

ความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและการบำเนตของยุงลายบ้าน คือสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมจากพื้นที่เสี่ยงโรคไข้เลือดออกในจังหวัดพิษณุโลก

ธัญญภัทธรณ์ มากรัตน์, วท.บ.

ชญาดา ขำสวัสดิ์, วท.ม.

จริยา ครุฑบุตร, วท.บ.

จักรวาล ชมภูศรี, ปร.ด.

อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์, พ.บ., ปร.ด.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

วันที่รับบทความ (Received), 27 ธันวาคม 2566 วันที่แก้ไขบทความ (Revised), 14 กุมภาพันธ์ 2567

วันที่ตอบรับบทความ (Accepted), 20 กุมภาพันธ์ 2567

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและการบำเนตของยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมจากพื้นที่เสี่ยงโรคไข้เลือดออกในจังหวัดพิษณุโลก นำยุงลายบ้านจากจังหวัดพิษณุโลกมาทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง 16 ชนิด โดยวิธีขององค์การอนามัยโลกและศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ โดยวิธี PCR และ DNA sequencing จากการศึกษพบว่า ยุงลายบ้านมีความไวต่อ fenitrothion malathion และ fenobucarb โดยมีอัตราตายเฉลี่ย ร้อยละ 100 ที่ 24 ชั่วโมง แต่คือต่อ pirimiphos-methyl, propoxur และสารไพรีทรอยด์ทั้ง 10 ชนิด โดยมีอัตราตายเฉลี่ยร้อยละ 3.00 ± 2.00 - 87.00 ± 5.03 ซึ่งอัตราตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านมีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ พบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ V1016G ในยุงลายบ้าน โดยมีความถี่การกลายพันธุ์เฉลี่ยเท่ากับ 0.52 สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและการบำเนต อาจเป็นทางเลือกสำหรับใช้ในการควบคุมยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมเพื่อป้องกันโรค ที่นำโดย ยุงลายบ้าน

คำสำคัญ: ความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง, การกลายพันธุ์ของยีน *para*, ยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์

Organophosphate and carbamate insecticide susceptibility in genetically pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from a dengue risk area in Phitsanulok province

Thanyapak Makruen, B.Sc.

Chayada Khamsawads, M.Sc.

Jariya Krutbut, B.Sc.

Jakkrawarn Chompoosri, Ph.D.

Archawin Rojanawiwat, M.D., Ph.D.

National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health

Abstract

The purpose of this study was to investigate the susceptibility of genetically pyrethroid-resistant *Ae. aegypti* to organophosphate and carbamate insecticides in a dengue risk area in Phitsanulok province. The mosquitoes were tested for susceptibility to individual 16 insecticides status using the WHO procedure. PCR and DNA sequencing were conducted to detect mutation in the *para* gene in pyrethroid-resistant *Ae. aegypti*.

The results showed that the mosquitoes were completely susceptible to fenitrothion, malathion, and fenobucarb with mean mortality rates of 100% after 24 h. However, the mosquitoes were resistant to pirimiphos-methyl, propoxur, and 10 pyrethroid insecticides with the mean mortality rates ranging from $3.00 \pm 2.00\%$ and $87.00 \pm 5.03\%$. The mortality rates of mosquitoes were significantly different among insecticides ($p < 0.05$). In addition, a mutation in the *para* gene at position V1016G was detected with a mutation frequency mean of 0.52. Suggesting that organophosphates and carbamates could be alternative insecticides to pyrethroids for controlling genetically pyrethroid-resistant *Ae. aegypti* and preventing *Ae. aegypti*-borne diseases.

Keywords: insecticide susceptibility, *para* gene, pyrethroid-resistant *Ae. aegypti*

