นิพนธ์ต้นฉบับ **Original Article**

ความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรม

Insecticide susceptibility of genetically pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* mosquitoes

จักรวาล ชมภูศรี Jakkrawarn Chompoosri
รัตนา ตาเจริญเมือง Ratana Tacharoenmuang
ชญาดา ขำสวัสดิ์ Chayada Khamsawads
นิตยา เมธาวณิชพงศ์ Nittaya Methawanitphong
จริยา ครุธบุตร์ Jariya Krutbut
ธัณญภักษณ์ มากรื่น Thanyapak Makruen
อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์ Archawin Rojanawiwat
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
National Institute of Health, Department of Medical Sciences

DOI: 10.14456/dcj.2021.112
Received: March 7, 2021 | **Revised:** August 6, 2021 | **Accepted:** August 6, 2021

บทคัดย่อ

การดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมของยุงลายบ้านทำให้ไม่สามารถใช้สารไพรีทรอยด์ในการควบคุมและป้องกันโรคที่นำโดยยุงลายบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรม โดยได้ดำเนินการทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง 10 ชนิดของยุงลายบ้านจากจังหวัดนครราชสีมาโดยวิธีขององค์การอนามัยโลก และศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในบริเวณ domain II ของโปรตีนโซเดียมแชนเนลที่เป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสารไพรีทรอยด์ในยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ โดยวิธี PCR และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการศึกษา พบว่า ยุงลายบ้านจากจังหวัดนครราชสีมามีความไวต่อเฟนนิโตรไธออน และมาลาไธออน ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต รวมทั้งโพรพอกเซอร์และเบนดิโอคาร์บในกลุ่มคาร์บาเมต โดยมีอัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ ร้อยละ 100±0 แต่ดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ทั้ง 6 ชนิด โดยมีอัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านระหว่างร้อยละ 9.00±3.83-26.00±5.16 และอัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* จำนวน 60 ตัวอย่าง พบการกลายพันธุ์ในโปรตีนโซเดียมแชนเนลจำนวน 35 ตัวอย่าง โดยมีการแทนที่กรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง คือ S989P และ V1016G ในตัวอย่างเดียวกัน ที่ความถี่การกลายพันธุ์เท่ากับ 0.58 สารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและกลุ่มคาร์บาเมตอาจเป็นทางเลือกสำหรับใช้ในการควบคุมยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมแต่ควรใช้เท่าที่จำเป็นและควรบูรณาการกับมาตรการควบคุมยุงที่มีความปลอดภัย

ติดต่อผู้นิพนธ์ : จักรวาล ชมภูศรี อีเมล : jakkrawarn.c@gmail.com

Abstract

Genetic resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* mosquitoes causes an ineffective use of pyrethroids for the control of *Ae. aegypti*-borne diseases. This reasearch aimed to study the insecticide susceptibility of genetically pyrethroid-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes. *Ae. aegypti* mosquitoes from Nakhon Ratchasima province were exposed to 10 insecticides for susceptibility status by WHO susceptibility test. Polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing were conducted for detecting mutations in target site for pyrethroids in domain II of sodium channel protein on *para* gene in pyrethroid-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes. The results showed that *Ae. aegypti* mosquitoes from Nakhon Ratchasima province were completely susceptible to fenitrothion and malathion in organophosphates including propoxur and bendiocarb in carbamates with mean mortality rates at 24 h of 100±0%. However, the mosquitoes were resistant to all 6 pyrethroid insecticides with the mean mortality rates varied between 9.00±3.83% and 26.00±5.16%. The mean mortality rates of mosquitoes were significantly different among insecticides ($p<0.05$). Based on the analysis of 60 partial nucleotide sequences of *para* gene, 35 sequences were positive for two point mutations by amino acid substitutions of S989P and V1016G in sodium channel protein. The mutation frequency in the analyzed sequences of the pyrethroid-resistant mosquitoes was 0.58. It suggests that organophosphates and carbamates could be alternative insecticides to pyrethroids for the control of genetically pyrethroid-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes. However, those insecticides should be used sparingly and integrated with the safe mosquito control measures.

Correspondence: Jakkrawarn Chompoosri E-mail: jakkrawarn.c@gmail.com

คำสำคัญ
ความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง,การกลายพันธุ์, ยีน para, โปรตีนโซเดียมแชนเนล, ยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรม

Keywords
insecticide susceptibility, mutation, para gene, sodium channel protein, genetically pyrethroid-resistant Ae. aegypti mosquitoes

บทนำ

ยุงลายบ้านเป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออกและโรคติดเชื้อไวรัสซิกาที่มีความสำคัญทางสาธารณสุข โรคไข้เลือดออกเกิดจากการถูกยุงลายที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีกัด (dengue virus, DENV) โดยไวรัสเดงกีมี 4 ซีโรไทป์ คือ DENV 1, DENV 2, DENV 3 และ DENV 4 การระบาดของโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย มีรายงานครั้งแรกในเขตกรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2501 พบผู้ป่วย 2,158 คน และเสียชีวิต 300 คน[1] หลังจากนั้นโรคไข้เลือดออกได้ระบาดไปทั่วประเทศจนมาถึงปัจจุบัน ในปี พ.ศ. 2563 มีรายงานผู้ป่วยไข้เลือดออก 71,293 คน (อัตราป่วย 107.63 ต่อประชากรแสนคน) และเสียชีวิต 51 คน (อัตราป่วยตาย ร้อยละ 0.07)[2] โรคติดเชื้อไวรัสซิกา (zika virus infection) ติดต่อทางยุงลายกัดเป็นหลัก[3] ในประเทศไทย มีรายงานยืนยันผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสซิกาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 โรคนี้มีความรุนแรงในหญิงตั้งครรภ์โดยทำให้เด็กทารกที่คลอดมามีสมองเล็ก (microcephaly) หรือมีภาวะแทรกซ้อนระหว่างตั้งครรภ์ โรคนี้เริ่มมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นหลังจากพบผู้ป่วยในหลายจังหวัดในปี พ.ศ. 2559 อย่างไรก็ตาม จากระบบการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559-2563 พบผู้ป่วยสูงสุดในปี พ.ศ. 2559

อัตราป่วย 1.69 ต่อประชากรแสนคน และมีแนวโน้มการรายงานผู้ป่วยลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งในปีที่ผ่านมา พ.ศ. 2563 พบผู้ติดเชื้อไวรัสซิการวม 144 ราย อัตราป่วย 0.22 ต่อประชากรแสนคน และยังไม่มีรายงานผู้ป่วยเสียชีวิต[4]

