรรมตอบสนองต่อเดลด้าเมทธรินมากกว่าการที่ยุงไม่ได้สัมผัสโดยตรง ดูได้จากจำนวนยุงที่บินหนีออกมาจากกล่องที่มีทรีทเมนต์แบบ Contact Treatment มีมากกว่ากล่องที่มีทรีทเมนต์แบบ Noncontact Treatment (ตารางที่ 1) และค่า ET_{50} กับ ET_{90} จากกล่องที่มีทรีทเมนต์แบบ Contact Treatment ต่ำกว่ากล่องที่มีทรีทเมนต์แบบ Noncontact Treatment (ตารางที่ 2) จากงานวิจัยของ Chareonviriyaphap (2001) ใช้กระดาษชุบเดลด้าเมทธรินความเข้มข้น 0.0625 กรัมต่อตารางเมตร ทดสอบกับยุงมินิมัสที่เลี้ยงในห้องเลี้ยงแมลง เปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้ที่ใช้ความเข้มข้นเพียง 0.02 กรัมต่อตารางเมตร ก็น่าจะเพียงพอแล้วเพราะถ้ายังใช้สารเคมีฆ่าแมลงที่มีความเข้มข้นสูงมาก ยุงอาจจะสร้างความต้านทานทางสรีระมากขึ้น ทำให้การควบคุมยุงพาหะนำโรคมาลาเรียยากขึ้น เช่นเดียวกับผลงานวิจัยของ Chareonviriyaphap (1997) ในประชากรยุงอัลบิมานุส (*An. albimanus* Wied.) ในอเมริกากลาง

และอเมริกาใต้ที่เป็นโคโลนีรุ่นลูกจากห้องเลี้ยงแมลงประเทศกัวเตมาลา และประชากรยุงที่เก็บจากภาคสนามที่ประเทศเบลิส เปรียบเทียบพฤติกรรมการตอบสนองเกี่ยวกับการระคายเคือง เมื่อยุงได้สัมผัสกับเดลด้าเมทรินโดยตรงระหว่างความเข้มข้น 0.0003 กรัมต่อตารางเมตร กับ 0.0019 กรัมต่อตารางเมตร พบว่า สารเดลด้าเมทรินความเข้มข้น 0.0003 กรัมต่อตารางเมตร ทำให้ยุงบินหนีออกจากกล่องทดสอบมากกว่า และค่า ET_{50} กับ ET_{90} ก็ต่ำกว่าความเข้มข้น 0.0019 กรัมต่อตารางเมตร ด้วย

อัตราการตายของประชากรยุงทั้งที่บินหนีออกมา และยังคงอยู่ในกล่องทดสอบดำ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่ายุงสร้างการต้านทานเชิงพฤติกรรมต่อเดลด้าเมทรินอย่างเข้มข้น แต่บางที่อัตราการตายของยุงที่ยังคงอยู่ในกล่องทดสอบดำ อาจจะเนื่องมาจากยุงหลีกเลี่ยงการเกาะบนกระดาษชุบเดลด้าเมทริน โดยบินไปเกาะพักอยู่ตามมุมของกล่อง หรือตรงส่วนที่ไม่มีกระดาษชุบเดลด้าเมทรินก็ได้ (รายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะและส่วนประกอบของกล่องทดสอบอธิบายโดย Chareonviriyaphap and Aum-Aong (2000))

อายุของยุงมีนิมัส ที่ใช้ในการทดลองนี้เกี่ยวข้องกับผลการทดลองด้วย ซึ่งสนับสนุนสมมติฐานของ Hamon and Eyraud (1961) ในเรื่องอายุของยุงแกมเบีย (*An. gambiae*) และยุงฟุนีสต (*An. funestus* Giles.) ที่ใช้ในการศึกษาพฤติกรรมการตอบสนองเกี่ยวกับการระคายเคืองต่อ DDT คือยุงที่มีอายุมากจะตอบสนองเกี่ยวกับการระคายเคืองต่อสารเคมีฆ่าแมลงน้อยกว่ายุงที่มีอายุน้อย ในการทดลองนี้ เราจึงใช้ยุงอายุ 3-6 วันเท่านั้น และจากการทดลองครั้งนี้พบว่าเวลาที่ประชากรยุงจำนวน 50% และ 90% ใช้ในการบินหนีออกจากกล่องทดลอง เมื่อสัมผัสกับกระดาษชุบเดลด้าเมทรินของ KU โดยตรง ช้ากว่า (คือค่า ET_{50} และ ET_{90} สูงกว่า) กระดาษของ WHO ซึ่งความแตกต่างกันนี้ ($P < 0.05$) บางทีนอกจากอายุของยุงที่ใช้ทดสอบแล้ว อาจจะเนื่องมาจากปัจจัยอื่นด้วย เช่น ความสมบูรณ์ของยุงที่ใช้ทดสอบแล้ว อาจจะเนื่องมาจากปัจจัยอื่นด้วย เช่น ความสมบูรณ์ของยุง, Gonotrophic cycle ของยุง ซึ่งอธิบายโดย Busvine (1964) หรือแม้แต่อุณหภูมิ, ความชื้นสัมพัทธ์ของสภาพแวดล้อมที่ทำการทดสอบ, ช่วงเวลาในการทดสอบ, ผู้ช่วยทดสอบ (กลิ่นตัว, สีเสื้อ, เพศ) ก็มีผลกับพฤติกรรมการหลีกเลี่ยงของยุงทั้งสิ้น

การศึกษานี้ทดลองเฉพาะยุงที่เลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลงเท่านั้น เพื่อให้การศึกษาพฤติกรรมการตอบสนองต่อเดลด้าเมทรินมีความสมบูรณ์ และมีประโยชน์ต่อการควบคุมยุงมีนิมัสในประเทศไทยได้ดี ควรจะทำการทดลองกับประชากรยุงที่เก็บได้ในภาคสนามหรือพื้นที่ที่มีการระบาดของยุงชนิดนี้อยู่ด้วย และชุดกล่องทดสอบพฤติกรรมการหลีกเลี่ยงนี้สามารถใช้ทดสอบพฤติกรรมการต้านทานของยุงชนิดอื่น ๆ ต่อสารเคมีฆ่าแมลงได้ทุกชนิดด้วย

Table 1. Mortalities of *Anopheles minimus* females after a 24 holding period following exposures in contact and noncontact trials with WHO and KU deltamethrin impregnated papers in excito-repellency tests.

