



# XÂY DỰNG QUY TRÌNH NUÔI MUỖI AEADES AGYPTI TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG DIỆT BỌ GÂY AEADES AGYPTI CỦA TINH DẦU SẢ CHANH (*CYMBOPOGON CITRATUS*) VÀ BẠCH ĐÀN CHANH (*EUCALYPTUS CITRIODORA*)

## Rearing of aedes aegypti mosquitoes in the laboratory and assessing the larvicide of lemongrass oil (*Cymbopogon citratus*) and lemon eucalyptus oil (*Eucalyptus citriodora*) against Aedes aegypti larvae

Hồ Dũng Mạnh<sup>1a\*</sup>, Đinh Ngọc Xuân Hương<sup>1b</sup>, Lê Thị Hồng Hạnh<sup>1c</sup>, Nguyễn Thị Thuỳ Dương<sup>1d</sup>

<sup>1</sup>Khoa Dược, Trường Đại học Lạc Hồng, Biên Hòa, Đồng Nai, Việt Nam

<sup>a</sup>manhhodung@gmail.com; <sup>b</sup>dingngocxuanhuong1311@gmail.com; <sup>c</sup>honghanhle1012@gmail.com; <sup>d</sup>113000107@gmail.com

**TÓM TẮT.** Với mục tiêu tìm kiếm các hợp chất tự nhiên có khả năng bảo vệ con người khỏi sự lan truyền của bệnh sốt xuất huyết (SXH) do muỗi Aedes aegypti và chủ động đánh giá hiệu quả của các dung dịch diệt bọ gây Aedes aegypti, chúng tôi đã xây dựng quy trình nuôi muỗi trong phòng thí nghiệm và đánh giá khả năng diệt bọ gây của tinh dầu sả chanh (*Cymbopogon citratus*) và tinh dầu bạch đàn chanh (*Corymbia citriodora*). Nghiên cứu đã xây dựng các quy trình nuôi muỗi Aedes aegypti bao gồm các bước: cho trứng nở thành bọ gây; nuôi bọ gây thành nhộng; nuôi muỗi; lấy và bảo quản trứng muỗi. Lá sả chanh và bạch đàn chanh được chưng cất bằng phương pháp lôi cuốn theo hơi nước thu được tinh dầu lần lượt có hàm lượng là 0.33% và 2.13%. Phân tích thành phần hoá học tinh dầu bằng phương pháp GC-MS, tinh dầu sả chanh có các hợp chất chính là cis-citral (36.19%) và trans-citral (49.32%). Tinh dầu bạch đàn chanh với các hợp chất chính là (R)-(+)-citronellal (78.55%) và (R)-(+)-β-citronelol (12.08%). Đánh giá khả năng diệt bọ gây Aedes aegypti tuổi 3 hoặc 4 cho thấy đối với sả chanh nồng độ gây chết trung bình LC<sub>50</sub> = 117,93 ppm và LC<sub>90</sub> = 196,57 ppm, trong khi đó đối với bạch đàn chanh LC<sub>50</sub> là 98.46 ppm, và LC<sub>90</sub> là 165.84 ppm. Trong tương lai, chúng tôi có thể chủ động nghiên cứu và tìm kiếm nhiều hợp chất tự nhiên mới có tiềm năng diệt bọ gây Aedes aegypti.