การป้องกันโรคไข้เลือดออกและโรคติดเชื้อไวรัสซิกา ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสซิกาแต่มีวัคซีนป้องกันไข้เลือดออก (Dengvaxia®) เนื่องจากวัคซีนนี้ยังไม่จัดอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ จึงทำให้ประชาชนส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้บริการฉีดวัคซีนได้ การควบคุมโรคดังกล่าวจึงดำเนินการ 3 มาตรการ คือ 1) ระมัดระวังผู้ป่วยที่อยู่ในระยะแพร่เชื้อหรือกำลังมีไข้ไม่ให้ถูกยุงลายกัดเพื่อป้องกันการแพร่เชื้อ 2) ค้นหาผู้ป่วยรายใหม่ในชุมชนของผู้ป่วยรายแรก และ 3) ควบคุมยุงลายอย่างต่อเนื่องโดยการจัดการสิ่งแวดล้อมเพื่อกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลาย การใช้สารเคมีกำจัดลูกน้ำและยุงตัวเต็มวัย และการสำรวจความชุกชุมของลูกน้ำยุงลายเพื่อประเมินมาตรการควบคุมโรคโดยใช้ค่าดัชนี H.I. (House Index), C.I. (Container Index) และ B.I. (Breteau Index)[5] อย่างไรก็ตาม มีรายงานยุงลายบ้านดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงหลายชนิดจากกลุ่มออร์กาโนคลอรีน เช่น ดีดีที กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เช่น มาลาไธออน กลุ่มคาร์บาเมต เช่น โพรพอกเซอร์และกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ เช่น ไซเพอร์เมทริน ไซฟลูทริน เดลทาเมทริน แลมป์ดา-ไซฮาโลทริน ไบเฟนทริน เพอร์เมทริน อีโทเฟนพรอกซ์ และแอลฟา-ไซเพอร์เมทริน ในหลายพื้นที่ทั่วประเทศไทย[6-7] ทำให้การควบคุมยุงลายบ้านที่ดื้อสารเคมีกำจัดแมลงเหล่านี้ไม่มีประสิทธิภาพดีพอและเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ยังมีรายงานการระบาดของโรคที่นำโดยยุงลายบ้านอย่างต่อเนื่องในหลายพื้นที่ทั่วประเทศไทย

ปัจจุบันการใช้สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์เป็นหนึ่งแนวทางที่สำคัญทางสาธารณสุขในการควบคุมยุงพาหะนำโรคในประเทศไทย[7] เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่มีความเป็นพิษสูงต่อแมลง[8] โดยสารไพรีทรอยด์มีฤทธิ์ต่อยุงทำให้เป็นอัมพาตเฉียบพลันและตายอย่างทันที (knockdown effect) อย่างไรก็ตาม การใช้สารไพรีทรอยด์อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานเป็นสาเหตุทำให้ยุงสามารถพัฒนากลไกการดื้อต่อการเกิดอัมพาตแบบเฉียบพลัน (knock-down resistance, *kdr*) โดยกลไกนี้เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในโปรตีนโซเดียมแชนเนล (sodium channel protein) ที่เป็นตำแหน่งเป้าหมายออกฤทธิ์ (target site) ของสารไพรีทรอยด์ โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนโซเดียมแชนเนลเปลี่ยนแปลงไปและสูญเสียความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง (target site insensitivity)[9] ทำให้โปรตีนมีความสามารถในการจับกับสารไพรีทรอยด์ลดลงหรือไม่สามารถจับได้ ดังนั้น สารไพรีทรอยด์จึงออกฤทธิ์ได้ช้าหรือไม่ออกฤทธิ์ทำให้แมลงไม่ตายและเกิดภาวการณ์ดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ การกลายพันธุ์ของยีน *para* ในโปรตีนโซเดียมแชนเนลพบส่วนใหญ่ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 410 เปลี่ยนจากวาลีนเป็นลิวซีน (V410L) ในบริเวณ domain I กรดอะมิโนตำแหน่ง 989 เปลี่ยนจากซีรีนเป็นโพรลีน (S989P) และตำแหน่ง 1016 เปลี่ยนจากวาลีนเป็นไกลซีน (V1016G) ในบริเวณ domain II และกรดอะมิโนตำแหน่ง 1534 เปลี่ยนจากฟีนิลอะลานีนเป็นซิสเทอีน (F1534C) ในบริเวณ domain III[10] ในประเทศไทยมีรายงานพบยุงลายบ้านจาก 3 จังหวัดภาคกลาง คือ ปราจีนบุรี ราชบุรี และกรุงเทพฯ ที่ดื้อต่อเพอร์เมทรินมีการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 989 (S989P) และตำแหน่ง 1016 (V1016G)[11] โดยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 1016 (V1016G) ยังพบในยุงลายบ้านจาก 8 จังหวัด คือ เชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำพูน ลำปาง แม่ฮ่องสอน ตาก และขอนแก่น[12] นอกจากนี้ มีรายงานพบยุงลายบ้านจาก 10 จังหวัด คือ เชียงใหม่ ลำปาง แม่ฮ่องสอน เชียงราย อุตรดิตถ์ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ ตราด และตาก ที่ดื้อต่อเพอร์เมทรินมีการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่กรดอะมิโน ตำแหน่ง 1534 (F1534C)[13] อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 1534 (F1534C) ไม่มีความสัมพันธ์กับการดื้อต่อเดลทาเมทรินของยุงลายบ้าน[12]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมจากพื้นที่ศึกษาจังหวัดนครราชสีมาที่มีรายงานยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลง[6] และมีรายงานผู้ป่วยไข้เลือดออก โดยศึกษาความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ของยุงลายบ้านจากจังหวัดนครราชสีมาโดยวิธีขององค์การอนามัยโลกและศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในบริเวณ domain II ของโปรตีนโซเดียมแชนเนลในยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ โดยการกลายพันธุ์ที่บริเวณดังกล่าวพบในยุงลายบ้านจากหลายจังหวัด ของประเทศไทยและในหลายประเทศแถบเอเชีย[10] ซึ่งการทราบกลไกการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านมีความสำคัญต่อการพิจารณาเลือกใช้สารเคมีกำจัดแมลงที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงและป้องกันโรคที่นำโดยยุงลายบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัสดุและวิธีการศึกษา

ยุงลายบ้าน

ยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่มีความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงและเลี้ยงมานานกว่า 20 ปี ณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และยุงลายบ้านที่เก็บจากพื้นที่ศึกษา หมู่ 8 บ้านทุ่งอรุณ ตำบลทุ่งอรุณ อำเภอโชคชัย จังหวัดนครราชสีมา (14° 38´ 47´´N 102° 10´ 26´´E) ที่มีรายงานยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงในปี พ.ศ. 2557[6] และมีรายงานผู้ป่วยไข้เลือดออกในปี พ.ศ. 2558-2560 โดยมีอัตราป่วยไข้เลือดออกสูงสุด 1,131.2 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2560 (ข้อมูลจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกและจำนวนประชากรจากโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลหนองปรึก ตำบลทุ่งอรุณ อำเภอโชคชัย จังหวัดนครราชสีมา) ได้ดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงลายบ้านโดยใช้หลอดดูด (dropper) และยุงลายบ้านตัวเต็มวัยโดยใช้อุปกรณ์โฉบแมลงในบ้านจำนวน 32 หลัง จากจำนวนบ้านทั้งหมด 122 หลัง ในเดือนมกราคม 2563 คิดเป็นร้อยละ 26.2 โดยการประมาณขนาดกลุ่มตัวอย่างบ้านได้ดัดแปลงจากเกณฑ์ในการประมาณขนาดกลุ่มตัวอย่างประชากรร้อยละ 15-30 จากประชากรทั้งหมด หลักร้อย[14] แต่ในงานวิจัยนี้ใช้เป็นตัวอย่างบ้านแทนตัวอย่างประชากร นำลูกน้ำและยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษามาเพาะเลี้ยง โดยมีสภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ ดังนี้ ลูกน้ำระยะที่ 1-2 ให้อาหารบดละเอียดไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อถาดต่อวัน และลูกน้ำระยะที่ 3-4 ให้อาหารบดหยาบไม่เกิน 60 มิลลิกรัมต่อถาดต่อวัน ส่วนอาหารสำหรับยุงลายบ้านตัวเต็มวัย นำไม้พันสำลีชุบน้ำหวานที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลร้อยละ 5 และวิตามินรวมร้อยละ 5 โดยเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 24-28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60-80% RH และระบบแสงเปิด/ปิด เป็น 12/12 ชั่วโมง