Condition	Paper	Trials	Number		% Mortality	
			Tested	Escaped (%)	Escaped	Not escaped
Contact	WHO	Treatment	100	96 (96)	27	0
		Control	100	7 (7)	0	0
	KU	Treatment	100	98 (98)	2	0
		Control	100	32 (32)	0	0
Noncontact	WHO	Treatment	100	31 (31)	0	0
		Control	100	19 (19)	0	0
	KU	Treatment	100	75 (75)	0	0
		Control	100	59 (59)	0	0

Table 2. Time in minutes for 50 (ET₅₀) and 90 (ET₉₀) of *Anopheles minimus* females to escape from WHO and KU exposure chambers with 0.02 g/m² deltamethrin.

Types of papers	Contact Treatment		Noncontact Treatment	
	ET ₅₀ (นาที)	ET ₉₀ (นาที)	ET ₅₀ (นาที)	ET ₉₀ (นาที)
WHO	3	13	-	-
KU	6	17	18	-

Table 3. Comparison of escape responses of *Anopheles minimus* between WHO and KU 0.02 g/m² deltamethrin impregnated papers

Test Populations	Contact Treatment	Contact Control	Noncontact Treatment	Noncontact Control
<i>Anopheles minimus</i>	WHO vs. KU	WHO vs. KU*	WHO vs. KU*	WHO vs. KU*

* จากวิธีทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2

Table 4. Comparison of escape responses of *Anopheles minimus* between contact and noncontact trials, contact and control trials and noncontact and control trials with WHO and KU impregnated papers.

Dose of insecticide Deltamethrin 0.02 g/m ²	Contact Treatment vs. Noncontact Treatment	Contact Treatment vs. Contact Control	Noncontact Treatment vs. Noncontact Control
WHO	P=.0001	P=.0001	P=.0080
KU	P=.0001	P=.0001	P=.0418

เอกสารอ้างอิง

- Busvine JR. The significance of DDT – irritability tests on mosquitoes. Bull WHO 1964 ; 31 : 645-656.
- Chareonviriyaphap T, Roberts DR, Andre RG, Harlan HH, Manguin S, Bangs MJ. Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*, a malaria vector in the Americas. J Am Mosq Control Assoc 1997 ; 13 : 171–183.
- Chareonviriyaphap T, Aum-Aong B. Improved excito-repellency escape chamber for behavioral tests on mosquitoes. Mekong Malaria Forum 2000; 5 : 82–86.
- Chareonviriyaphap T, Sungvornyothin S, Prabaripai A. Insecticide-induced behavioral responses of *Anopheles minimus*, a malaria vector in Thailand. J Am Mosq Control Assoc 2001;17:13-22.
- Hamon J, Eyraud M. Study of physiological factors conditioning in *Anopheles* irritability to DDT. Riv Malariol 1961; 40: 219-640.
- Hongvivatana T, Leerapan P, Smithsampan M. An observational study of DDT house spraying in a rural area of Thailand. J Trop Med Hyg 1982; 85: 245-250.
- Mantel N, Haenzel W. Statistic aspects of the analysis of data from retro-spective studies of diseases. J Natl Cancer Inst 1959; 22: 719–748.
- Nutsathapana S, Sawadiwongphorn P, Chitprarop U, Cullen JR. The behavior of *Anopheles minimus* theobald (Diptera: Culicidae) subjected to differing levels of DDT selection pressure in northern Thailand. Bull Entomol Res 1986; 76: 303-312.
- Poolsuwan S. Malaria in prehistoric Southeast Asia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1995; 26: 3-22.
- Prasittisuk M. Comparative study of pyrethroids impregnated mosquito nets with DDT residual spraying for malaria control in Thailand. Bangkok, Thailand : Mahidol University, 1994. PhD. Thesis.
- Rattanarithikul R, Panthusiri P. Illustrated keys to the medically important mosquitoes of Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1994; 25 (suppl 1): 1-66.
- Roberts DR, Andre RG. Insecticide resistance issues in vector – borne disease control. J Trop Med Hyg 1994; 50: 21-34.

Roberts DR, Alecrim WD, Hshieh P, Grieco JP, Bangs M, Andre RG, Chareonviriyaphap T. A probability model of vector behavior : effects of DDT repellency, irritancy, and toxicity in malaria control. J Vector Ecol 2000 ; 25 : 48-61.

WHO. Vector resistance to pesticides. Fifteenth Report of the WHO Committee on Vector Biology and Control. 1992 ; 35 : 143-148.

