

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5680063

ชื่อโครงการ: กลไกการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงใน *Culex quinquefasciatus*

ยุ้งรำคาญพาหะนำโรคพยาธิฟิลาเรีย

ชื่อนักวิจัย: อาจารย์ ดร.จินตนา ยาโนละ

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address: jintana.y@cmu.ac.th, jinny_011@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 1 มิถุนายน 2556 ถึง 31 พฤษภาคม 2558

บทนำ: ยุ้งรำคาญ *Culex quinquefasciatus* มีการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลง ทั้งกลไกที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมการกำจัดสารพิษ และการสูญเสียความไวของเป้าหมาย ในยุ้งรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* จากประเทศไทย

วัสดุและวิธีการ: จับยุ้งรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ระยะลูกน้ำและตัวโม่งในจังหวัดเชียงใหม่ นำมาเลี้ยงเป็นสายพันธุ์ไว้ในห้องปฏิบัติการโดยกำหนดชื่อเป็นสายพันธุ์ Cq_CM จากนั้นทำการคัดเลือกด้วยสารเคมีเดลต้าเมทรินเป็นจำนวน 5 รุ่น (Cq_CM_RF1-5) พร้อมกับทดสอบความไวต่อสารเคมีเดลต้าเมทรินของยุ้งรำคาญระยะลูกน้ำและตัวเต็มวัยด้วยวิธีมาตรฐานองค์การอนามัยโลก ตรวจสอบกลไกเมตาบอลิซึมการกำจัดสารพิษด้วยการเติมสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน voltage-gated sodium channel (VGSC) เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ knockdown resistance (*kdr*) นอกจากนี้ได้พัฒนาวิธี tetra primer AS-PCR assay สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ *kdr* และความถี่อัลลีลกลายพันธุ์ในยุ้งรำคาญแต่ละรุ่น

ผลการศึกษา: การทดสอบความไวต่อสารเคมีเดลต้าเมทรินในยุ้งรำคาญรุ่นพ่อแม่ Cq_CM พบว่าระยะลูกน้ำมีค่า LC_{50} 0.18 $\mu\text{g/L}$ และระยะตัวเต็มวัยมีอัตราการตาย 15.2% ภายหลังทดสอบกับกระดาษสารเคมีเดลต้าเมทริน 0.05% โดยระยะตัวเต็มวัยมีอัตราการตายลดลงเป็น 0% เมื่อทำการคัดเลือกยุ้งรำคาญด้วยสารเคมีเดลต้าเมทรินเพียงหนึ่งรุ่น และภายหลังการคัดเลือกยุ้งรำคาญ จำนวน 5

รุ่น พบว่า ระยะลูกน้ำมีค่า LC_{50} เพิ่มขึ้นตามลำดับเป็น 12.19 $\mu\text{g/L}$ (68 เท่า) การเติมสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ bis (4-nitrophenyl)-phosphate (BNPP) และ diethyl maleate (DEM) ซึ่งยับยั้งเอนไซม์ esterases และ glutathione S transferases (GST) ตามลำดับ ร่วมกับสารเคมีเดลต้าเมทรินในยุงรำคาญ Cq_CM ระยะลูกน้ำ พบว่าการดื้อต่อสารเคมีไม่ลดลง ในทางกลับกันการเติมสาร piperonyl butoxide (PBO) ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenases พบว่าการดื้อต่อสารเคมีลดลง 9 เท่า และ 14 เท่า ในยุงรำคาญสายพันธุ์ Cq_CM และ Cq_CM_RF5 ตามลำดับ แสดงว่าเอนไซม์กลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อสารเคมีเดลต้าเมทรินของยุงรำคาญ นอกจากนี้มีการตรวจพบการกลายพันธุ์ L1014F โดยมีความถี่อัลลีลกลายพันธุ์ (F1014) เพิ่มขึ้นตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญในการแต่ละรุ่นของการคัดเลือกในห้องปฏิบัติการ ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ L1014F กับการดื้อต่อสารเคมีเดลต้าเมทรินในยุงรำคาญ ส่วนการกลายพันธุ์ของยีน VGSC ตำแหน่งอื่น ทั้งชนิด non-synonymous และ synonymous มีตรวจพบในยุงรำคาญสายพันธุ์ Cq_CM และ Cq_CM_RF5 เช่นกัน โดยบทบาทของการกลายพันธุ์ที่พบเหล่านี้ ต่อการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลง จำเป็นต้องมีการศึกษาในลำดับต่อไป ส่วนวิธี tetra primer AS-PCR assay ที่พัฒนาขึ้นให้ผลสอดคล้องกับการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 100%