**TỪ KHOẢ:** bọ gây aedes aegypti, tinh dầu, cymbopogon citratus, eucalyptus citriodora, độc tính diệt bọ gây

**ABSTRACT.** We aim to find natural compounds that can protect people from the spread of dengue by Aedes aegypti mosquitoes and proactively evaluate the effectiveness of Aedes aegypti larvicide. Here, we present a protocol for the rearing of Aedes aegypti mosquitoes in the laboratory and evaluate the larvicide of lemongrass oil (*Cymbopogon citratus*) and lemon eucalyptus oil (*Eucalyptus citriodora*) against Aedes aegypti larvae. Four steps to rear Aedes aegypti mosquitoes, including: hatching eggs into larvae; feeding larvae into pupae; raising mosquitoes; take and preserve mosquito eggs. Lemongrass leaves and lemon eucalyptus leaves are extracted by steam distillation obtaining an oil yield of 0.33% and 2.13%, respectively. The two essential oils were analyzed by GC-MS method. The main compounds in lemongrass oil are cis-citral (36.19%) and trans-citral (49.32%). The main compounds in lemon eucalyptus essential oil are (R)-(+)-citronellal (78.55%) and (R)-(+)-β-citronelol (12.08%). Larvicide of lemongrass oil against Aedes aegypti larvae showed that the average lethal concentration LC<sub>50</sub> = 117.93 ppm and LC<sub>90</sub> = 196.57 ppm. Meanwhile, LC<sub>50</sub> is 98.46 ppm, and the LC<sub>90</sub> is 165.84 ppm for lemon eucalyptus oil. In the future, we can actively search for many natural compounds that have the potential to kill Aedes aegypti larvae.

**KEYWORDS:** Aedes aegypti larve, essential oils, cymbopogon citratus, eucalyptus citriodora, larvicide

### 1. GIỚI THIỆU

Sốt xuất huyết Dengue là bệnh truyền nhiễm cấp tính, bệnh lan truyền chủ yếu qua trung gian muỗi Aedes aegypti với hơn 50 triệu người bị mắc hàng năm trên thế giới [1]. Việt Nam là nơi có tỷ lệ mắc bệnh sốt xuất huyết (SXH) cao, lưu hành ở hầu hết các tỉnh/thành phố trên cả nước, nhưng phổ biến hơn ở khu vực phía Nam và thường bùng phát thành dịch lớn vào mùa mưa, nhất là từ tháng 7 đến tháng 10 [2-3]. Hiện chưa có thuốc điều trị đặc hiệu bệnh SXH và cũng chưa có vắc-xin phòng ngừa bệnh SXH nào được cấp phép sử dụng tại Việt Nam. Cho đến nay các biện pháp chủ yếu để hạn chế sự lan truyền bệnh SXH vẫn là diệt bọ gây, diệt muỗi và phòng tránh muỗi đốt.

Hiện nay, việc sử dụng các hoá chất tổng hợp như organophosphate, pyrethroid để tiêu diệt muỗi và bọ gây với mức độ thường xuyên ở qui mô lớn, đang dẫn đến nguy cơ kháng thuốc [4-6], cũng như ảnh hưởng tới môi trường và

sức khoẻ con người. Việc tìm kiếm các chế phẩm tự nhiên để thay thế cho các hoá chất tổng hợp đang được nhiều nhà khoa học quan tâm. Đặc biệt là các tinh dầu thiên nhiên chứa các thành phần có hoạt tính sinh học chống lại vector muỗi [7]. Các nghiên cứu về khả năng diệt bọ gây của các tinh dầu ở Việt Nam rất hạn chế, và có rất ít công bố khoa học theo tác giả được biết.

Các thử nghiệm kiểm tra hiệu quả của các dung dịch còn hạn chế, chủ yếu được thực hiện ở các viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng [8]. Do đó, việc chủ động đánh giá hiệu quả của các sản phẩm diệt bọ gây, muỗi là hết sức cần thiết, để nhanh chóng tìm ra những sản phẩm có hiệu quả tốt và an toàn cho người sử dụng.

Received: May, 31st, 2019

Accepted: July, 24th, 2019

\*Corresponding Author

Email: manhhodung@gmail.com

Với những lý do và tính cấp thiết đã nêu ở trên, chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu “Xây dựng quy trình nuôi muỗi Aedes aegypti trong phòng thí nghiệm và đánh giá khả năng diệt bọ gây Aedes aegypti của tinh dầu sả chanh, bạch đàn chanh”.

## 2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Đối tượng nghiên cứu

Muỗi Aedes aegypti được thu thập tại Biên Hòa, Đồng Nai như sau: thu thập bọ gây ở trong các chai lọ chứa nước tù trong nhà. Nuôi bọ gây phát triển thành muỗi, cho đẻ để lấy trứng. Trứng muỗi được dùng để thực hiện xây dựng quy trình nuôi muỗi Aedes aegypti trong điều kiện phòng thí nghiệm. Muỗi được định danh bởi Bộ môn Ký sinh trùng, Khoa Dược, Đại học Lạc Hồng.