ผลของอุณหภูมิต่อพฤติกรรมการหลีกเลี่ยงสารเคมีฆ่าแมลงดีธิดีทีใน ยุงก้นปล่องมินิมัส เอ

อังฉริยา ปราบอริพาย พบ.ม.(สถิติประยุกต์)	Atchariya Prabaripai M.S. (Applied Statistics)
คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์	Faculty of Liberal Arts and Science.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	Kasetsart University
อมรา นาคสถิตย์ Ph.D.(Medical Entamology)	Amara Naksatit Ph.D.(Medical Entamology)
นภารัตน์ ชลชงการ วท.บ. (Biology)	Naparatt Cholsalingkal, B.Sc. (Biology)
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	Faculty of Science, Mahidol University
ธีรภาพ เจริญวิริยะภาพ Ph.D.(Medical Entamology)	Theeraphap Chareonviriyaphap, Ph.D.
คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	(Medical Entamology)
	Faculty of Liberal Arts and Science.
	Kasetsart University

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินพฤติกรรมการตอบสนองของยุงก้นปล่องมินิมัสต่อสารเคมีฆ่าแมลงดีธิดีทีในห้องปฏิบัติการ ได้ทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ ในห้องปรับอากาศ (27.0-33.0°C) และ นอกห้องปรับอากาศ (33.1-38.0°C) โดยใช้ชุดทดสอบการต้านทานสารเคมีฆ่าแมลงเชิงพฤติกรรม ในแต่ละการทดลอง จะใช้กล่องทดลอง 4 กล่อง ประกอบด้วยชุดทดสอบ 2 กล่องซึ่งถูกออกแบบไว้ให้ยุงได้มีโอกาสสัมผัสและไม่สัมผัสต่อสารเคมีฆ่าแมลง และชุดควบคุม 2 กล่องซึ่งถูกออกแบบให้ยุงได้มีโอกาสสัมผัสและไม่สัมผัสกับกระดาษซึ่งไม่พ่นสารเคมี ผลการศึกษาพบว่ายุงที่สัมผัสกับสารเคมี บินหนีออกมาจากกล่องทดลองมากที่สุด รองลงมาคือยุงที่ไม่สัมผัสกับสารเคมี สำหรับยุงที่สัมผัสและไม่สัมผัสกับกระดาษในชุดควบคุมออกน้อยที่สุด สารเคมีดีธิดีทีมีฤทธิ์ไล่ยุงมากที่ระดับอุณหภูมิในห้องปรับอากาศ และสารดีธิดีทีที่ระดับอุณหภูมิในห้องปรับอากาศ ในการเปรียบเทียบระหว่างสารเคมีฆ่าแมลงสองชนิดดังกล่าว พบว่ายุงที่สัมผัสกับสารเคมีทั้งสองชนิดมีพฤติกรรมการหลีกเลี่ยงที่ไม่แตกต่างกัน ($p=0.069$) แต่ยุงที่ไม่สัมผัสกับสารเคมีมีพฤติกรรมการตอบสนองต่อสารเคมีทั้งสองชนิดแตกต่างกัน ($p=0.021$) การศึกษานี้ชี้ให้เห็นพฤติกรรมการหลีกเลี่ยงสารเคมีฆ่าแมลงของยุงก้นปล่องมินิมัสต่อสารเคมีสองชนิดซึ่งมีความสำคัญและสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนควบคุมยุงพาหะนำโรคมาลาเรียชนิดนี้

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate behavioral responses of *deltamethrin* and *DDT* by *Anopheles minimus* A under a laboratory controlled conditions. Tests were conducted under two different temperature levels, 27.0-33.0°C and 33.1-38.0°C. A full test compared the escape responses of test population from each of 4 chambers; one with direct contact with insecticide treated surface, one without direct contact with treated surfaces and 2 control boxes (one with and one without direct contact with surfaces) treated with the carrier only. A more escape response of test population against *DDT* was seen when tests were performed outdoor as compared to the indoor. In contrast, *deltamethrin* showed higher responses from indoor tests than

outdoor tests. There was no significant differences in behavioral contact responses between deltamethrin and DDT ($P=0.069$). Statistically significant responses in escape pattern between DDT and deltamethrin were found under noncontact conditions ($P=0.021$). We conclude that behavioral responses of *An. minimus* are important in insecticide-malaria control program equation.

ประเด็นสำคัญ	Key words
คิตีที, เดลตามิทริน, มาลาเรีย, ยุงก้นปล่อง	DDT, Deltamethrin, Malaria, <i>Anopheles</i>
มินิมัส เอ, พฤติกรรมการหลีกเลี่ยงสารเคมี	<i>minimus</i> Species A, Avoidance behavior, Excito-repellency

บทนำ

มาลาเรียเป็นโรคติดต่อที่สำคัญในประเทศไทย มีเชื้อปรสิตพลาสมาเดียม (*Plasmodium*) เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค⁽¹⁾ และมียุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค จากสถิติรายงานประจำปีของกองมาลาเรียในปี 2545 พบว่ามีผู้ติดเชื้อมาลาเรียจำนวน 47,948 รายจากจำนวนผู้ตรวจเลือด 3,936,014 คน และพบว่ามีอัตราป่วย 0.82 ต่อประชากร 1,000 คน⁽²⁾ โรคมาลาเรียในประเทศไทยนำโดยยุงก้นปล่องที่สำคัญได้แก่ยุงมินิมัสซึ่งจัดเป็นยุงพาหะชนิดซับซ้อน ที่นำเชื้อมาลาเรียและแพร่กระจายอยู่ทั่วประเทศ ยุงพาหะชนิดซับซ้อนกลุ่มนี้มีอยู่อย่างน้อย 3 ชนิดในประเทศไทย คือ Species A พบกระจายอยู่ทั่วไป Species C และ D พบเฉพาะที่จังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดตาก ยุงชนิดนี้เพาะพันธุ์ตามลำธารที่มีน้ำใสสะอาดไหลเอื่อยๆ จะไม่เพาะพันธุ์ในแหล่งน้ำนิ่งหรือน้ำไหลแรงๆ⁽³⁾ ตัวเต็มวัยเพศเมียมีนิสัยชอบดูดเลือดคนทั้งภายในบ้าน (endophagic) และนอกบ้าน (exophagic) ทำให้ยุงชนิดนี้มีความสำคัญมากในการแพร่เชื้อ และมีความใกล้ชิดกับมนุษย์มากที่สุด⁽⁴⁾