สรุปผลการศึกษา: การดื้อต่อสารเคมีเดลต้าเมทรินของยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ในประเทศไทย เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อต่อสารเคมี 2 กลไก คือ การกลายพันธุ์ L1014F ของ VGSC ยีน cytochrome P450 monooxygenases

คำหลัก:

ยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus*, สารเคมีฆ่าแมลง, การดื้อ, การกลายพันธุ์ knockdown resistance, เอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenases

Abstract

Project Code: MRG5680063

Project Title: Insecticide resistance mechanism in *Culex quinquefasciatus*, a mosquito vector
of bancroftian filariasis

Investigator: Lecturer Dr. Jintana Yanola

Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences,
Chiang Mai University

E-mail Address: jintana.y@cmu.ac.th, jinny_011@hotmail.com

Project Period: 1 June 2013 to 31 May 2016

Background: The mosquito *Culex quinquefasciatus* is known to be resistant to insecticides worldwide, including Thailand. This study aimed to investigate insecticide resistance mechanisms, involving metabolic detoxification and target site insensitivity in *Cx. quinquefasciatus* from Thailand.

Materials and methods: The larvae and pupae of *Cx. quinquefasciatus* were collected from Chiang Mai Province and a strain, namely Cq_CM, has been established in the laboratory. The Cq_CM mosquitoes were selected with deltamethrin for five generations (Cq_CM_RF1-5). The larval and adults susceptibility tests of deltamethrin were conducted using the standard WHO susceptibility test. Resistance mechanism involving metabolic detoxifying enzymes were

assessed by adding enzyme inhibitors into the larval bioassays. . Moreover, a fragment of voltage-gated sodium channel (VGSC) gene was amplified and sequenced to identify the knockdown resistance (*kdr*) mutation. The tetra primer AS-PCR assay was developed to detect the *kdr* mutation and its frequency in each generation of selection.

Results: Insecticide susceptibility test of the wild caught parental Cq_CM strain showed a deltamethrin LC₅₀ value of 0.18 µg/L in the larvae and 15.2% mortality in the adults after exposure to 0.05% deltamethrin papers. Mortality in the adult bioassay has decreased to 0% after only one generation of selection. After five generations of selection, the LC₅₀ value of deltamethrin in the larval bioassay was increased to 12.19 µg/L (68 fold). Addition of Bis (4-nitrophenyl)-phosphate (BNPP) and diethyl maleate (DEM), inhibitors of esterases and glutathione S transferases (GST), respectively, into the larval bioassay of the Cq_CM strain with deltamethrin showed no significant reduction of LC₅₀ values. On the contrary, addition of piperonyl butoxide (PBO), an inhibitor of cytochrome P450 monooxygenases, showed a 9-fold and 14.2-fold reduction of resistance in the Cq_CM and Cq_CM_RF5 strains, respectively. The result indicates that this enzyme family is conferring deltamethrin resistance in those strains. The L1014F *kdr* mutation was observed in the Cq_CM strain and the mutant allele (F1014) frequency of this mutation increased significantly along with resistance level in our selection in the laboratory. This suggests a relation between the L1014F *kdr* mutation and resistance to deltamethrin in this mosquito. Other non-synonymous and synonymous mutations of the VGSC gene were also found in the Cq_CM and Cq_CM_RF5 strains, but the role of these mutations in

resistance needs further investigation. The developing tetra primer AS-PCR assay gave 100% agreement with nucleotide sequencing.

Conclusion: There are two resistance mechanisms conferring deltamethrin resistance in *Cx. quinquefasciatus* in Thailand, the L1014F *kdr* mutation and cytochrome P450 monooxygenases.

Keywords

Culex quinquefasciatus, Insecticide, Resistance, Knockdown resistance mutation, Cytochrome P450 monooxygenases