สารเคมีกำจัดแมลง

สารเคมีกำจัดแมลง 10 ชนิด ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต กลุ่มคาร์บาเมต และกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ ซื้อจาก Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) โดยเตรียมสารเคมีกำจัดแมลงแต่ละชนิดในอะซีโตนที่ค่าความเข้มข้น discriminating concentration (discriminating concentration คือ ค่าความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของค่า Lethal concentration 99 หรือ LC99 โดยค่า LC99 คือ ค่าความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดแมลงที่ทำให้ยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการตายร้อยละ 99) ตามข้อมูลในรายงานการทดสอบความไวยุงพาหะนำโรคของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข[6] ดังนี้ สารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 2 ชนิด คือ เฟนนิโตรไธออน (fenitrothion, 98.60% purity) ร้อยละ 1.0 และมาลาไธออน (malathion, 98.33% purity) ร้อยละ 0.8 สารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มคาร์บาเมต 2 ชนิด คือ เบนดิโอคาร์บ (bendiocarb, 99.00% purity) ร้อยละ 0.1 และโพรพอกเซอร์ (propoxur, 99.90% purity) ร้อยละ 0.1 และสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ 6 ชนิด คือ ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin, 97.63% purity) ร้อยละ 0.22 เดลทาเมทริน

(deltamethrin, 99.62% purity) ร้อยละ 0.05 ไบเฟนทริน (bifenthrin, 99.54% purity) ร้อยละ 0.09 เพอร์เมทริน (permethrin, 98.30% purity) ร้อยละ 0.75 แลมป์ดา-ไซฮาโลทริน (lambda-cyhalothrin, 99.69% purity) ร้อยละ 0.05 และแอลฟา-ไซเพอร์เมทริน (alpha-cypermethrin, 99.42% purity) ร้อยละ 0.08

การทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาโดยวิธีขององค์การอนามัยโลก

การทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง 10 ชนิด ของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาใช้ยุงลายบ้านเพศเมียรุ่นลูก รุ่นที่ 1 อายุ 3-5 วัน จำนวน 25 ตัว ต่อกระบอกทดสอบ จำนวน 4 กระบอกต่อชนิดของสารเคมีกำจัดแมลง ให้ยุงลายบ้านสัมผัสกับกระดาษกรองที่ชุบสารเคมีกำจัดแมลงแต่ละชนิดในกระบอกทดสอบเป็นเวลา 60 นาที บันทึกผลจำนวนยุงลายบ้านที่หงายท้องและตรวจสอบอัตราตายที่ 24 ชั่วโมง ตามวิธีขององค์การอนามัยโลก (WHO susceptibility test)[15] โดยยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่สัมผัสกับกระดาษกรองที่ชุบสารเคมีกำจัดแมลงแต่ละชนิดใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก ส่วนยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาและยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่สัมผัสกับกระดาษกรองที่ชุบอะซีโตนใช้เป็นชุดควบคุมผลลบ แปลผลระดับความไวและการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านตามเกณฑ์การประเมินผลความไวของยุงตัวเต็มวัยต่อสารเคมีกำจัดแมลง[15] แบ่งออกเป็น 4 ระดับ ดังนี้

- อัตราตายอยู่ระหว่างร้อยละ 98-100 หมายถึง ยุงมีความไวหรือไม่ดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลง
- อัตราตายต่ำกว่าร้อยละ 98 แสดงให้เห็นเป็นนัยว่ายุงอาจเริ่มเกิดการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลง จำเป็นต้องมีการทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงซ้ำในครั้งต่อ ๆ ไปในพื้นที่เดิม
- อัตราตายอยู่ระหว่างร้อยละ 90-97 หมายถึง ยุงเริ่มมียีนดื้อสารเคมีกำจัดแมลงเกิดขึ้นในกลุ่มประชากรยุง ต้องมีการทดสอบยืนยันผลอีกครั้ง
- อัตราตายต่ำกว่าร้อยละ 90 หมายถึง ยุงดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลง

การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์จากพื้นที่ศึกษาโดยวิธี PCR และ DNA sequencing

การสกัด genomic DNA จากตัวอย่างยุงลายบ้านเพศเมียดื้อสารไพรีทรอยด์ที่รอดชีวิตจากการทดสอบความไวต่อไซเพอร์เมทริน เดลทาเมทริน ไบเฟนทริน เพอร์เมทริน แลมป์ดา-ไซฮาโลทริน และแอลฟาไซเพอร์เมทริน จำนวน 10 ตัวอย่างต่อชนิดสารไพรีทรอยด์ รวม 60 ตัวอย่าง และยุงลายบ้าน สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ตายจากการทดสอบความไวต่อสารไพรีทรอยด์ 6 ชนิด จำนวน 10 ตัวอย่างต่อชนิดสารไพรีทรอยด์ รวม 60 ตัวอย่าง ได้ดำเนินการสกัดยุงลายบ้านทั้งตัวจำนวน 1 ตัวต่อปฏิกิริยา ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) และการตรวจหายีน *para* บริเวณเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสารไพรีทรอยด์โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs Inc.) และใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) ในขั้นตอนการตรวจหายีนเป้าหมายได้เตรียมปฏิกิริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยใน 1 ปฏิกิริยาประกอบด้วย 5x Q5 Reaction Buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, 5x Q5 High GC Enhancer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร, ชุดไพรเมอร์: 20 uM AaSCF20 (5'-GACAATGTGGATCGCTTCCC -3') และ 20 uM AaSCR21 (5'-GCAATCTGGCTTGTTAACTTG -3')[16] ปริมาตรอย่างละ 1.25 ไมโครลิตร, Q5 High-Fidelity DNA polymerase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, ddH2O ปริมาตร 21 ไมโครลิตร และ genomic DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยมีปฏิกิริยาที่ปราศจาก genomic DNA เป็นชุดควบคุมผลลบ จากนั้น นำปฏิกิริยาที่เตรียมในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เข้าเครื่อง CFX96 Real-Time System ตั้งโปรแกรมจำนวน 7 ขั้นตอน โดยใช้สภาวะของ PCR ดังนี้ 1) pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที 3) annealing ที่อุณหภูมิ 55°C นาน 30

วินาที 4) extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที 5) ทำซ้ำปฏิกิริยา ในขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 34 รอบ 6) final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที และ 7) 4°C ∞ จึงเสร็จสิ้นโปรแกรมการทำงาน หลังจากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ที่ผสม Red-SafeTM Nucleic Acid Staining Solution ใน 1X TBE buffer และดำเนินการที่ความต่างศักย์ 100 V นาน 60 นาที และใช้ DNA marker ชนิด 1kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs Inc.) ตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและถ่ายภาพด้วยเครื่อง Azure c150 Gel Imaging System (Azure Biosystems) และนำ DNA เป้าหมายที่แยกได้จาก agarose gel มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) ตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่อง Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer และส่งไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท แมคโครเจน ประเทศเกาหลี (Macrogen Inc., Korea) โดยใช้ไพรเมอร์ AaSCF20 ร่วมกับชุดน้ำยา Big DyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) และเครื่องรุ่น 3730xl automated sequencer (Applied Biosystems, USA) วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม MEGA-X เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *para*

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ค่าเวลาที่ทำให้ยุงลายบ้านหงายท้องที่ร้อยละ 50 (knockdown time 50, KT50) ใช้สถิติ probit analysis และการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาที่ได้จากการทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง 10 ชนิด ใช้สถิติ One-way ANOVA และ Bonferroni multiple comparison test กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติ (α)= 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS ในการทดสอบ ถ้าชุดควบคุมผลลบมีอัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านร้อยละ 5-20 ให้ปรับค่า Abbott's formula[17] แต่ถ้ามีอัตราตายเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 20 ต้องทำการทดสอบใหม่