สำหรับประเทศไทย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข เป็นหน่วยงานหลักในการดูแลและควบคุมสถานการณ์ไข้มาลาเรียทั่วประเทศ กองมาลาเรียได้นำคิตีทีเข้ามาใช้ควบคุมยุงพาหะนำโรคมาลาเรียตั้งแต่ปี พ.ศ.2483 เป็นต้นมา⁽⁵⁾ โดยนำมาพ่นที่ฝาผนังบ้านด้านใน ณ พื้นที่ที่มีไข้มาลาเรียระบาด (endemic area) ปีละ 1-2 ครั้ง แต่ในระยะต่อมาเมื่อก่อนรัฐสั่งงดใช้แล้วได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับปัญหาผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้นตามมาหลังจากมีการใช้คิตีทีติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากการสลายตัวช้า (long persistence) และมีพิษต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (non-target organism) ทำให้คิตีทีที่ใช้ในการควบคุมยุงพาหะนำโรคมาลาเรียในประเทศไทยถูกเลิกสั่งซื้อและใช้น้อยลงไปตามลำดับตั้งแต่ปีพ.ศ.2530 นอกจากนี้ยุงพาหะนำโรคมาลาเรียเริ่มสร้างความต้านทานต่อคิตีที ทำให้ต้องหามาตรการอื่นขึ้นมาทดแทน เช่นการใช้สารเคมีในกลุ่มไพริทรอยด์สังเคราะห์ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำต่อสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์เลี้ยงในธรรมชาติ สารไพริทรอยด์สังเคราะห์ที่นำมาใช้ เช่น เดลตามิทริน (deltamethrin) ใช้โดยการพ่นฝาผนังด้านในและเพอร์เมทริน (permethrin) นำมาใช้ชุบมุ้งและแจกจ่ายให้กับประชาชนที่อยู่ในพื้นที่ที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคมาลาเรีย นอกจากนี้สารเคมีในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเด่นในการขับไล่ (excito-repellency) ยุงพาหะนำโรคมาลาเรียเช่นเดียวกับคิตีที⁽⁶⁾

เดลตามิทรินเป็นสารเคมีในกลุ่มไพริทรอยด์สังเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูง ออกฤทธิ์ได้อย่างรวดเร็ว และนำมาใช้ควบคุมยุงพาหะนำโรคมาลาเรียในประเทศไทย โดยฉีดพ่นตามฝาผนังบ้านด้านใน เพื่อให้ยุงที่เข้า

มากัดคนในบ้าน และเกาะพักบนฝาผนังได้รับพิษของสารเคมีและตายก่อนที่จะขยายพันธุ์ต่อไป ผลจากการศึกษาพบว่า ยุงพาหะนำโรคจะบินเข้าไปในบ้านที่ติดพันด้วยสารเคมีฆ่าแมลงน้อยกว่าบ้านที่ไม่ได้ติดพัน หรือ ยุงพาหะจะบินหนีออกจากบ้านที่ติดพันด้วยสารเคมีฆ่าแมลง^(7,8,9) ทำให้คิดว่าการที่ไม่มียุงตายในบ้านที่พ่นสารเคมีฆ่าแมลงอาจจะเนื่องมาจากยุงสร้าง ความต้านทานต่อสารเคมีฆ่าแมลงในระดับหนึ่ง หรือสารเคมีที่นำมาใช้ด้อยประสิทธิภาพไม่สามารถฆ่ายุงได้ ในทางตรงกันข้ามการที่ยุงเกิดการระคายเคืองเนื่องจากสัมผัสกับสารเคมีฆ่าแมลง หรือถูกขับไล่ออกจากบ้านที่ติดพันด้วยสารเคมีฆ่าแมลง เป็นการช่วยลดโอกาสที่ยุงจะเข้ากัดคนและถ่ายทอดเชื้อมาลาเรียให้น้อยลง ซึ่งสภาพการณ์เช่นนี้เรียกว่า “การต้านทานเชิงพฤติกรรมของยุงพาหะนำโรคที่มีต่อสารเคมีฆ่าแมลง (Behavioral resistance)”^(7,8,9) ในการศึกษาถึงพฤติกรรมการตอบสนองของยุงในการศึกษาค้นคว้านี้ใช้เครื่องมือทดสอบที่มีชื่อว่า “กล่องทดสอบพฤติกรรมการหลีกเลี่ยงของยุงพาหะนำโรคมาลาเรียที่มีต่อสารเคมีฆ่าแมลง [Excito-Repellency Escape Chamber (EREC)]”⁽¹⁰⁾ โดยที่เครื่องมือนี้ถูกออกแบบคล้ายบ้านจำลองหรือกระท่อม ในธรรมชาติ มีลักษณะเป็นกล่องสี่เหลี่ยมที่ทำด้วยสแตนเลส มีประตูทางเข้าและหน้าต่างด้านละหนึ่งช่องทาง ภายในกล่องออกแบบไว้ให้ยุงสัมผัสสารเคมีได้ 2 แบบ คือให้ยุงได้มีโอกาสสัมผัสโดยตรงต่อสารเคมีโดยบุกล่องด้วยกระดาษที่ชุบด้วยสารเคมีซึ่งยึดติดกับผนังด้านในกับอุปกรณ์ชนิดพิเศษ และไม่สัมผัสโดยตรงต่อสารเคมีโดยมีอุปกรณ์ชั้นในอีกชั้นหนึ่งซึ่งทำด้วยตาข่าย (มุ้งลวด) กันไว้ เพื่อไม่ให้ส่วนใด ๆ ของยุงได้สัมผัสสารเคมีฆ่าแมลงเลย และติดตามพฤติกรรมที่เกิดขึ้น เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้ได้ปรับปรุงและพัฒนาจากรูปแบบเดิมที่ประดิษฐ์โดย Roberts et al. (1997)⁽¹¹⁾ คือสามารถพับเก็บได้ เพื่อสะดวกในการเคลื่อนย้ายสำหรับการทดสอบในภาคสนาม