บทนำ

โรคไข้เลือดออกเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี (dengue virus, DENV) ซึ่งมี 4 ซีโรไทป์ (serotype) คือ DENV 1, DENV 2, DENV 3 และ DENV 4 โดยมียุงลายบ้านเป็นพาหะหลัก โรคไข้เลือดออกมีการระบาดครั้งแรกในประเทศไทยที่เขตกรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2501 มีรายงานผู้ป่วย 2,158 คน และเสียชีวิต 300 คน หลังจากนั้นโรคไข้เลือดออกได้ระบาดไปทั่วประเทศจนมาถึงปัจจุบัน ในปี พ.ศ. 2565 มีรายงานผู้ป่วยไข้เลือดออก 39,141 คน (อัตราป่วย 59.15 คนต่อประชากรแสนคน) และเสียชีวิต 27 คน (อัตราป่วยตาย ร้อยละ 0.04)⁽¹⁾ การควบคุมและป้องกันโรคไข้เลือดออกดำเนินการโดยการจัดการสิ่งแวดล้อมเพื่อกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลาย การใช้สารเคมีกำจัดลูกน้ำและยุงตัวเต็มวัย โดยเฉพาะสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์เป็นหนึ่งในแนวทางที่สำคัญทางสาธารณสุขในการควบคุมยุงพาหะนำโรคในประเทศไทย⁽²⁾ เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่มีความเป็นพิษสูงต่อแมลงจึงใช้สารดังกล่าวอย่างแพร่หลายทุกภูมิภาคของประเทศไทย⁽³⁾ อย่างไรก็ตาม มีรายงานยุงลายบ้านดื้อต่อสารไพรีทรอยด์สังเคราะห์หลายชนิด เช่น cypermethrin, cyfluthrin, deltamethrin, lambda-cyhalothrin, bifenthrin, permethrin, etofenprox และ alpha-cypermethrin ในหลายพื้นที่ทั่วประเทศไทย^(2,4) นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในโปรตีน โซเดียมแชนแนลที่เป็นบริเวณเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสารไพรีทรอยด์ โดยพบการแทนที่ กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 410 (V410L), 989 (S989P), 1016 (V1016G) และ 1534 (F1534C)⁽⁵⁾ ซึ่งการดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมของยุงลายบ้านทำให้ไม่สามารถใช้สารไพรีทรอยด์ในการควบคุมและป้องกันโรคที่นำโดยยุงลายบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตของยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่ง 1016 จากพื้นที่เสี่ยงโรคไข้เลือดออกในจังหวัดพิษณุโลก ตามวิธี ขององค์การอนามัยโลก (WHO) โดยงานวิจัยนี้เลือกศึกษาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าวเนื่องจากมีรายงาน การตรวจพบในยุงลายบ้านจากหลายจังหวัดของประเทศไทยและในหลายประเทศแถบเอเชีย⁽⁵⁾ ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่ง 1016 อยู่ในบริเวณ domain II ของโปรตีน โซเดียมแชนแนลในยุงลายบ้าน การทราบกลไกการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านมีความสำคัญต่อการพิจารณาเลือกใช้สารเคมีกำจัดแมลงที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมยุงลายบ้านคือสารเคมีกำจัดแมลงและป้องกันโรคที่นำโดย ยุงลายบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการวิจัย

1. ยุงลายบ้าน

เก็บยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาบ้านพรสวรรค์ หมู่ 9 ตำบลนิคมพัฒนา อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก (16° 44' 24" N 99° 56' 57" E) โดยพื้นที่ศึกษานี้เป็นการคัดเลือกพื้นที่ศึกษาแบบเจาะจงจากกรมควบคุมโรค กองโรคติดต่อมาโดยแมลง ตามการรายงานยุงลายบ้านคือสารเคมีกำจัดแมลงและมีรายงานผู้ป่วยไข้เลือดออก⁽⁴⁾ ได้ดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงลายบ้านโดยใช้หลอดหยด (dropper) และยุงลายบ้านตัวเต็มวัยโดยใช้สวิงโฉบแมลง (sweep net) ในบ้านจำนวน 67 หลัง จากจำนวนบ้านทั้งหมด 164 หลัง ในเดือนกุมภาพันธ์ 2565 คิดเป็นร้อยละ 40.8 โดยคัดแปลงจากเกณฑ์ในการประมาณขนาดกลุ่มตัวอย่างประชากรร้อยละ 15-30 จากประชากรทั้งหมดหลักร้อยละ⁽⁶⁾

2. การทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้าน

ทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานกีฏวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทั้ง 16 ชนิด ที่ความเข้มข้น Discriminating concentration (ค่าความเข้มข้น 2 เท่าของค่าความเข้มข้นที่ทำให้ยุงลายบ้านห้องปฏิบัติการตายร้อยละ 99, LC₉₉) จากกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 3 ชนิด คือ Fenitrothion ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, malathion ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ pirimiphos-methyl ความเข้มข้นร้อยละ 0.074 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กลุ่มคาร์บาเมต 3 ชนิด คือ propoxur ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร, fenobucarb ความเข้มข้นร้อยละ 0.336 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ bendiocarb ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และกลุ่มไพริทรอยด์ 10 ชนิด คือ alpha-cypermethrin ความเข้มข้นร้อยละ 0.08 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, bifenthrin ความเข้มข้นร้อยละ 0.09 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, deltamethrin ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, cypermethrin ความเข้มข้น ร้อยละ 0.22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, lambda-cyhalothrin ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, permethrin ความเข้มข้นร้อยละ 0.75 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, d-trans Allethrin ความเข้มข้นร้อยละ 0.118 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, bioresmethrin ความเข้มข้นร้อยละ 0.674 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, prallethrin ความเข้มข้น ร้อยละ 0.084 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ s-bioallethrin ความเข้มข้นร้อยละ 0.076 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามวิธีขององค์การอนามัยโลก (WHO susceptibility test)⁽⁷⁾ โดยนำกระดาศกรองซูปสารเคมี กำจัดแมลง 16 ชนิด นำยุงลายบ้าน เพศเมีย อายุ 3-5 วัน 25 ตัว/กระบอก/4 ชั่วโมง สัมผัสกับกระดาศกรองซูปด้วยสารเคมีกำจัดแมลง 60 นาที จากนั้นถ่ายยุงลายบ้านไปยังกระบอกพัก และคำนวณอัตราการตายของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษา ที่ 24 ชั่วโมง โดยยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่สัมผัสกับกระดาศกรองที่ซูปสารเคมีกำจัดแมลงแต่ละชนิดใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก ส่วนยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาและยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่สัมผัสกับกระดาศกรองที่ซูปอะซิโตน (acetone) ใช้เป็นชุดควบคุมผลลบ แปลผลระดับความไวและการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านตามเกณฑ์การประเมินผลความไวของยุงตัวเต็มวัยต่อสารเคมีกำจัดแมลง โดย