ผลการศึกษา

ความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาจังหวัดนครราชสีมา

จากการทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง 10 ชนิด ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คาร์บาเมตและไพรีทรอยด์สังเคราะห์ของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาจังหวัดนครราชสีมา (ตารางที่ 1) พบว่า ยุงลายบ้าน จากพื้นที่ศึกษามีความไวต่อเฟนนิโตรไธออนและมาลาไธออน ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต รวมทั้งเบนดิโอคาร์บและโพรพอกเซอร์ในกลุ่มคาร์บาเมต โดยมีอัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ ร้อยละ100±0 แต่ดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ทั้ง 6 ชนิด โดยมีอัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาอยู่ระหว่างร้อยละ 9.00±3.83-26.00±5.16 และอัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาที่ได้จากการทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงทั้ง 10 ชนิด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (One-way ANOVA: $p<0.05$; F =34.694; df=9) จากการศึกษาช่วงเวลาที่ทำให้ยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาหงายท้องร้อยละ 50 (KT50) หลังจากสัมผัสสารเคมีกำจัดแมลงแต่ละชนิด พบว่า ค่า KT50 ของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาอยู่ระหว่าง 11.55-มากกว่า 60.00 นาที โดยค่า KT50 ต่ำสุดได้จากยุงลายบ้านที่สัมผัสโพรพอกเซอร์และค่า KT50 มากกว่า 60.00 นาที ได้จากยุงลายบ้านที่สัมผัสไบเฟนทรินและเพอร์เมทริน ส่วนยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการมีความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงทั้ง 10 ชนิด โดยมีอัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้าน สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 100±0 และมีค่า KT50 อยู่ระหว่าง 5.89-59.10 นาที โดยค่า KT50 ต่ำสุดและสูงสุดได้จากยุงลายบ้านที่สัมผัสเพอร์เมทรินและเฟนนิโตรไธออน ตามลำดับ ส่วนยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาและยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่สัมผัสกับอะซีโตนมีอัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ ร้อยละ 0±0 และไม่สามารถวิเคราะห์ค่า KT50 ได้

ตารางที่ 1 ความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาจังหวัดนครราชสีมา

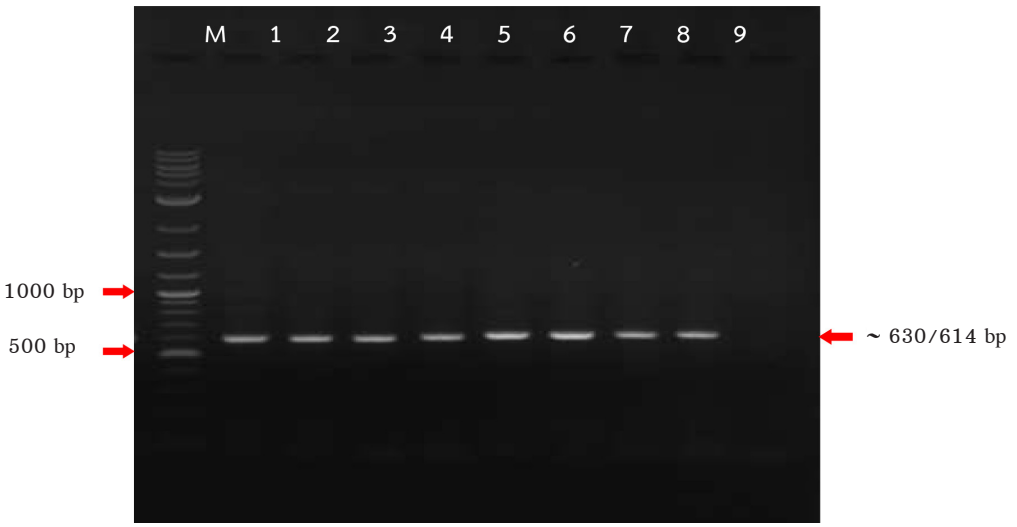
สารเคมีกำจัดแมลง	สายพันธุ์ยุงลาย	KT50 (นาที) (95% CI)	Regression Coefficient±SE*	อัตราตายเฉลี่ย (Mean±SD) (ร้อยละ)**
อะซีโตน	ห้องปฏิบัติการ	-	-	0±0
	นครราชสีมา	-	-	0±0
เฟนนิโตรไธออน	ห้องปฏิบัติการ	59.10 (57.99-60.60)	21.96±2.52	100±0
ร้อยละ 1.0	นครราชสีมา	62.79 (60.74-66.72)	17.94±3.13	100±0[a]
มาลาไธออน	ห้องปฏิบัติการ	28.50 (28.26-28.77)	32.97±3.06	100±0
ร้อยละ 0.8	นครราชสีมา	30.60 (27.78-32.97)	11.52±0.88	100±0[a]
เบนดิโอคาร์บ	ห้องปฏิบัติการ	9.08 (8.44-9.73)	5.88±0.54	100±0
ร้อยละ 0.1	นครราชสีมา	17.16 (16.54-17.69)	14.08±0.91	100±0[a]
โพรพอกเซอร์	ห้องปฏิบัติการ	8.76 (8.46-9.12)	8.28±0.85	100±0
ร้อยละ 0.1	นครราชสีมา	11.55 (10.65-12.23)	15.37±1.03	100±0[a]
ไซเพอร์เมทริน	ห้องปฏิบัติการ	7.53 (7.35-7.71)	12.71±0.97	100±0
ร้อยละ 0.22	นครราชสีมา	18.39 (17.30-19.43)	4.79±0.32	20.00±4.08[b]
เดลทาเมทริน	ห้องปฏิบัติการ	15.57 (14.79-16.33)	7.14±0.60	100±0
ร้อยละ 0.05	นครราชสีมา	15.99 (13.83-17.98)	2.73±0.24	25.00±5.77[b]
ไบเฟนทริน	ห้องปฏิบัติการ	14.03 (13.76-14.29)	11.87±0.72	100±0
ร้อยละ 0.09	นครราชสีมา	มากกว่า 60.00	2.48±0.63	10.00±4.08[b]
เพอร์เมทริน	ห้องปฏิบัติการ	5.89 (5.55-6.18)	6.11±0.59	100±0
ร้อยละ 0.75	นครราชสีมา	มากกว่า 60.00	2.16±0.61	9.00±3.83[b]
แลมป์ดา-ไซฮาโลทริน	ห้องปฏิบัติการ	14.41 (14.08-14.74)	8.30±0.49	100±0
ร้อยละ 0.05	นครราชสีมา	16.06 (13.36-18.50)	2.19±0.22	26.00±5.16[b]
แอลฟา-ไซเพอร์เมทริน	ห้องปฏิบัติการ	9.85 (9.60-10.10)	9.25±0.59	100±0
ร้อยละ 0.08	นครราชสีมา	12.30 (11.02-13.40)	3.99±0.40	15.00±3.40[b]

* Regression Coefficient คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่ได้จากการวิเคราะห์แบบโปรบิต (probit analysis) มีค่าเป็นบวก หมายถึง ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ยุงลายบ้านสัมผัสกับสารเคมีกำจัดแมลงและจำนวนยุงลายบ้านที่หงายท้องมีความสัมพันธ์เชิงบวกและทิศทางเดียวกัน