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามพฤติกรรมการตอบสนองต่อสารเคมีฆ่าแมลงชนิดเคลตตามะทธรินและดิลีทิงในยุงก้นปล่องมินิมัส และเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระดาษชุบสารเคลตตามะทธรินและกระดาษชุบสารดิลีทิงที่สังเคราะห์จากองค์การอนามัยโลกในการขับไล่ยุง มินิมัส

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. ยุงก้นปล่องมินิมัส เอ

ยุงมินิมัส เอ ที่นำมาทดสอบนี้ได้มาจากการเก็บตัวอย่างจากคอกเลี้ยงสัตว์ อำเภอวังทอง จังหวัดแพร่ ในปี 2537 และนำมาเลี้ยงไว้ภายใต้เงื่อนไขของกองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี ค่อมานำมาเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลงของภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร ยุงชนิดนี้เป็นยุงที่มีความไวต่อสารเคมีชนิดดิลีทิงและเคลตตามะทธริน รายละเอียดเพิ่มเติมของยุงมินิมัสจากรายงานของ Chareonviriyaphap et al. (2001)⁽⁹⁾

ยุงมินิมัส เอ เลี้ยงตามวิธีการของ Chareonviriyaphap et al. (1997)⁽⁸⁾ สำหรับยุงที่ใช้ในการทดสอบ คือ ยุงตัวเต็มวัยเพศเมียอายุ 3-5 วันที่ไม่ได้กินเลือด (งดเลือด 6 ชั่วโมงก่อนการทดสอบ) ให้แต่เฉพาะสารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 10% นำยุงมาทำการทดลองโดยไม่ต้องให้อุณหภูมิห้องก่อนการทดลอง

2. กระดาษชุบสารเคมีฆ่าแมลง (Insecticide-Impregnated papers)

กระดาษชุบสารเคลตตามะทธริน (deltamethrin) ความเข้มข้น 6.66 มิลลิกรัมต่อตารางเมตร และกระดาษชุบสารดิลีทิง (DDT) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อตารางเมตร ขนาด 27.5 x 35.5 ซม.² สังเคราะห์จากองค์การอนามัยโลก (WHO)

3. วิธีการทดลอง (Methods)

ในการทดลองครั้งนี้ใช้สารเคมี 2 ชนิด คือ สารเคเลมเทธริน และสารดีคิที ที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ ในห้องปรับอากาศช่วงอุณหภูมิระหว่าง 27.0-33.0 องศาเซลเซียส และนอกห้องปรับอากาศช่วงอุณหภูมิระหว่าง 33.1-38.0 องศาเซลเซียส บันทึกความขึ้นสัมผัสและเวลาขณะทำการทดลองด้วยทุกครั้ง ทำซ้ำ 4 ครั้ง การทดลองแต่ละครั้งจะใช้แอลกอฮอล์ชุบสำลีเช็ดทำความสะอาดกล่องทดลองก่อนใช้ แล้วสุ่มกล่องทดลองให้ได้รับสภาพการทดลองอย่างใดอย่างหนึ่งข้างต้น ดำเนินการทดลองโดยนำขุงใส่เข้าไปในกล่องทดลองแต่ละกล่องๆ ละ 25 ตัว และปิดประตูทางเข้าและทางออกเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ขุงปรับสภาพแวดล้อมภายในกล่องทดลอง หลังจากนั้นเปิดช่องทางให้ขุงบินออก และนับจำนวนขุงที่บินหนีออกจากกล่องทั้ง 4 กล่อง บันทึกจำนวนขุงที่บินหนีออกจากกล่องทดลองทุก ๆ 1 นาที ใช้เวลาในการทดลอง 30 นาที ตามวิธีการของ Chareonviriyaphap et al (1997) หลังจากนั้นนำขุงที่บินหนีออกจากกล่อง และที่คงเหลืออยู่ในกล่องมาเลี้ยงค่อให้น้ำหวานตามปกติ และบันทึกจำนวนขุงที่ตายภายหลังการทดลอง 24 ชั่วโมง

การดำเนินการทดลองจัดสภาพการทดลอง 2 ลักษณะ โดยใช้ชุดทดสอบ EREC ซึ่งมีกล่องทดลอง 4 กล่อง คือ

- (1) ให้ขุงมีโอกาสสัมผัสกับสารเคมี จำนวน 2 กล่อง ให้กล่องหนึ่งมีกระดาษชุบสารเคมีบุพื้นผนังด้านในกล่องทดลอง (Contact Treatment) และอีกกล่องหนึ่งมีกระดาษควบคุมบุพื้นผนังด้านในกล่องเป็นกล่องควบคุม (Contact Control)
- (2) ให้ขุงไม่มีโอกาสสัมผัสกับสารเคมี จำนวน 2 กล่อง ให้กล่องหนึ่งมีกระดาษชุบสารเคมีบุพื้นผนังชั้นนอกและผนังชั้นในของกล่องทดลอง (Noncontact Treatment) และอีกกล่องหนึ่งมีกระดาษควบคุมบุพื้นผนังชั้นนอกและผนังชั้นในของกล่องทดลองเป็นกล่องควบคุม (Noncontact Control)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองคือจำนวนขุงที่บินออกมาจากกล่องทดลองในแต่ละนาที คำนวณหาเวลาที่ประชากรขุงจำนวน 50% (ET_{50}) และ 90% (ET_{90}) บินหนีออกไปจากกล่องทดลอง โดยใช้ Probit analysis เปรียบเทียบพฤติกรรมการบินหนีของขุงต่อสารเคมี 2 ชนิด โดยใช้การวิเคราะห์การอยู่รอด ด้วยการทดสอบแบบ Log-rank test โดยใช้โปรแกรม SAS (Release 6.10)