Nguyên liệu lá sả chanh thu hái ở Quận 9, Thành phố Hồ Chí Minh và lá bạch đàn chanh được thu hái ở Trung tâm Bảo tồn nguồn gen cây thuốc Đông Tháp Mười, huyện Mộc Hóa, tỉnh Long An vào tháng 12/2018. Mẫu được lưu lại ở Trung tâm Khoa học và Ứng dụng, Đại học Lạc Hồng.

### 2.2 Vật liệu nghiên cứu

*Hoá chất và dụng cụ nuôi muỗi:*

- Khay nhựa nuôi bọ gây có kích thước  $\phi = 11$  cm và chiều cao 8 cm, ống pipet dùng để hút bọ gây, đĩa petri, becher 100 mL, chai thủy tinh 500 mL, ống đong 100 mL, giấy lọc, băng keo đen, hộp nhựa đựng trứng có nắp đậy, nhiệt kế, ẩm kế.

- Lồng nuôi muỗi bằng inox có kích thước 20 cm x 30 cm x 20 cm bên ngoài được bao phủ bởi lớp vải tyn

- Thức ăn cho bọ gây là thức ăn cho mèo whiskas (Mỹ)

- Thức ăn cho muỗi là dung dịch đường sucrose 10%

*Dụng cụ chiết xuất tinh dầu:* bộ chưng cất tinh dầu Clevenger,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  khan, màng lọc Milipore 0.45 $\mu\text{m}$

*Thiết bị phân tích thành phần hoá học của tinh dầu:* Máy sắc ký khí- khối phổ (Gas Chromatography/ Mass Spectrometry - GC/MS) với máy GC Agilent 6890N, MSD 5973 inert, sử dụng cột HP5 – MS (30 m; 0,25 mm; 0,25  $\mu\text{m}$  film), khí mang là Helium.

### 2.3 Phương pháp nghiên cứu

*Quy trình nuôi muỗi Aedes aegypti*

Xây dựng các quy trình nuôi muỗi Aedes aegypti trong điều kiện phòng thí nghiệm, dựa vào các công trình đã được công bố [8-10]:

- Quy trình cho trứng nở

- Quy trình nuôi bọ gây

- Quy trình nuôi muỗi

- Quy trình lấy trứng và bảo quản trứng muỗi.

*Chiết xuất tinh dầu*

Lá sả, bạch đàn tươi sau khi thu hái về, cân 150 gram lá cho vào bình cầu 1000 ml với 500 ml nước cất, tiến hành chưng cất trong 2h bằng bộ chưng cất tinh dầu Clevenger. Tinh dầu sau khi chưng cất, được loại nước bằng  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  khan, rồi lọc qua màng lọc Milipore, sau đó được cho vào lọ kín có màu, bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh. Hàm lượng tinh dầu được tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng tinh dầu (\%)} = \frac{\text{Thể tích (ml)}}{\text{Khối lượng (g)}} \times 100 \%$$

*Xác định thành phần hóa học của tinh dầu bằng phương pháp sắc ký khí – khối phổ*

Tinh dầu sau khi chưng cất được phân tích thành phần hoá học bằng hệ thống sắc ký khí - khối phổ (Gas

Chromatography/ Mass Spectrometry - GC/MS) tại Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng Thành phố Hồ Chí Minh.

Chương trình nhiệt độ đo mẫu: 50 $^{\circ}\text{C}$  giữ trong 2 phút, sau đó tăng 2 $^{\circ}\text{C}$ / phút đến 80 $^{\circ}\text{C}$ , tăng 5 $^{\circ}\text{C}$ / phút đến 150 $^{\circ}\text{C}$ , tiếp tục tăng 10 $^{\circ}\text{C}$ / phút đến 200 $^{\circ}\text{C}$ , tăng 20 $^{\circ}\text{C}$ / phút đến 300 $^{\circ}\text{C}$  giữ trong 5 phút. Mẫu tinh dầu (25  $\mu\text{l}$ ) pha trong 1.0 ml n-hexan. Thẻ tích bom mẫu là 1.0  $\mu\text{l}$ . Sử dụng thư viện phổ NIST để nhận biết các thành phần tinh dầu.