อัตราตายต่ำกว่าร้อยละ 90 หมายถึง ยุงคือต่อสารเคมีกำจัดแมลง อัตราตายอยู่ระหว่างร้อยละ 90-97 หมายถึง ยุงเริ่มคือต่อสารเคมีกำจัดแมลง และอัตราตายอยู่ระหว่างร้อยละ 98-100 หมายถึง ยุงมีความไวหรือไม่คือต่อสารเคมีกำจัดแมลง⁽⁷⁾

3. การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (Polymerase chain reaction, PCR) และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

สกัด genomic DNA ของตัวอย่างยุงลายบ้านเพศเมียไม่กินเลือดที่คือสารไพรีทรอยด์และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ตายจากการทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) ดังนี้ 1) เตรียมตัวอย่างยุงเพศเมีย 1 ตัว ($\leq 25\text{mg}$) 2) เติมน้ำ Buffer ATL (Tissue lysis buffer) 180 μl 3) เติมน้ำ Proteinase K solution 20 μl เขย่าโดยใช้เครื่อง vortex 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำตัวอย่างมาเขย่าทุกๆ 30 นาที 4) เติมน้ำ Buffer AL (Lysis buffer) 200 μl เขย่าโดยใช้เครื่อง vortex 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที และปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 1-2 วินาที 5) เติมน้ำ Ethanol (96-100%) 200 μl เขย่าโดยใช้ เครื่อง vortex 1 นาที และปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 8000 rpm เป็นเวลา 1-2 วินาที 6) เติมน้ำส่วนผสมลงใน QIAamp Minispin column ปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที 7) เติมน้ำ Buffer AW1 500 μl ปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 14000 rpm เป็นเวลา 3 นาที และปั่นต่อที่ 14800 rpm เป็นเวลา 1 นาที 8) เติมน้ำ Nuclease-free water 30 μl ลงใน QIAamp Minispin column บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที 9) วัดความเข้มข้น ของ genomic DNA โดยใช้เครื่อง Nanodrop Spectrophotometer และเก็บ genomic DNA ที่ -20 °C และการตรวจหายีน *para* บริเวณเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสาร ไพรีทรอยด์โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (Polymerase chain reaction, PCR) ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA) โดยเตรียมปฏิกิริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตรที่มีชุดไพรเมอร์: 20 ไมโครโมล AaSCF20 (5'- GACAATGTGGATCGCTTCCC -3') และ 20 ไมโครโมล AaSCR21 (5'- GCAATCTGGCTTGTTAACTTG -3')⁽⁸⁾ รายละเอียดดังแสดงใน ตาราง 1

ตาราง 1 Q5 High-Fidelity DNA polymerase chain reaction master mix

Component	1Rxn	39Rxn
		(x2 repeat =100 µl /sample)
5x Q5 Reaction Buffer	10.0 µl (1X)	390 µl
5x Q5 High GC Enhancer (optional)	10.0 µl (1X)	390 µl
10 mM dNTPs (TaKaRa=2.5 mM each)	1.0 µl (200uM)	39 µl
20 uM of AaASCF20	1.25 µl (0.5 uM)	48.75 µl
20 uM of AaASCR21	1.25 µl (0.5 uM)	48.75 µl
Q5 High-Fidelity DNA polymerase	0.5 µl (0.02 U/ul)	19.5 µl
Nuclease-Free Water	16.0 µl	624 µl (78 µl /8 times)
Total	40.0 µl	1560 ul
DNA template	10.0 µl (<1,000 ng)	
Final volume	50.0 µl	

จากนั้นนำปฏิกิริยาที่เตรียมในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เข้าเครื่อง CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, California, USA) ตั้งโปรแกรมจำนวน 7 ขั้นตอน โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ส รายละเอียดดังแสดงใน ตาราง 2