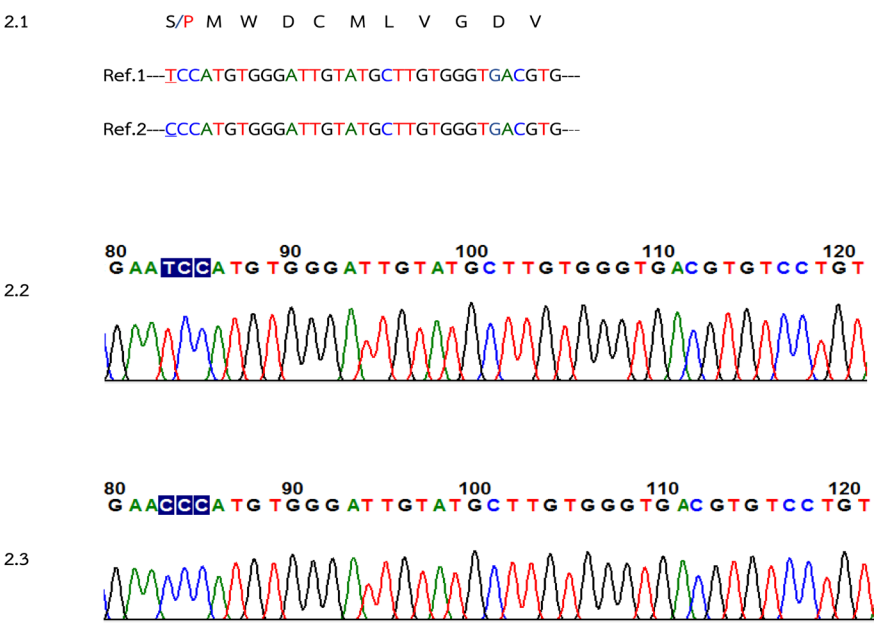
** ตัวอักษร [a] และ [b] (ตัวยก) ที่กำกับไว้ท้ายอัตราตายเฉลี่ย หมายถึง อัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านจากจังหวัดนครราชสีมาที่ได้จากการทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง 10 ชนิด ที่ความเข้มข้น discriminating concentration มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$ โดยวิธี One-way ANOVA และ Bonferroni Multiple Comparisons

การกลายพันธุ์ของยีน *para* ในยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์

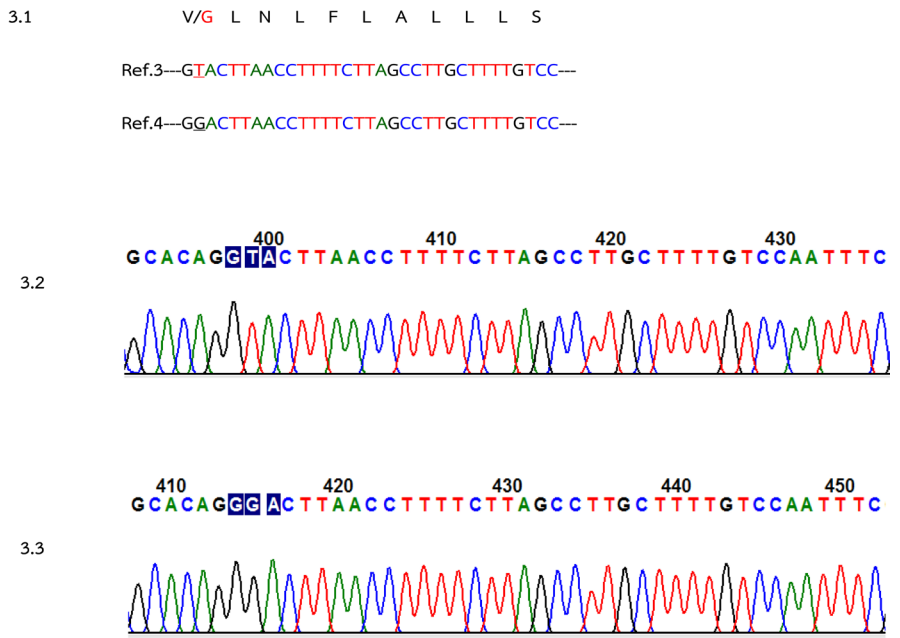
จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA เป้าหมายของยีน *para* ของยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ที่รอดชีวิตจากการทดสอบความไวต่อสารไพรีทรอยด์ทั้ง 6 ชนิด จำนวน 60 ตัวอย่าง และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ตายจากการทดสอบความไวต่อสารไพรีทรอยด์ทั้ง 6 ชนิด จำนวน 60 ตัวอย่าง โดยวิธี PCR และตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *para* ของยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการมีขนาดประมาณ 630/614 bp ขึ้นอยู่กับ intron polymorphism (250/234 bp)[16] (ภาพที่ 1) และจากการตรวจหา ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี DNA sequencing แล้วนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ของยีน *para* โดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ในฐานข้อมูล GenBank ที่เป็นบริเวณ S6 segment ใน domain II ของโปรตีนโซเดียมแชนเนลของยุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติ หรือ Ref.1 ที่ไม่มีการแทนที่กรดอะมิโนซีรีน (Serine, S) ที่ตำแหน่ง 989 และยุงลายบ้านสายพันธุ์กลายพันธุ์ หรือ Ref. 2 ที่มีการแทนที่กรดอะมิโนจากซีรีน (Serine, S) เป็น โพรลีน (Proline, P), S989P (ภาพที่ 2.1) และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* บริเวณ S6 segment ใน domain II ของโปรตีนโซเดียมแชนเนลของยุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติ หรือ Ref.3 ที่ไม่มีการแทนที่กรดอะมิโนวาลีน (Valine, V) ที่ตำแหน่ง 1016 และยุงลายบ้านสายพันธุ์กลายพันธุ์การแทนที่กรดอะมิโนจากวาลีน (Valine, V) เป็น ไกลซีน (Glycine, G), V1016G (ภาพที่ 3.1) จากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ในยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์จำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่า มีการกลายพันธุ์ของยีน *para* จำนวน 35 ตัวอย่าง โดยมีการแทนที่กรดอะมิโน 2 ตำแหน่งในโปรตีนโซเดียมแชนเนลในตัวอย่าง DNA เดียวกัน คือ S989P มีการแทนที่เบสตัวที่ 1 ในโคดอน (codon) จาก TCC ที่กำหนดกรดอะมิโนซีรีนในยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ (ภาพที่ 2.2) เป็น CCC ที่กำหนดกรดอะมิโนโพรลีนในยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ (ภาพที่ 2.3) และ V1016G มีการแทนที่เบส ตัวที่ 2 ในโคดอนจาก GTA ที่กำหนดกรดอะมิโนวาลีนในยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ (ภาพที่ 3.2) เป็น GGA ที่กำหนดกรดอะมิโนไกลซีนในยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ (ภาพที่ 3.3) อย่างไรก็ตาม ไม่พบการแทนที่กรดอะมิโนไอโซลิวซีน (Isoleucine, I) ที่ตำแหน่ง 1011 (I1011) และกรดอะมิโนลิวซีน (Leucine, L) ที่ตำแหน่ง 1014 (L1014) ในยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ (ตารางที่ 2) การกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งดังกล่าวมีความถี่การกลายพันธุ์ เท่ากับ 0.58 หรือคิดเป็นร้อยละ 58 ของตัวอย่าง DNA ที่วิเคราะห์ทั้งหมด (ตารางที่ 3) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนดังกล่าว



ภาพที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 630/614 bp ของยีน *para*, Lane M: Marker = 1kb Plus DNA Ladder; Lane 1: genomic DNA ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ; Lane 2-8: genomic DNA ของยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์จากจังหวัดนครราชสีมา; Lane 9: ชุดควบคุมผลลบ