*Đánh giá khả năng diệt bọ gây của các tinh dầu*

Dựa vào tài liệu hướng dẫn của WHO (2005) [11], mỗi lô thử nghiệm sử dụng 25 bọ gây tuổi 3 hoặc 4 chứa trong các cốc 100ml, độ sâu nước trong cốc khoảng 5-10 cm. Nồng độ cho thử nghiệm từ 0-200 ppm. Số bọ gây chết được quan sát sau 24 giờ. Nếu số lượng bọ gây chuyển thành nhộng sau 24 giờ lớn hơn 2 con trong các cốc, thì thử nghiệm đó bị loại bỏ. Lặp lại 3 lần cho mỗi thử nghiệm. Giá trị LC50, LC90 được xác định bằng phương pháp phân tích Probit analysis [12] sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2013.

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1 Quy trình nuôi muỗi

Hình 1 mô tả chi tiết quy trình nuôi muỗi trong phòng thí nghiệm, bao gồm bốn quy trình chính sau:

*Quy trình cho trứng nở:*

Trứng muỗi Aedes aegypti thu được từ các lồng nuôi muỗi (sau 2-3 ngày) sẽ được cho nở thành bọ gây. Trứng sẽ nở nhanh trong nước có nồng độ oxy thấp. Đun nước cho đến sôi rồi cho ngay vào chai thủy tinh 500mL, vặn kín nắp và để nước nguội đến nhiệt độ phòng. Cho trứng muỗi Aedes aegypti vào chai nước đã nguội, vặn nắp kín, và để yên trong khoảng 1-2 giờ cho trứng muỗi nở thành bọ gây.

*Quy trình nuôi bọ gây:*

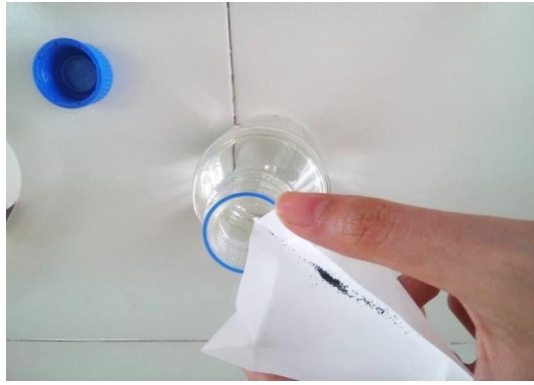
Khi trứng muỗi đã nở thành bọ gây tuổi 1, đổ hết bọ gây vào khay nuôi bọ gây. Mỗi khay khoảng 100 con với mật độ 1 con/1 ml nước. Thức ăn bọ gây được cho tùy theo giai đoạn phát triển của bọ gây. Bọ gây tuổi 1-2 khoảng 30mg/khay, bọ gây tuổi 3 khoảng 80mg/khay, bọ gây tuổi 4 khoảng 160mg/khay. Thực hiện thay nước sạch hàng ngày cho bọ gây ở tuổi 3, 4 để tránh làm ô nhiễm nước nuôi bọ gây.

*Quy trình nuôi muỗi:*

Từ ngày thứ 6 trở đi bọ gây sẽ bắt đầu lột xác thành nhộng. Dùng pipet paster để hút nhộng vào cốc nước sạch. Giai đoạn nhộng phát triển không cần cho thức ăn. Nhộng cái thường có kích thước lớn hơn nhộng đực. Cho những cốc nhộng vào các lồng nuôi muỗi. Các lồng muỗi đặt trong phòng có nhiệt độ 28 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$ , độ ẩm 70 $\pm$ 10%. Sau khoảng 2 ngày từ khi bắt đầu giai đoạn nhộng, nhộng sẽ bắt đầu lột xác thành muỗi. Thức ăn cho muỗi là dung dịch đường sucrose 10% được thấm ướt vào các miếng bông trong các đĩa petri được đặt trong lồng nuôi muỗi.