ตาราง 2 Thermocycling Conditions for a PCR program (AaSCF20, AaSCR21)

Step	Temperature (°C)	Time	Cycles
Pre-denaturation	95	5 min	1
Denaturation	94	30 sec	34
Annealing	55	30 sec	
Extension	72	1 min	
Final extension	72	10 min	1
Hold	4-10	∞	

หลังจากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ร้อยละ 1 นำส่ง DNA เป้าหมายที่บริสุทธิ์ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัทแมคโครเจน ประเทศเกาหลี (Macrogen Inc., GeumCheon-Gu, Seoul, Korea) วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับ

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยโปรแกรม MEGA-X⁽⁹⁾ เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *para*

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาที่ได้จากการทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง 16 ชนิด ใช้สถิติ One-Way ANOVA (F-test) และ Bonferroni multiple comparison test เพื่อการทดสอบเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการตายเป็นรายคู่ในวิธี Post Hoc test กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติ (α) = 0.05 โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics for Windows, version 27.0⁽¹⁰⁾ (IBM Corp. Armonk, New York, USA) ถ้าอัตราการตายของยุงลายบ้านเปรียบเทียบอยู่ระหว่างร้อยละ 5-20 ใช้สูตร Abbott⁽¹¹⁾ ปรับแก้อัตราการตาย ดังนี้

$$\text{อัตราการตายที่ถูกต้อง} = \frac{\text{อัตราการตายของยุงลายบ้านทดสอบ} - \text{อัตราการตายของยุงลายบ้านเปรียบเทียบ} \times 100}{100 - \text{อัตราการตายของยุงลายบ้านเปรียบเทียบ}}$$

ถ้าอัตราการตายของยุงลายบ้านเปรียบเทียบมากกว่าร้อยละ 20 ต้องทำการทดสอบใหม่

ผลการศึกษา

1. การทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้าน

การทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง 16 ชนิด ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คาร์บาเมตและไพรีทรอยด์ของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาจังหวัดพิษณุโลก รายละเอียดดังแสดงใน Figure 1 พบว่ายุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษามีความไวต่อ fenitrothion และ malathion ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต รวมทั้ง fenobucarb ในกลุ่มคาร์บาเมต โดยมีอัตราการตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ ร้อยละ 100 แต่เริ่มคัดต่อ bendiocarb โดยมีอัตราการตายเฉลี่ยของยุงลายบ้าน ร้อยละ 95.00 ± 1.16 และคัดต่อ pirimiphos-methyl propoxur และสารไพรีทรอยด์ทั้ง 10 ชนิด โดยมีอัตราการตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาอยู่ระหว่างร้อยละ 3.00 ± 2.00 ถึง 87.00 ± 5.03 และอัตราการตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาที่ได้จากการทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงทั้ง 16 ชนิด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ ส่วนยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการมีความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงทั้ง 16 ชนิด โดยมีอัตราการตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ ร้อยละ 100