ภาพที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* บริเวณ S6 segment ใน domain II ของโปรตีนโซเดียมแชนเนลของยุงลายบ้าน (exon 20)
2.1) Ref. 1 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติ (GenBank: AB914690.1) และ Ref. 2 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงลายบ้านที่มีการกลายพันธุ์ S989P (GenBank: AB914689.1)
2.2) กราฟอิเล็กโทรฟีโรแกรม (electropherogram) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ และ
2.3) กราฟอิเล็กโทรฟีโรแกรม (electropherogram) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์จากจังหวัดนครราชสีมา ที่มีการกลายพันธุ์ S989P



ภาพที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* บริเวณ S6 segment ใน domain II ของโปรตีนโซเดียมแชนเนลของยุงลายบ้าน (exon 20)
3.1) Ref. 3 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติ (GenBank: AB914690.1) และ Ref. 4 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงลายบ้านที่มีการกลายพันธุ์ V1016G (GenBank: AB914689.1)
3.2) กราฟอิเล็กโทรฟีโรแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ
3.3) กราฟอิเล็กโทรฟีโรแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์จาก จังหวัดนครราชสีมาที่มีการกลายพันธุ์ V1016G

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ในบริเวณ domain II ของโปรตีนโซเดียมแชนเนลของยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการและยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์

การแทนที่กรดอะมิโน	จำนวนตัวอย่าง DNA ที่วิเคราะห์		โคดอน ปกติ/กลายพันธุ์	จำนวนตัวอย่าง DNA ที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *para*	
	ยุงลายบ้านห้องปฏิบัติการ	ยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์		ยุงลายบ้านห้องปฏิบัติการ	ยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์
S989P	60	60	TCC/CCC	0	35
I1011M	60	60	ATA/ATG	0	0
L1014F	60	60	TTA/TTT	0	0
V1016G	60	60	GTA/GGA	0	35

ตารางที่ 3 ความถี่การกลายพันธุ์ของยีน para ในยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์

ยุงลายบ้าน ดื้อสารไพรีทรอยด์	จำนวนตัวอย่าง DNA ที่วิเคราะห์	จำนวนตัวอย่าง DNA ที่พบการกลายพันธุ์ ของยีน para	ความถี่การกลายพันธุ์
ไซเพอร์เมทริน	10	5	0.50
เดลทาเมทริน	10	6	0.60
ไบเฟนทริน	10	6	0.60
เพอร์เมทริน	10	7	0.70
แลมป์ดา-ไซฮาโลทริน	10	6	0.60
แอลฟา-ไซเพอร์เมทริน	10	5	0.50
รวม	60	35	0.58

วิจารณ์

ในปัจจุบันมีรายงานยุงลายบ้านดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต กลุ่มคาร์บาเมต และกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์จากหลายพื้นที่ทั่วประเทศไทย[6-7] โดยเฉพาะยุงลายบ้านดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงหลายชนิดในกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ เนื่องจากมีการนำสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มนี้มาใช้กันมากทางสาธารณสุขสำหรับควบคุมการระบาดของโรคที่นำโดยยุง เพราะมีความเป็นพิษต่ำต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่มีความเป็นพิษสูงต่อแมลง[8] จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้มีรายงานยุงลายบ้านดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มนี้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย จากงานวิจัยนี้ พบว่า ยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาจังหวัดนครราชสีมาดื้อต่อไซเพอร์เมทริน เดลทาเมทริน แลมป์ดา-ไซฮาโลทริน ไบเฟนทริน เพอร์เมทรินและแอลฟา-ไซเพอร์เมทริน โดยข้อมูลนี้สนับสนุนรายงานที่ผ่านมาที่มีรายงานยุงลายบ้านดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ดังกล่าว[6-7] อย่างไรก็ตาม ยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษามีความไวต่อเฟนนิโตรไธออนและมาลาไธออน ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต รวมทั้งเบนดิโอคาร์บและโพรพอกเซอร์ในกลุ่มคาร์บาเมต ดังนั้น ในการควบคุมยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ อาจจำเป็นต้องใช้สารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและกลุ่มคาร์บาเมต เพื่อควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคที่นำโดยยุงลายบ้าน แต่ควรใช้เท่าที่จำเป็น เนื่องจากสารเคมีกำจัดแมลงหลายชนิดในกลุ่มดังกล่าวมีความเป็นพิษสูงต่อคน โดยเฉพาะสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต[18]

กลไกการออกฤทธิ์ของสารไพรีทรอยด์เกิดจากการที่สารไพรีทรอยด์จับกับโปรตีนบริเวณทางผ่านของโซเดียมไอออนหรือเรียกว่าโวลเทจเกทโซเดียมแชลเนล (voltage-gated sodium channel) โดยปกติโปรตีนนี้ทำหน้าที่เป็นประตูเปิดปิดช่องทางผ่านของโซเดียมไอออนในการแลกเปลี่ยนประจุให้เกิดกระแสประสาทขึ้นขณะมีสิ่งเร้ามากระตุ้น เมื่อกระแสประสาทสิ้นสุดลงโปรตีนดังกล่าวจะปิดช่องทางผ่านนี้ทันที การที่สารไพรีทรอยด์จับกับโปรตีนโซเดียมแชนเนลทำให้ขัดขวางการทำงานของโปรตีนดังกล่าวและเกิดกลไกป้องกันการปิดของช่องโซเดียมทำให้สามารถยืดระยะเวลาการปิดของช่องโซเดียมให้นานกว่าปกติ จึงเกิดการสร้างกระแสประสาทอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งระบบประสาทสูญเสียการควบคุม ส่งผลต่อการเคลื่อนไหว ทำให้ยุงกลายเป็นอัมพาตและตาย[19] อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ในการควบคุมยุงอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานทำให้ยุงสามารถพัฒนากลไกการดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ โดยสาเหตุหนึ่ง เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *para* ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในโปรตีนโซเดียมแชนเนลส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนโซเดียมแชนเนลตรงตำแหน่งหรือบริเวณที่สารไพรีทรอยด์ออกฤทธิ์เปลี่ยนแปลงไป (target site mutation) การเปลี่ยนแปลงหรือการแทนที่กรดอะมิโนเกิดขึ้นใน domain I, domain

II และ domain III ของโปรตีนโซเดียมแชนเนล ในปัจจุบันมีรายงานการแทนที่กรดอะมิโน 12 ตำแหน่ง ในโปรตีนโซเดียมแชนเนลของยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ คือ V410L, G923V, L982W, S989P, I1011V, I1011M, V1011M, V1016I, V1016G, T1520I, F1534C และ D1763Y[10] อย่างไรก็ตาม มีรายงานยืนยันตำแหน่งการกลายพันธุ์ 5 ตำแหน่งที่มีผลต่อการลดความไวของโปรตีนโซเดียมแชนเนลในการจับกับสารไพรีทรอยด์ คือ V410L บริเวณ segment ที่ 6 ใน domain I (IS6), S989P บริเวณ S5 และ S6 loop ใน domain II, I1011M และ V1016G บริเวณ segment ที่ 6 ใน domain II (IIS6) และ F1534C บริเวณ segment ที่ 6 ใน domain III (IIIS6)[20-21]