*Quy trình lấy trứng và bảo quản trứng*

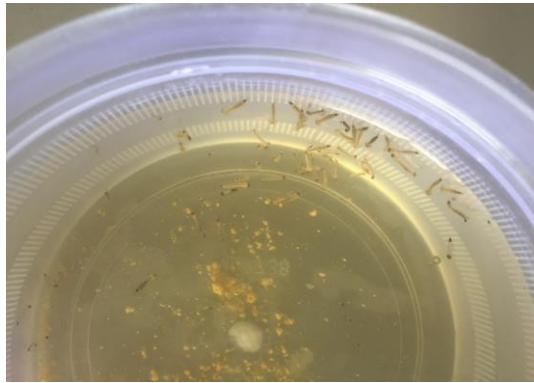
Sau khi muỗi nở và được cho ăn bằng dung dịch sucrose 10% trong 3 ngày, tiến hành cho muỗi hút máu người tình nguyện, để muỗi đẻ trứng. Sử dụng becher 100 mL được quấn băng keo đen để bọc kín quanh mặt ngoài của cốc tạo nơi thích hợp cho muỗi đẻ trứng. Cắt giấy lọc thành miếng hình chữ nhật dài để quấn tròn và đặt bên trong becher. Đổ khoảng 50 mL nước vào cốc chứa giấy lọc cho thấm ướt đều toàn bộ giấy lọc và đặt becher vào lồng nuôi muỗi. Để cốc nước trong lồng nuôi muỗi và thay cốc nước thu lấy trứng hàng ngày. Sau khi lấy giấy lọc trong cốc nước, để giấy lọc ở nơi thoáng gió để giấy lọc khô ráo.



1. Cho trứng nở thành bọ gậy



2. Cho bọ gậy ăn



3. Sự phát triển bọ gậy



4. Bọ gậy thành nhộng



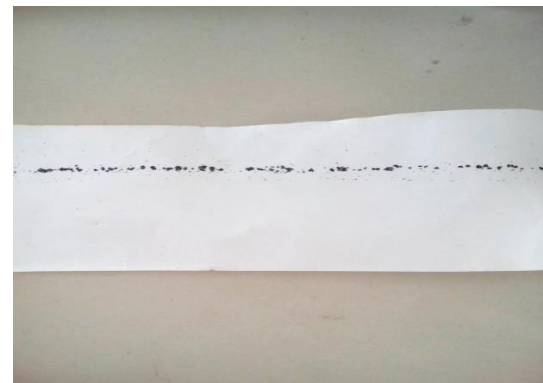
5. Nhộng thành muỗi



6. Muỗi ăn đường



7. Chuẩn bị cốc cho muỗi đẻ trứng



8. Lấy trứng và bảo quản

**Hình 1.** Quy trình nuôi muỗi trong phòng thí nghiệm

Giấy lọc chứa trứng sau khi khô để vào cốc đựng. Trên cốc có ghi chú ngày tháng lấy trứng, và bảo quản các cốc trong hộp nhựa đậy kín.

### 3.2 Hàm lượng và thành phần hoá học chính của các tinh dầu

Hàm lượng tinh dầu sả chanh (*Cymbopogon citratus*) và tinh dầu bạch đàn chanh (*Eucalyptus citriodora*) thu được bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước theo khối lượng lá tươi lần lượt là 0.33% và 2.13%.

Bảng 1 cho thấy kết quả phân tích GC-MS của tinh dầu sả chanh (*Cymbopogon citratus*) có 7 thành phần chính với tổng hàm lượng là 99.96%. Trong đó 2 thành phần có hàm lượng lớn nhất là cis-citral (36.19%) và trans-citral (49.32%). Kết quả này khá phù hợp với nghiên cứu tinh dầu sả chanh *Cymbopogon citratus* của Hoàng Thị Kim Vân, 2017 [13]. Nghiên cứu này có kết quả với thành phần chính là cis-citral (30.8%) và trans-citral (38.5%).

**Bảng 1.** Thành phần hoá học chính của tinh dầu của *Cymbopogon citratus*

STT	Tên chất	Thời gian lưu (phút)	Hàm lượng (%)
1	β-Myrcene	10.14	7.80
2	Isoneral	20.04	0.72
3	Isogeranial	20.90	0.93
4	cis-Citral	23.38	36.18
5	trans-Geraniol	23.92	4.10
6	trans-Citral	24.54	49.31
7	Geraniol acetate	28.20	0.92