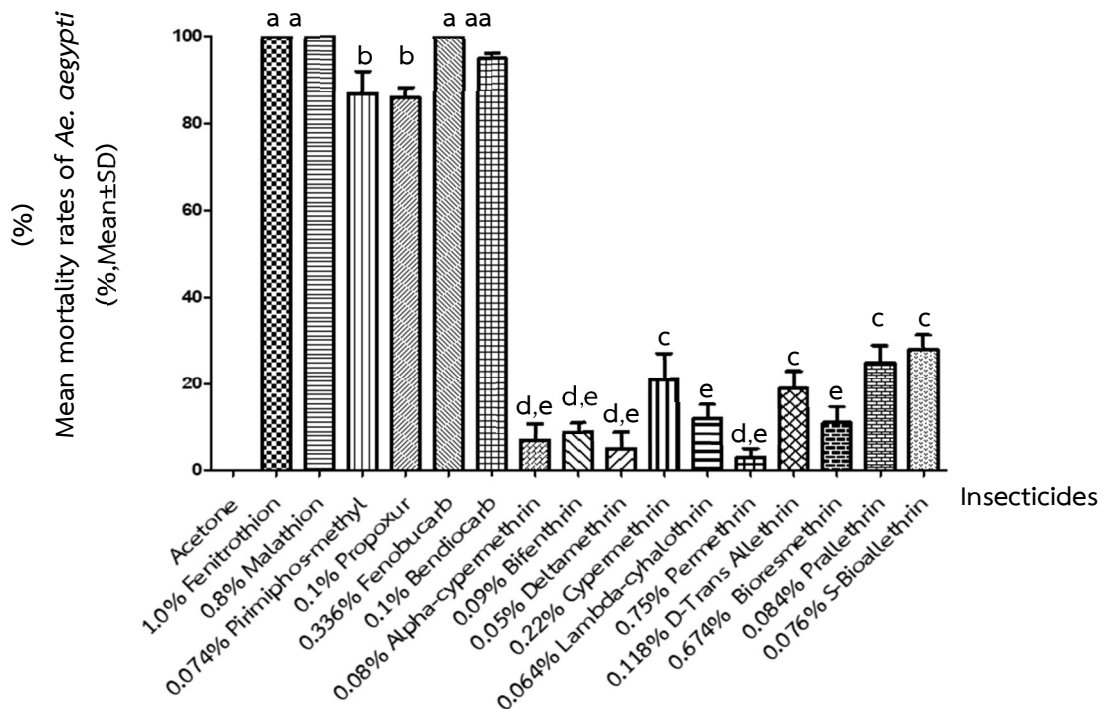


Figure 1 Mean mortality rates of *Ae. aegypti* from Phitsanulok province derived from insecticide susceptibility test. Different letters followed by mean mortality ($\pm$ SD) indicate the statistically significant difference in mean mortality rates ($p < 0.05$)

2. การกลายพันธุ์ของยีน *para* ในยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction, PCR) และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA เป้าหมายของยีน *para* ของยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ที่ตายจากการทดสอบความไวต่อ fenitrothion, malathion และ fenobucarb จำนวน 90 ตัวอย่าง และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ตายจากการทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงดังกล่าวทั้ง 3 ชนิด จำนวน 90 ตัวอย่าง โดยวิธี PCR และตรวจสอบขนาดของผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าผลผลิต PCR ของยีน *para* ของยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการมีขนาดประมาณ 614-630 bp ขึ้นอยู่กับ intron polymorphism (234-250 bp)⁽⁸⁾ รายละเอียดดังแสดง ใน Figure 2 และจากการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ด้วยวิธี DNA sequencing แล้วนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ของยีน *para* โดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ในฐานข้อมูล GenBank ที่เป็นบริเวณ S6 segment ใน domain II ของโปรตีนโซเดียมแชนเนลของยุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติที่ไม่มีการแทนที่กรดอะมิโนวาเลิน (Valine, V) ที่ตำแหน่ง

1016 และยุงลายบ้านสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีการแทนที่กรดอะมิโนจากวาลีน (Valine, V) เป็น ไกลซีน (Glycine, G), V1016G รายละเอียดดังแสดงใน Figure 3A จากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ในยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ จำนวน 90 ตัวอย่าง พบว่า มีการกลายพันธุ์ของยีน *para* จำนวน 47 ตัวอย่าง (ร้อยละ 55.22) โดยมีการแทนที่กรดอะมิโนในโปรตีนไซโตเคมแซนเนลในตัวอย่าง DNA คือ V1016G มีการแทนที่เบสตัวที่ 2 ในโคดอนจาก GTA ที่กำหนดกรดอะมิโนวาลีนในยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ รายละเอียดดังแสดงใน Figure 3B เป็น GGA ที่กำหนดกรดอะมิโนไกลซีนในยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ รายละเอียดดังแสดงใน Figure 3C การกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งดังกล่าวมีความถี่การกลายพันธุ์เท่ากับ 0.52 หรือคิดเป็นร้อยละ 52 ของตัวอย่าง DNA ที่วิเคราะห์ทั้งหมด รายละเอียดดังแสดงใน ตาราง 3 ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการไม่พบการกลายพันธุ์ ของยีน *para* ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนดังกล่าว

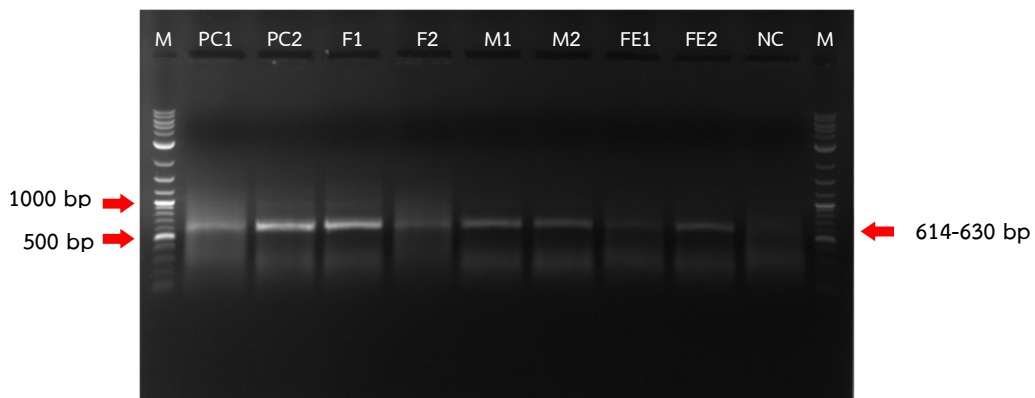


Figure 2 PCR products of 614-630 bp in size of the *para* gene, Lane M: Marker = 1kb Plus DNA Ladder; Lane PC1 and PC2: genomic DNA of laboratory strain of *Ae. aegypti*; Lane F1 and F2: genomic DNA of pyrethroid-resistant *Ae. aegypti* died from 1.0% fenitrothion; Lane M1 and M2: genomic DNA of pyrethroid-resistant *Ae. aegypti* died from 0.8% malathion; Lane FE1 และ FE2: genomic DNA of pyrethroid-resistant *Ae. aegypti* died from 0.336% fenobucarb; Lane NC: negative control