ผลการศึกษา

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์ขุงที่บินหนีออกมาจากกล่องทดลอง และเปอร์เซ็นต์การตายของขุงมินิมัส ทั้งที่บินหนีออกมา (Escaped) และ ไม่บินหนีออกมา (Not escaped) จากกล่องทดลอง เมื่อใช้กระดาษชุบสารเคเลมเทธริน 6.66 มิลลิกรัมต่อตารางเมตร และ ดีคิที 2 กรัมต่อตารางเมตร ในการทดลองที่ขุงสัมผัส (Contact, C) กับสารเคมี และ ไม่มีสารเคมี (หน่วยควบคุม) พบว่าอยู่ในช่วง 0-3 % เมื่อใช้กระดาษชุบสารเคเลมเทธริน ที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ ไม่ปรากฏว่ามีขุงตายเมื่อใช้กระดาษชุบสารดีคิที ทั้งสารเคเลมเทธรินและดีคิทีมีประสิทธิภาพในการจับไล่ขุงได้ดี (> 60%) ทั้งสองระดับอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ โดยสารเคเลมเทธรินจับไล่ขุงได้ถึง 87% ที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ และ 73% ที่อุณหภูมินอกห้องปรับอากาศ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

พบว่ามียุงบินออกมาจากกล่องทดลอง 31% ที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ และ 75% ที่อุณหภูมินอกห้องปรับอากาศ สำหรับสารคิโธซันได้ถึง 68% ที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ และ 95% ที่อุณหภูมินอกห้องปรับอากาศ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่ามียุงบินออกมาจากกล่องทดลอง 16% ที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ และ 25% ที่อุณหภูมินอกห้องปรับอากาศ

การทดลองที่ยุงไม่ได้สัมผัส (Noncontact, NC) กับสารเคมี (ตารางที่ 1) เปรียบเทียบการตายของยุงที่บินหนี และ ไม่บินหนี ออกมาอยู่ในช่วง 0-2% เมื่อใช้กระดาษชุบสารเคลตามเทธริน ที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ ไม่ปรากฏว่ามียุงตายเมื่อใช้กระดาษชุบสารคิโธซัน ทั้งสารเคลตามเทธรินและคิโธซันมีประสิทธิภาพในการขับไล่ยุงได้ดีเกินกว่า 50% ที่อุณหภูมิทั้งสองระดับ โดยสารเคลตามเทธรินขับไล่ยุงได้ถึง 72% ที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ และ 60% ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ เปรียบเทียบกับยุงที่ไม่สัมผัสกับสารควบคุม พบว่ามียุงบินออกมาจากกล่องทดลอง 48% ที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ และ 58% ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ และ สำหรับสารคิโธซันมีฤทธิ์ขับไล่ยุงได้ 51% ที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ และ 76% ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ เปรียบเทียบกับยุงที่ไม่สัมผัสกับสารควบคุม พบว่ามียุงบินออกมาจากกล่องทดลอง 33% ที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ และ 52% ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ

จากการทดลองทั้งหมดพบว่า การที่ยุงสัมผัสกับสารเคมีทั้งสองชนิดนั้นมีประสิทธิภาพในการขับไล่ยุงได้ดีกว่า ยุงที่สัมผัสกับสารควบคุม ยกเว้นกรณีเดียวที่ยุงสัมผัสกับสารเคมีที่ใช้สารเคลตามเทธริน (Contact Treatment) ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ ซึ่งมีจำนวนยุงบินออกมาจากกล่องทดลองที่ใช้สารควบคุมมากกว่าที่ใช้สารเคมี

ตารางที่ 2 และ กราฟที่ 1-4 แสดงเปอร์เซ็นต์ยุงที่บินหนีออกมาในแต่ละนาทีก่อนและจำนวน ค่า ET_{50} ของยุงที่บินหนีออกจากกล่องทดลองพฤติกรรมกรรมการหลักหนีในการทดลองที่ยุงสัมผัส (Contact) กับกระดาษชุบสารคิโธซัน และสารเคลตามเทธริน ได้ว่า สารคิโธซันที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ และนอกห้องปรับอากาศ มีค่า ET_{50} เท่ากับ 10 และ 2 นาที ตามลำดับ ส่วนค่า ET_{75} ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ เท่ากับ 5 นาที และที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ ยุงบินหนีออกจากกล่องไม่ถึง 75 % สำหรับสารเคลตามเทธรินที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ และนอกห้องปรับอากาศ มีค่า ET_{50} เท่ากับ 3 และ 7 นาที ตามลำดับ ส่วนค่า ET_{75} ที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ เท่ากับ 8 นาที และที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ ยุงบินหนีออกมาไม่ถึง 75 %

ตารางที่ 2 แสดงค่า ET_{50} และ ET_{75} ของยุงที่บินหนีออกจากกล่องทดลองพฤติกรรมกรรมการหลักหนีในการทดลองที่ยุงไม่ได้สัมผัส (Noncontact) กับสารคิโธซันและสารเคลตามเทธริน พบว่า สารคิโธซันที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ และนอกห้องปรับอากาศ มีค่า ET_{50} เท่ากับ 29 และ 12 นาที ตามลำดับ ส่วนค่า ET_{75} ที่อุณหภูมิ T_2 เท่ากับ 25 นาที สำหรับสารเคลตามเทธรินที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ และนอกห้องปรับอากาศ มีค่า ET_{50} เท่ากับ 18 และ 21 นาที ตามลำดับ ส่วนค่า ET_{75} ที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ เท่ากับ 30 นาที เมื่อเปรียบเทียบค่า ET_{50} ของสารเคมีทั้งสองชนิด ปรากฏว่าค่า ET_{50} ในการทดลองที่ยุงสัมผัส มีค่าต่ำกว่าในการทดลองที่ยุงไม่ได้สัมผัส และที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ ปรากฏว่าไม่มียุงบินหนีออกมาเกิน 75% ในการทดลองที่ใช้สารคิโธซันทั้งที่ยุงที่สัมผัสกับสารเคมีและสารควบคุม