**Bảng 2.** Thành phần hoá học chính của tinh dầu bạch đàn chanh (*Corymbia citriodora*)

STT	Tên chất	Thời gian lưu (phút)	Hàm lượng (%)
1	Isopulegol	18.87	7.19
2	(R)-(+)-Citronellal	19.59	78.55
3	(R)-(+)-β-Citronellol	22.90	12.08
4	Citronellol acetate	27.25	1.72

Bảng 2 chỉ kết quả phân tích GC-MS của tinh dầu bạch đàn chanh (*Eucalyptus citriodora*). Có 4 thành phần chính trong tinh dầu bạch đàn chanh với tổng hàm lượng là 99.54%. Tinh dầu chứa các thành phần chính như citronellal (78.55%), citronelol (12.08%), isopulegol (7.19%) và citronellol acetate (1.72%). Các thành phần hóa học của nghiên cứu này cho thấy kết quả phù hợp với nghiên cứu của Hanna, 2017 [14], tinh dầu bạch đàn chanh cũng được phân tích bằng phổ GC-MS cho thấy các thành phần chính có hàm lượng cao nhất là citronellal (53.1%) và citronelol (13.7%), isopulegol (6.6%).

### 3.3 Đánh giá khả năng diệt bọ gậy của các tinh dầu

Bảng 3 cho thấy tỉ lệ phần trăm bọ gậy chết sau 24h với mỗi tinh dầu ở các nồng độ từ 50-200ppm, với nồng độ 0 ppm đối chứng. Ở nồng độ lớn hơn 200ppm thì 100% bọ gậy đều chết sau 24h. Kết quả cho thấy ở cùng nồng độ thì tinh dầu bạch đàn chanh có khả năng diệt bọ gậy tốt hơn so với sả chanh.

**Bảng 3.** Tỷ lệ bọ gậy chết sau 24h

Nồng độ (ppm)	Tỷ lệ chết sau 24 h (%)	
	Bạch đàn chanh (Trung bình ±SD)	Sả chanh (Trung bình ±SD)
0	0	0
50	9.3±4.6	5.3±4.6
75	20.0±0	10.7±6.1
100	46.7±2.3	32.0±8.0
125	58.7±2.3	49.3±6.1
150	90.7±2.3	62.7±12.2
175	96.0±0	86.0±8.5
200	100.0±0	96.0±0

Bảng 4 xác định được nồng độ gây chết trung bình LC<sub>50</sub> = 117,9 ppm và LC<sub>90</sub> = 196 ppm của tinh dầu sả chanh đối với bọ gậy. Trong khi đó khả năng diệt bọ gậy của tinh dầu bạch đàn chanh tốt hơn với nồng độ LC<sub>50</sub> là 102.2 ppm và LC<sub>90</sub> là 175.3ppm. Kết quả này khá phù hợp với nghiên cứu của Vera, 2014 [7], trong nghiên cứu này LC<sub>50</sub> của tinh dầu sả chanh và bạch đàn chanh có LC<sub>50</sub> lần lượt là 120ppm và 70ppm.

**Bảng 4.** Giá trị LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub> giữa các thí nghiệm

Tinh dầu	LC <sub>50</sub> (Trung bình ± SD)	LC <sub>90</sub> (Trung bình ± SD)
Sả chanh	117.5 ± 11.8	196.0 ± 8.2
Bạch đàn chanh	102.2 ± 4.8	175.3 ± 2.6

Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt nam xác định nồng độ gây chết của tinh dầu sả chanh và bạch đàn chanh đối với bọ gậy theo tác giả được biết. Đề tài này đưa ra việc xác định nồng độ tinh dầu gây chết đối với bọ gậy, ngăn chặn phát triển thành muỗi. Dùng tinh dầu thiên nhiên không gây tồn dư, không gây độc hại, cũng như tránh được nguy cơ kháng thuốc thay vì dùng các hoá chất tổng hợp có tác dụng không có lợi như hiện nay. Tinh dầu ngoài khả năng diệt bọ gậy, còn được biết đến là các hợp chất có tác dụng xua muỗi rất tốt. Trong tương lai chúng tôi sẽ tiếp tục xây dựng phương pháp thử khả năng xua muỗi của những tinh dầu này trên muỗi *Aedes aegypti* được nuôi trong phòng thí nghiệm.