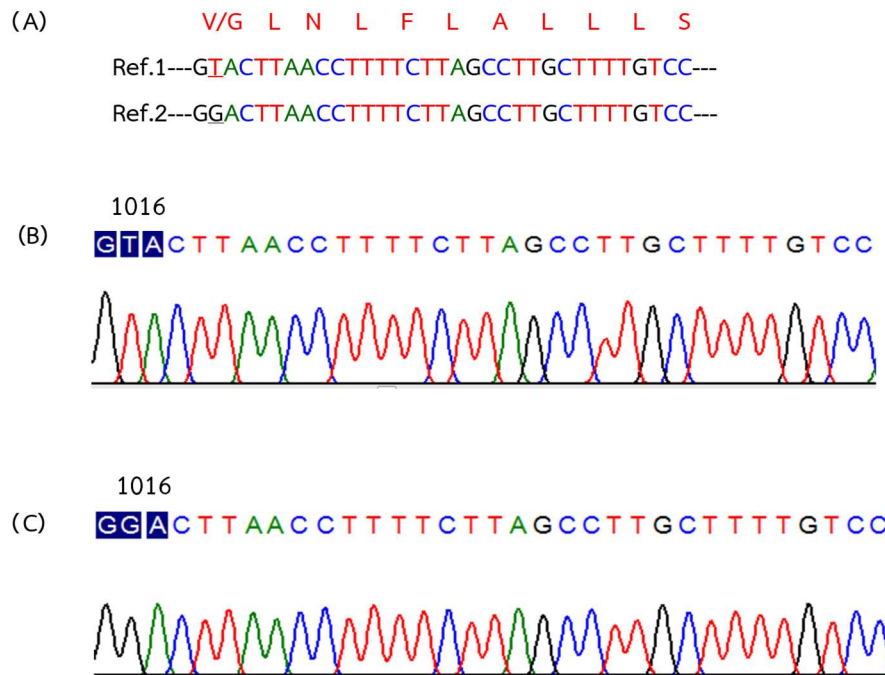


Figure 3 Partial nucleotide sequences of the *para* gene at the S6 segment in domain II (IIS6) of voltage-gated sodium channel protein in *Ae. aegypti* (exon 20). (A) Ref. 1 is a wild-type strain of *Ae. aegypti* (GenBank: AB914690.1) and Ref 2 is *Ae. aegypti* with the V1016G mutation (GenBank: AB914689.1) (B) Wild-type laboratory strain of *Ae. aegypti* (V1016) and (C) Pyrethroid-resistant *Ae. Aegypti* from Phitsanulok province with the V1016G mutation

ตาราง 3 Mutation frequencies of the *para* gene in pyrethroid-resistant *Ae. Aegypti* that died from the organophosphate and carbamate susceptibility test

Pyrethroids-resistant			
<i>Ae. aegypti</i> that died from organophosphate and carbamate insecticides	No. of analyzed DNA samples	No. of DNA samples positive for a <i>para</i> gene mutation	Mutation frequency
fenitrothion	30	14	0.47
malathion	30	18	0.60
fenobucarb	30	15	0.50
Total	90	47	1.57
Mean	30	16	0.52