เปอร์เซ็นต์ยุงที่บินหนีออกจากกล่องทดลองระหว่างทรีทเมนต์ต่าง ๆ เมื่อใช้สารเคมีทั้ง 2 ชนิด และสารควบคุม (ตารางที่ 3) พบว่าพฤติกรรมกรรมการตอบสนองของยุงระหว่างทรีทเมนต์ ต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทุกคู่ ($P < 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารทั้ง 2 ชนิด ในการทดลองที่ให้ยุงสัมผัสกับสารเคมีพบว่าพฤติกรรมกรรมการตอบสนองของยุงไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$)

ตารางที่ 1 เปอร์เซนต์ยุงที่บินหนีออกมาจากกล่องทดลอง และเปอร์เซ็นต์การตายของยุงมินิมัส เอ ทั้งที่บินหนีออกมา (Escaped) และไม่บินหนีออกมา (Not escaped) จากกล่องทดลอง เมื่อใช้กระดาษชุบสารเคลตามเทธริน 6.66 มิลลิกรัมต่อตารางเมตร และดีดีที 2 กรัมต่อตารางเมตร ในการทดลองที่ยุงสัมผัส (Contact, C) และไม่สัมผัส (Noncontact, NC) กับสารเคมี (Treatment) และสารควบคุม (Control) ที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ (T_1) และนอกห้องปรับอากาศ (T_2)

Insecticides	Temperature	Condition	Escaped		% Mortality			
			C (%)	NC (%)	Escaped		Not Escaped	
					C	NC	C	NC
ดีดีที	T_1	Control	16	33	0	0	0	0
	T_1	Treatment	68	51	0	0	0	0
	T_2	Control	25	52	0	0	0	0
	T_2	Treatment	95	76	0	0	0	0
เคลตามเทธริน	T_1	Control	31	48	0	0	0	0
	T_1	Treatment	87	72	0	0	0	0
	T_2	Control	75	58	0	0	0	1
	T_2	Treatment	73	60	0	0	3	2

ตารางที่ 2 เวลา (นาทีก) ที่ยุงมินิมัส เอ จำนวน 50% (ET_{50}) และ 75% (ET_{75}) บินหนีออกมาจากกล่องทดลองที่ทดสอบด้วยกระดาษชุบสารดีดีที 2 กรัมต่อตารางเมตร และสารเคลตามเทธริน 6.66 มิลลิกรัมต่อตารางเมตร ในการทดลองที่ยุงสัมผัส (Contact, C) และไม่สัมผัส (Noncontact, NC) กับสารเคมี ที่อุณหภูมิในห้องปรับอากาศ (T_1) และนอกห้องปรับอากาศ (T_2)

Insecticides	Temperature	ET_{50}		ET_{75}	
		C	NC	C	NC
ดีดีที	T_1	10	29	-	-
	T_2	2	12	5	25
เคลตามเทธริน	T_1	3	18	8	-
	T_2	7	21	-	30

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบขุมมินิมัส เอทีบีบีที่บินหนีออกจากกล่องทดลองระหว่างทริทเมนต์ต่าง ๆ เมื่อใช้สารเคมี และ สารควบคุม

Insecticide	Comparing groups	P-value
คิซีที	Contact Control vs Contact Treatment	0.001
	Contact Control vs Noncontact Treatment	0.025
	Contact Treatment vs Noncontact Treatment	0.001
เคลตามาทริน	Contact Control vs Contact Treatment	0.001
	Contact Control vs Noncontact Treatment	0.025
	Contact Treatment vs Noncontact Treatment	0.001
	Contact Treatment คิซีที vs เคลตามาทริน	0.069
	Noncontact Treatment คิซีที vs เคลตามาทริน	0.021

วิจารณ์

การด้านทานสารเคมีเชิงพฤติกรรมหมายถึงการที่ขุมหลักหนีสารเคมีที่อาจจะก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวเอง ซึ่งการหลักหนีสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ การหลักหนีหลังจากได้สัมผัสกับสารเคมี และการหลักหนีก่อนที่จะสัมผัสกับสารเคมี ขุมที่ทดสอบได้มีการพัฒนาการอย่างต่อเนื่องในการหลบหนีหรือหลักหนีสารเคมีซึ่งภาวะปกติขุมไม่สามารถด้านทานได้ พฤติกรรมกรหลักหนีสารเคมีจำแนก (Behavioral Avoidance) หรือการด้านทานเชิงพฤติกรรมนี้สามารถลดโอกาสที่ขุมจะเข้าไปกักคนในบ้านพักอาศัย ถ้าขุมสร้างพฤติกรรมการหลักหนีมากขึ้นเท่าไร ก็ลดโอกาสที่ขุมจะกัดคนและถ่ายทอดเชื้อมาสู่คนให้น้อยลง มากกว่าการใช้สารเคมีฆ่าแมลงฆ่าขุมพาหะเสียบอีก (Roberts et al., 2000)⁽⁷⁾