## 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng các quy trình nuôi muỗi *Aedes aegypti* trong phòng thí nghiệm bao gồm các quy trình cho trứng nở, quy trình nuôi bọ gậy, quy trình nuôi muỗi, quy trình lấy và bảo quản trứng muỗi. Tinh dầu Sả chanh và Bạch đàn chanh đã được chiết xuất bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước, từ đó đánh giá được tiềm năng diệt bọ gậy *Aedes aegypti* của hai tinh dầu này ở nồng độ thấp. Trong tương lai chúng tôi có thể chủ động nghiên cứu được nhiều tinh dầu hơn, có tiềm năng trong ứng dụng diệt bọ gậy, phòng chống sự lan truyền của bệnh sốt xuất huyết.

## 5. CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Lạc Hồng đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này theo mã số đề tài LHU-RF-MP-18-01-12.

## 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Cameron, P.S.; Jeremy J.F., Nguyen V.V.C.; Bridget W. Dengue. *New England Journal of Medicine*, **2012**, 366 (15), 1423-1432.
- [2] Cuong, H.; Vu, N.; Cazelles, B.; Boni, M.F.; Thai, K.; Rabaa, M.A.; Anders, K.L. Spatiotemporal Dynamics of Dengue Epidemics, Southern Vietnam. *Emerging Infectious Diseases*, **2013**, 19(6), 945-953.
- [3] Anders, K.L.; Nguyet, N.M.; Chau, N.V.; Hung, N. T.; Thuy, T.T. et al. Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Am J Trop Med Hyg*. **2011**, 84: 127-134.
- [4] Duong, T.T., Van, D.N. Mapping Insecticide Resistance in Dengue Vectors in the Northern Viet Nam, 2010-2013. *Vector Biol J*. **2016**, 1(1):1-6.
- [5] Huong, V.D.; Nguyen, T.B.N.; Thi, H.D.; Thi B.L. N. Susceptibility of *Aedes aegypti* to insecticides in Viet Nam. *Dengue Bull*. **2014**, 28:179-183.
- [6] Kawada, H.; Higa, Y.; Nguyen, Y.T.; Tran, S.H.; Nguyen, H.T.; Takagi, M. Nationwide investigation of the pyrethroid susceptibility of mosquito larvae collected from used tires in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis*. **2009**, 3(3):1-8.
- [7] Vera, S.S.; Zambrano, D.F.; Méndez-Sánchez, S.C.; Rodríguez-Sanabria, F.; Stashenko, E.E.; Duque Luna, J.E. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*. **2014**, 113(7):2647-2654.
- [8] Le, T.D.; Huỳnh, K.T.H. "Xây dựng quy trình kỹ thuật nuôi và bảo quản muỗi ở phòng thí nghiệm", *Nghiên cứu Y học*. **2013**, tập 17 (phụ bản số 1), 240-245.
- [9] Elizabeth, K.; Anne, P.; Mary, A. F.; Michael, A. S.; Eva, H.; Laura, D.K. Rearing of *Culex* spp. and *Aedes* spp. Mosquitoes. *Bio-protocol*. **2017**, 7 (17), e2542.
- [10] Danilo, O. C.; Derric, N.; Neil, N.; Andrew, R. M.; Pam, G.; André, B. B. W.; Mauro, T. M.; Jair, F. V.; Luke, A.; Margareth, L. C. Mass Production of Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil. *JoVE*. **2014**, 83, e3579.
- [11] WHO (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13.
- [12] Finney, J.D. Probit analysis, 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, **1971**.
- [13] Hoàng, T.K.V.; Hoàng, T.L.; Trần, T. H.; Nguyễn, M. Q.; Quách, T.T.V.; Nguyễn, T. H.; Nguyễn, T. Đ.; Nguyễn, H. V. Nghiên cứu thành phần hóa học và khảo sát hoạt tính sinh học của tinh dầu sả chanh *Cymbopogon citratus*. 2017. *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học - Tập 22/ số 1*.
- [14] Hanaa, S. H.; Ahmed, M. S. Repellent, attractive, and insecticidal effects of essential oils from *Schinus terebinthifolius* fruits and *Corymbia citriodora* leaves on two whitefly species, *Bemisia tabaci*, and *Trialeurodes ricini*", *Scientia Horticulturae*. **2017**, 216, 111-119.