วิจารณ์ผลการวิจัย

การดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านทำให้ไม่สามารถใช้สารเคมีกำจัดแมลงในการควบคุมยุงลายบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันจึงมีรายงานยุงลายบ้านดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงหลายชนิดในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คาร์บาเมต และไพรีทรอยด์จากหลายพื้นที่ทั่วประเทศไทย^(2,4) จึงเป็นเรื่องที่น่ากังวลอย่างมาก โดยเฉพาะสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มไพรีทรอยด์ที่มีการนำมาใช้กันมากทางสาธารณสุขสำหรับควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคไข้เลือดออกเนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแต่มีความเป็นพิษสูงต่อแมลง⁽³⁾ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้มีรายงานยุงลายบ้านดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยพบว่ายุงลายบ้านจาก 10 จังหวัด คือ เชียงใหม่ ลำปาง แม่ฮ่องสอน เชียงราย อุดรดิตถ์ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ ตราด และตาก ดื้อต่อ permethrin⁽¹²⁾ โดยเฉพาะยุงลายบ้านดื้อ permethrin จากจังหวัดตากที่พบบริเวณชายแดนไทย-พม่า มีอัตราการตายของยุงลายบ้านที่ร้อยละ 20⁽¹³⁾ และยังมีรายงานว่ายุงลายบ้านจาก 8 จังหวัด คือ เชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำพูน ลำปาง แม่ฮ่องสอน ตาก และขอนแก่น ดื้อต่อ deltamethrin⁽¹⁴⁾ การดื้อต่อ permethrin และ deltamethrin รวมถึง bifenthrin ของยุงลายบ้านยังมีรายงานในอีก 7 จังหวัด คือ กรุงเทพฯ พระนครศรีอยุธยา อุดรดิตถ์ มุกดาหาร สกลนคร พัทลุง และชุมพร โดยมีอัตราการตายของยุงลายบ้านที่ร้อยละ 2-55, 0-37 และ 4-39 ตามลำดับ⁽¹⁵⁾ การใช้ สารไพรีทรอยด์ในการควบคุมยุงลายบ้านอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานสามารถเป็นสาเหตุทำให้ยุงลายบ้านมีการพัฒนากลไกการดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ ซึ่งโดยปกติสารไพรีทรอยด์สามารถออกฤทธิ์โดยการไปจับกับ โวลเทจเกตโซเดียมแชนแนล (voltage – gated sodium channel) ซึ่งเป็นโปรตีนทำหน้าที่เป็นประตูเปิดปิดช่องทางผ่านของโซเดียมไอออนในการแลกเปลี่ยนประจุให้เกิดกระแสประสาทขึ้นขณะมีสิ่งเร้ามากระตุ้นเมื่อกระแสประสาทสิ้นสุดลงช่องทางผ่านนี้จะปิดทันที การที่สารไพรีทรอยด์จับกับโปรตีนโซเดียมแชนแนล ทำให้ขัดขวางการทำงานของโปรตีนดังกล่าวและเกิดกลไกป้องกันการปิดของช่องโซเดียมทำให้ระยะเวลา การเปิดของช่องโซเดียมนานกว่าปกติ จึงเกิดการสร้างกระแสประสาทอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งระบบประสาทสูญเสียการควบคุมส่งผลต่อการเคลื่อนไหวทำให้ยุงลายบ้านกลายเป็นอัมพาตและตายในที่สุด⁽¹⁶⁾ อย่างไรก็ตาม เมื่อยุงลายบ้านได้รับสัมผัสสารไพรีทรอยด์ติดต่อกันเป็นเวลานานจึงสามารถพัฒนากลไกการดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ได้ โดยเฉพาะเกิดการกลายพันธุ์ของยีน para ที่สังเคราะห์โปรตีนโซเดียมแชนแนลที่บริเวณตำแหน่งเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสารไพรีทรอยด์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือแทนที่กรดอะมิโนในโปรตีนโซเดียมแชนแนลส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนโซเดียมแชนแนลตรงตำแหน่งหรือบริเวณที่สารไพรีทรอยด์ ออกฤทธิ์เปลี่ยนแปลงไป (target site mutation) การเปลี่ยนแปลงหรือการแทนที่กรดอะมิโนเกิดขึ้นใน domain I, domain II และ domain III ของโปรตีนโซเดียมแชนแนล ในปัจจุบันมีรายงานยืนยันตำแหน่งการกลายพันธุ์ 5 ตำแหน่งที่มีผลต่อการลดความไวของโปรตีนโซเดียมแชนแนลในการจับกับสารไพรีทรอยด์ 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 (IIS6)^(17,18)