พฤติกรรมการตอบสนองต่อสารคิซีทีและสารเคลตามาทรินในขุมมินิมัส เอ อาจเป็นเพราะบริเวณส่วนปลายขา (tarsi) ของขุมสัมผัสสารเคมีโดยตรงแล้วขุมเกิดการระคายเคืองจนต้องบินหนีออกจากกล่องทดสอบไป ขุมจำนวนเล็กน้อยที่ตายในการทดสอบ อาจเป็นเพราะขุมที่ใช้ทดสอบมีความอ่อนแอ (เนื่องจากผู้ทดสอบได้เก็บขุมไว้ในแก้วก่อน 1 วัน) ส่วนรูปแบบที่ไม่สัมผัสสารเคมีโดยตรง ขุมได้รับสารเคมีโดยประสาทสัมผัสบน Antennae กระตุ้นให้ขุมเกิดพฤติกรรมการหลักหนีไป ผลการทดสอบที่ได้ออกมาพบว่ารูปแบบที่มีการสัมผัสสารเคมีโดยตรงขุมแสดงพฤติกรรมการตอบสนองออกมามากกว่ารูปแบบที่ไม่สัมผัสสารเคมีโดยตรง ซึ่งเราสามารถนำมาเลือกใช้วิธีการที่เหมาะสมในการควบคุมขุมพาหะชนิดนี้และหาความเข้มข้นของสารเคมีที่นำมาใช้ในสถานการณ์จริงได้โดยไม่ก่อให้เกิดพิษแก่คนและสัตว์

อัตราการตายของประชากรขุมที่บินหนีออกมา และไม่บินหนีออกมา จากกล่องทดลองยังคงต่ำอยู่ แสดงว่าขุมมีความด้านทานเชิงพฤติกรรมต่อสารคิซีทีและสารเคลตามาทรินอยู่มาก ไม่ใช่ขุมทุกตัวมีพฤติกรรมการด้านเชิงพฤติกรรมต่อสารเคมี แต่ขุมบางตัวอาจไม่ได้รับสารเคมีโดยการบินไปเกาะพักอยู่ตรงส่วนต่างๆ ของกล่องทดลองบริเวณที่เป็นสแตนเลส ปัจจัยที่ทำให้รูปแบบการหลักหนีมีความแปรปรวนอาจได้แก่

1) อายุของยุงที่ใช้ทดสอบ ควรใช้ยุงอายุ 3-5 วัน เพราะว่ายุงที่มีอายุนานขึ้นจะตอบสนองต่อสารเคมีล่าช้าแมลงได้น้อยกว่ายุงที่มีอายุน้อย

2) ความสมบูรณ์ของยุง ในขณะที่เคลื่อนย้ายยุงเพื่อไปทำการทดสอบ การปล่อยยุงเข้ากล่องทดสอบ และการนำยุงออกจากกล่องกระดาษแข็งรองรับยุงด้านนอก ควรใช้หลอดดูด (mouth aspirator) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่ เพื่อให้ยุงกระทบกระเทือนน้อยที่สุด เพราะถ้ายุงมีสภาพไม่สมบูรณ์ (ปีกหัก, ขาหลุด) จะทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อนได้

3) เวลาที่ทดสอบต้องอยู่ในช่วง 8.00-16.00 น. เพราะช่วงเวลาลงถึง 16.00 น. เป็นช่วงเวลาที่ยุงออกหาเหยื่อ ยุงอาจแสดงพฤติกรรมตอบสนองคลาดเคลื่อนไป

4) ความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ

5) ลมหายใจ, กลิ่นตัว ของผู้ทดสอบ

ในการทดสอบครั้งนี้เป็นเพียงการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ซึ่งทดสอบกับยุงที่เลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลง ถ้าต้องการให้การศึกษาพฤติกรรมตอบสนองต่อสารเคมีที่และสารเคมีตามธรรมชาติมีข้อมูลมากกว่านี้และสามารถนำไปใช้ควบคุมยุงมีนิมัส เอ ได้ในสถานการณ์ระบาดจริงๆ ควรจะทำการทดสอบในภาคสนามหรือในพื้นที่ที่มีการระบาดของยุงอยู่ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Rattanarithikul R, Panthusiri P. 1994. Illustrated keys to the medically important mosquitoes of Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health ; 25 (supply 1) : 1-66.
2. www.moph.go.th กองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข.
3. ทวี หอมขง. 2543. แมลงศัตรูของคนและสัตว์, พิมพ์ครั้งแรก องค์การค้ำของครูสภา กรุงเทพฯ.
4. Annual Malaria Reports. 1985-1998. Mararia Division, Department of Communicable Disease Control (CDC) . Ministry of Public Health, Thailand.
5. ชีรภาพ เจริญวิริยะภาพ และบุญเสริม อ่วมอ่วม, 2544. กล่องทดสอบการต้านทานสารเคมีฆ่าแมลงเชิงพฤติกรรมในยุงพาหะนำโรคมมาลาเรีย, สาขาวิชาชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
6. Roberts DR, Andre RG. 1994. Insecticide resistance issues in vector - borne disease control. Am. J. Trop. Med. Hyg. ; 50 (supply) : 21 - 34.
7. Roberts DR, Alecrim WD, Hshish P, Grieco JP, Bangs M, Andre RG, Chareonviriyaphap T. 2000. A probability model of vector behavior : effects of DDT repellency, irritancy, and toxicity in malaria control. J. Vector Ecol. ; 25: 48-61.
8. Chareonviriyaphap T, Roberts DR, Andre RG, Harlan HH, Manguin S, Bangs MJ. 1997. Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*, a malaria vector in the Americas. J. Am. Mosq. Control Assoc. ; 13 : 171 - 183.
9. Charoenviriyaphap T, Sungvornyothin S, Rattanatham S, Prabaripai A. 2001. Insecticide-induced Behavioral responses of *Anopheles minimus*, a malaria vector in Thailand. J. Am. Mosq. Control Assoc. ; 17 : 13-22.

10. Charoenviriyaphap T, Aum-Aong B. 2000. Improved excito-repellency escape chamber for behavioral tests on mosquitoes. Mekong Malaria Forum ; 5: 82 - 86.
11. Roberts DR, Chareonviriyaphap T, Harlan HH, Hsieh P. 1997. Methods of testing and analyzing excito-repellency responses of malaria vectors to insecticides. J Am Mosq Control Assoc. 1997 Mar;13(1):13-17.