งานวิจัยนี้พบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในโปรตีนโซเดียมแชนเนลที่ตำแหน่งกรดอะมิโน S989P และ V1016G ในตัวอย่าง DNA เดียวกันของยุงลายบ้านดื้อไซเพอร์เมทริน เดลทาเมทริน ไบเฟนทรินเพอร์เมทริน แลมป์ดา-ไซฮาโลทริน และแอลฟา-ไซเพอร์เมทริน ซึ่งสนับสนุนรายงานที่ผ่านมาที่พบการแทนที่กรดอะมิโนทั้ง 2 ตำแหน่งดังกล่าวในตัวอย่าง DNA เดียวกันของยุงลายบ้านดื้อเดลทาเมทรินจากจังหวัดราชบุรี[22] และในตัวอย่าง DNA เดียวกันของยุงลายบ้านดื้อเพอร์เมทรินจากจังหวัดปราจีนบุรี จังหวัดราชบุรี และกรุงเทพฯ โดยการกลายพันธุ์ที่ 2 ตำแหน่งดังกล่าวในตัวอย่าง DNA เดียวกันของยุงลายบ้านดื้อเพอร์เมทรินจากกรุงเทพฯ พบจีโนไทป์ 3 รูปแบบ คือ 1) จีโนไทป์ปกติที่มีคู่แอลลีลเหมือนกัน SS และ VV (S989/V1016 double homozygous wild-type genotype) 2) จีโนไทป์กลายพันธุ์ที่มีคู่แอลลีลต่างกัน SP และ VG (P989/G1016 double heterozygous mutant genotype) และ 3) จีโนไทป์กลายพันธุ์ที่มีคู่แอลลีลเหมือนกัน PP และ GG (P989/G1016 double homozygous mutant genotype) ส่วนการกลายพันธุ์ที่ 2 ตำแหน่งดังกล่าวในตัวอย่าง DNA เดียวกันของยุงลายบ้านจากจังหวัดปราจีนบุรีและจังหวัดราชบุรี พบจีโนไทป์เพียง 2 รูปแบบ โดยไม่พบจีโนไทป์กลายพันธุ์ที่มีคู่แอลลีลเหมือนกัน PP และ GG[11] ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน S989P และ V1016G ในบริเวณ domain II เป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีผลต่อการดื้อสารไพรีทรอยด์ของยุงลายบ้าน การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน V1016G ยังมีรายงานว่าพบในตัวอย่าง DNA ของยุงลายบ้านจากจังหวัดเชียงราย จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดพะเยา จังหวัดลำพูน จังหวัดลำปาง จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดตาก และจังหวัดขอนแก่น[12] จากงานวิจัยนี้ พบว่ามีตัวอย่าง DNA ของยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์จากพื้นที่ศึกษาจังหวัดนครราชสีมา จำนวน 25 ตัวอย่าง ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนดังกล่าวใน domain II ซึ่งอาจเกิดจากมีการแทนที่กรดอะมิโนใน domain I หรือ domain III โดยมีรายงานพบยุงลายบ้านจากจังหวัดเชียงราย จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดลำปาง จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดอุตรดิตถ์ จังหวัดพิษณุโลก จังหวัดเพชรบูรณ์ จังหวัดนครสวรรค์ จังหวัดตราด และจังหวัดตาก ที่ดื้อเพอร์เมทรินมีการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน F1534C ในบริเวณ domain III[13] และยังมีรายงานพบการแทนที่กรดอะมิโนดังกล่าวที่ตำแหน่งใหม่ F1552C ในบริเวณ domain III ในยุงลายบ้านสายพันธุ์จังหวัดเชียงใหม่ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ดื้อต่อเพอร์เมทรินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 0.75[23] นอกจากนี้ มีรายงานพบการกลายพันธุ์ร่วมกันที่ตำแหน่งกรดอะมิโน V1016G และ F1534C ในตัวอย่าง DNA เดียวกันของลูกน้ำยุงลายบ้าน ยุงลายบ้านที่ตายและยุงลายบ้านที่รอดชีวิตจากการทดสอบความไวต่อเดลทาเมทรินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ซึ่งเป็นยุงลายบ้านจากจังหวัดเชียงราย จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดพะเยา จังหวัดลำพูน จังหวัดลำปาง จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดตาก และจังหวัดขอนแก่น ที่ได้ตรวจพบการกลายพันธุ์ V1016G มาก่อน โดยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าวพบจีโนไทป์ 3 รูปแบบ คือ 1) จีโนไทป์ที่มีคู่แอลลีลเหมือนกัน VV และ CC (V1016/C1534 double homozygous genotype) 2) จีโนไทป์ที่มีคู่แอลลีลต่างกัน VG และ FC (G1016/C1534 double heterozygous genotype) และ 3) จีโนไทป์ที่มีคู่แอลลีลเหมือนกัน GG

และ FF (G1016/F1534 double homozygous genotype) อย่างไรก็ตาม ไม่พบจีโนไทป์กลายพันธุ์ที่มีคู่แอลลีลเหมือนกัน GG และ CC (G1016/C1534 double homozygous mutant genotype) และไม่พบจีโนไทป์ปกติที่มีคู่แอลลีลเหมือนกัน คือ VV และ FF (V1016/F1534 double homozygous wild-type genotype) ในตัวอย่าง DNA ดังกล่าว[12] ต่อมาได้มีงานวิจัยที่สนับสนุนการพบจีโนไทป์ 3 รูปแบบดังกล่าวในตัวอย่าง DNA ของยุงลายบ้านจากจังหวัดเชียงใหม่ที่ตายและรอดชีวิตจากการทดสอบความไวต่อเดลทาเมทรินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05[24] จากงานวิจัยหลายชิ้นที่กล่าวมาได้รายงานการกลายพันธุ์ร่วมกัน 2 ตำแหน่งของยีน *para* ในยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์จากหลายจังหวัดของประเทศไทย โดยมีรายงานว่าการกลายพันธุ์ร่วมกันที่ตำแหน่งกรดอะมิโน S989P และ V1016G ทำให้เพิ่มระดับการดื้อเดลทาเมทรินของยุงลายบ้าน[22] นอกจากนี้ มีรายงานที่พบว่ายุงลายบ้านที่มีจีโนไทป์กลายพันธุ์ร่วมกัน 3 ตำแหน่งที่เป็นคู่แอลลีลต่างกัน S989P V1016G และ F1534C (triple heterozygous mutant genotype) ทำให้ยุงลายบ้านมีระดับการดื้อต่อเดลทาเมทรินสูง[25] ถึงแม้ว่ามีรายงานพบการกลายพันธุ์ F1534C ในยุงลายบ้านไม่มีความสัมพันธ์กับการดื้อต่อเดลทาเมทริน[12] อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการกลายพันธุ์ร่วมกันที่ 3 ตำแหน่งดังกล่าว อาจช่วยเพิ่มระดับการดื้อต่อเดลทาเมทรินของยุงลายบ้านได้ จากงานวิจัยที่ได้กล่าวมานี้ทำให้ทราบว่าการดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ของยุงลายบ้านเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *para* อย่างไรก็ตาม มีอีกหนึ่งสาเหตุที่เป็นไปได้ที่ตัวอย่าง DNA ของยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ทั้ง 6 ชนิดจากพื้นที่ศึกษาจังหวัดนครราชสีมา จำนวน 25 ตัวอย่าง ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในบริเวณ domain II ซึ่งอาจจะไม่มีการกลายพันธุ์ในบริเวณ domain I และ domain III เช่นกัน แต่อาจเกิดจากกลไกการดื้อต่อสารไพรีทรอยด์จากกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยมีการเพิ่มขึ้นหรือเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของเอนไซม์เอสเทอเรส (esterases) ไซโตโครม พี450 โมโนออกซิเจเนส (cytochrome P450 monooxygenases) หรือมิกซ์ฟังก์ชั่นออกซิเดส (mixed function oxidase, MFO) และกลูตาไทโอนเอสทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferases) ในยุงลายบ้าน ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ ช่วยสลายพิษของสารเคมีกำจัดแมลงจึงป้องกันสารเคมีกำจัดแมลงเข้าไปออกฤทธิ์ในบริเวณเป้าหมาย[19]

การทราบกลไกการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านมีความสำคัญต่อการพิจารณาเลือกใช้สารเคมีกำจัดแมลงที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลง อย่างไรก็ตาม ในการควบคุมยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงควรใช้วิธีแบบบูรณาการที่มีความปลอดภัย โดยมุ่งเน้นการกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายอย่างสม่ำเสมอ ลดจำนวนยุงตัวเต็มวัยโดยใช้วัสดุอุปกรณ์กำจัดยุงและใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรป้องกันกำจัดยุงลายที่มีความปลอดภัยเพื่อป้องกันโรคที่นำโดยยุงลาย ควรลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลงหรือใช้เท่าที่จำเป็นเพื่อลดหรือชะลอการพัฒนาการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุง โดยองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ได้มีการรายงานข้อมูลความไวและการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านไปยัง สำนักงานสาธารณสุขอำเภอโชคชัย จังหวัดนครราชสีมา เพื่อแจ้งข้อมูลดังกล่าวไปยังโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลหนองปรึกที่รับผิดชอบในพื้นที่ศึกษาเพื่อให้มีข้อมูลชนิดและความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดแมลงที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมเตรียมพร้อมสำหรับควบคุมยุงลายบ้านและป้องกันการระบาดของโรคที่นำโดยยุงลายบ้าน

สรุป

งานวิจัยนี้สรุปได้ว่ายุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาจังหวัดนครราชสีมาดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ทั้ง 6 ชนิด โดยมีอัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาที่ 24 ชั่วโมง อยู่ระหว่างร้อยละ 9.00±3.83 - 26.00±5.16 และพบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในโปรตีนโซเดียมแชนเนล โดยมีการแทนที่กรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง คือ S989P และ V1016G ในตัวอย่าง DNA เดียวกันของยุงลายบ้าน

ดื้อสารไพรีทรอยด์ที่ความถี่การกลายพันธุ์ เท่ากับ 0.58 โดยยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาจังหวัดนครราชสีมาที่ดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมมีความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงเฟนนิโตรไธออนและมาลาไธออน ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต รวมทั้งโพรพอกเซอร์ และเบนดิโอคาร์บในกลุ่มคาร์บาเมต โดยมีอัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ ร้อยละ 100±0

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณประจำปี 2563 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสาธารณสุขอำเภอโชคชัย และผู้อำนวยการโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลหนองปรึก อำเภอโชคชัย จังหวัดนครราชสีมาที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Limkittikul K, Brett J, L'Azou M. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Thailand (2000-2011): A Systematic Literature Review. PLoS Negl Trop Dis 2014;8(11):e3241.
2. Bureau of Vector-Borne Diseases Control, Department of Disease Control. Dengue Fever [Internet]. [cited 2021 Jan 11]. Available from: https://drive.google.com/drive/folders/1T-TaSvaYYamVwA5Ig7ATZJmIcHBuGXOSb (in Thai)
3. World Health Organization. Zika virus [Internet]. [cited 2021 Feb 27]. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus
4. Bureau of Vector-Borne Diseases Control, Department of Disease Control. Zika virus [Internet]. [cited 2021 Jan 19]. Available from: https://drive.google.com/file/d/18QD6uwaQ844gfsZSGWA01puklko1hKCM/view (in Thai)
5. Division of Epidemiology, Department of Disease Control (TH). Reporting of Priority Diseases Guideline, Thailand. 2012. 30 p. (in Thai)
6. Division of Vector borne Diseases, Department of Disease Control. Reporting of Insecticide Susceptibility in Mosquito Vectors [Internet]. [cited 2020 Dec 10]. Available from: https://drive.google.com/drive/folders/1Kzxz3iEg-yAzNpIDSEWJ0QTy_eVoS7FJY (in Thai)
7. Chareonviriyaphap T, Bangs MJ, Suwonkerd W, Kongmee M, Corbel V, Ngoen-Klan R. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. Parasit Vectors. 2013;6:280.
8. World Health Organization. Safety of pyrethroids for public health use [Internet]. [cited 2020 Dec 10]. Available from:https://www.who.int/publications/i/item/WHO.PCS.RA.2005.1
9. Soderlund DM, Bloomquist JR. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Roush RT, Tabashnikin BE, editors. Pesticide Resistance in Arthropods. New York: Chapman and Hall; 1990. p. 58-96.
10. Fan Y, O'Grady P, Yoshimizu M, Ponlawat A, Kaufman PE, Scott JG. Evidence for both sequential mutations and recombination in the evolution of *kdr* alleles in *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(4):e0008154.
11. Sirsawat R, Komalamisra N, Apiwathnasorn C, Paeporn P, Roytrakul S, Rongsriyam Y, et al. Field-collected permethrin-resistant *Aedes aegypti* from central Thailand contain point mutatioms in the domain IIS6 of the sodium channel gene (*kdr*) Southeast Asian J Trop Med Public

Health. 2012;43(6):1380-6

12. Stenhouse SA, Plernsub S, Yanola J, Lumjuan N, Dantrakool A, Choochote W, et al. Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand. Parasit Vectors. 2013;6:253.

13. Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang P, Prapanthadara L. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. Trop Med Int Health. 2011;16(4):501-9.

14. Sri-ard B. Preliminary research. 3rd ed. Bangkok: Suweriyasan; 1992. (in Thai)

15. World Health Organization. Monitoring and managing insecticide resistance in Aedes mosquito populations. Interim guidance for entomologists [Internet]. [cited 2021 Feb 27]. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204588/WHO_ZIKV_VC_16.1_eng.pdf?sequence=2&isAllowed=y

16. Chung HH, Cheng IC, Chen YC, Lin C, Tomita T, Teng HJ. Voltage-gated sodium channel intron polymorphism and four mutations comprise six haplotypes in an *Aedes aegypti* population in Taiwan. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13(3):e0007291. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007291

17. Abbott W. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol. 1925; 18:265-7.

18. Martin-Reina J, Duarte JA, Cerrillos L, Bautista JD, Moreno I. Insecticide Reproductive Toxicity Profile: Organophosphate, Carbamate and Pyrethroids. J Toxins. 2017;4(1):7.

19. Liu N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. Annu Rev Entomol. 2015;60:537-59.

20. Haddi K, Tomé HVV, Du Y, Valbon WR, Nomura Y, Martins GF, et al. Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. Sci Rep. 2017; 7:46549. doi: 10.1038/srep46549.

21. Du Y, Nomura Y, Satar G, Hu Z, Nauen R, He SY, et al. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110 (29):11785-90. doi: 10.1073/pnas.1305118110. Epub 2013 Jul 2

22. Srisawat R, Komalamisra N, Eshita Y, ZhengM, Ono K, Itoh TQ, et al. Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Appl Entomol Zool. 2010; 45:275-82.

23. Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Prapanthadara L. A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. Pesti Biochem Physiol. 2010; 96:127-31.

24. Plernsub S, Saingamsook J, Yanola J, Lumjuan N, Tippawangkosol P, Walton C, et al. Temporal frequency of knockdown resistance mutations, F1534C and V1016G, in *Aedes aegypti* in Chiang Mai city, Thailand and the impact of the mutations on the efficiency of thermal fogging

spray with pyrethroids. Acta Trop. 2016;162:125-32.

25. Plernsub S, Saingamsook J, Yanola J, Lumjuan N, Tippawangkosol P, Sukontason K, et al. Additive effect of knockdown resistance mutations, S989P, V1016G and F1534C, in a heterozygous genotype conferring pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. Parasit Vectors. 2016;9:417.