งานวิจัยนี้ พบว่า ยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์จากพื้นที่ศึกษาจังหวัดพิษณุโลกมีความไวต่อ fenitrothion และ malathion ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต รวมทั้ง fenobucarb ในกลุ่มคาร์บาเมตโดยให้อัตราตายของยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ร้อยละ 100 ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและกลุ่มคาร์บาเมตมีกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างจากสารไพรีทรอยด์ โดยสารเคมีกำจัดแมลงทั้ง 2 กลุ่มนี้ ออกฤทธิ์ที่ยีนเป้าหมาย คือ ace-I ซึ่งสร้างเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase, AChE) ที่ทำหน้าที่ในการทำลายสารอะเซทิลโคลีน (acetylcholine, ACh) โดยสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตสามารถยับยั้งการทำงานของ AChE เมื่อเอนไซม์ถูกจับด้วยโมเลกุลของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตจะส่งผลทำให้เกิดการสะสมหรือการคลั่งของสารอะเซทิลโคลีน บริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์ประสาท หรือเรียกว่าบริเวณซินแนปส์ (synapse) หรือระหว่างเซลล์ประสาทกับกล้ามเนื้อส่งผลให้กล้ามเนื้อสั่นและชักกระตุกอย่างแรงทำให้ ยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์เป็นอัมพาตและตาย โดยพบว่ายุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ที่ตายด้วย fenitrothion, malathion และ fenobucarb มีการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในโปรตีนโซเดียมแชนเนลที่ตำแหน่งกรดอะมิโน V1016G ที่ความถี่การกลายพันธุ์เท่ากับ 0.52 ซึ่งสนับสนุนรายงานที่ผ่านมาที่พบการแทนที่กรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าว ในตัวอย่าง DNA ของยุงลายบ้านคือ deltamethrin จากจังหวัดราชบุรี⁽¹⁹⁾ และในตัวอย่าง DNA ของยุงลายบ้านคือ permethrin จากจังหวัดปราจีนบุรี จังหวัดราชบุรี และกรุงเทพฯ รวมถึงตัวอย่าง DNA ของยุงลายบ้านจากจังหวัดเชียงราย จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดพะเยา จังหวัดลำพูน จังหวัดลำปาง จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดตาก และจังหวัดขอนแก่น⁽¹⁴⁾ จากรายงานที่ผ่านมารวมถึงงานวิจัย ในปัจจุบันที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่ง 1016 ในยุงลายบ้านจากหลายจังหวัดทั่วประเทศไทยอาจเป็นเพราะว่าที่ตำแหน่งดังกล่าวอยู่บริเวณ segment ที่ 6 ใน domain II (IIS6) ของโปรตีนโซเดียมแชนเนลที่ได้จากการสังเคราะห์โดยยีน *para* โดยบริเวณ segment ที่ 6 เป็นตำแหน่งการออกฤทธิ์ ของสารไพรีทรอยด์ทั้ง 2 กลุ่ม⁽²⁰⁾ คือ กลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ที่ 1 (Type I pyrethroid) เช่น bifenthrin, bioresmethrin, d-trans allethrin, permethrin, prallethrin, s-bioallethrin, transfluthrin และ กลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ที่ 2 (Type II pyrethroid) เช่น alpha-cypermethrin, cypermethrin, deltamethrin, lambda-cyhalothrin ซึ่งสารไพรีทรอยด์เหล่านี้ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดแมลงในบ้านเรือนรวมถึงยุงลายบ้าน จึงเป็นสาเหตุทำให้ยุงลายบ้านได้รับสัมผัสสารไพรีทรอยด์ ติดต่อกันเป็นเวลานาน โดยยุงลายบ้านบางส่วนของที่ได้รับสัมผัสสารเหล่านี้ในปริมาณน้อยอาจจะไม่ตายและเริ่มพัฒนากลไกการคือสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรม โดยเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่เป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสารไพรีทรอยด์ในบริเวณ segment ที่ 6 ใน domain II (IIS6) ของโปรตีนโซเดียมแชนเนล ในธรรมชาติ ยุงลายบ้านสามารถบินได้ไกลประมาณ 30-300 เมตร และเพราะพันธุ์ได้ง่ายในภาชนะขังน้ำหลายชนิด เมื่อเกิดการผสมพันธุ์สามารถถ่ายทอดยีนคือสารเคมีกำจัดแมลง

ไปยังยุงรุ่นลูกหลานได้ นอกจากนี้ ไข่ยุงลายบ้านยังทนแสงได้นานหลายเดือนจนถึงปี จึงทำให้ยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมสามารถดำรงชีวิตในสิ่งแวดล้อมได้นาน ด้วยเหตุผลเหล่านี้จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้พบยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมในหลายจังหวัดทั่วประเทศไทย การทราบกลไกการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านมีความสำคัญต่อการพิจารณาเลือกใช้สารเคมีกำจัดแมลงที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมยุงลายบ้านคือสารเคมีกำจัดแมลง อย่างไรก็ตาม ในการควบคุมยุงลายบ้านคือสารเคมีกำจัดแมลงควรใช้วิธีแบบบูรณาการที่มีความปลอดภัย โดยมุ่งเน้นการกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายอย่างสม่ำเสมอ ลดจำนวนยุงตัวเต็มวัยโดยใช้วัสดุอุปกรณ์กำจัดยุงและใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรป้องกันกำจัดยุงลาย ที่มีความปลอดภัยเพื่อป้องกันโรคที่นำโดยยุงลาย ควรลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลงหรือใช้เท่าที่จำเป็นเพื่อลดหรือชะลอการพัฒนาการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุง โดยองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ได้มีการรายงานข้อมูลความไวและการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านไปยังโรงพยาบาล ส่งเสริมสุขภาพตำบลนิคมพัฒนา ตำบลนิคมพัฒนา อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก ที่รับผิดชอบ ในพื้นที่ศึกษาเพื่อให้มีข้อมูลชนิดและความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดแมลงที่มีประสิทธิภาพในการกำจัด ยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมเตรียมพร้อมสำหรับควบคุมยุงลายบ้านและป้องกันการระบาดของโรคที่นำโดยยุงลายบ้าน

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สรุปได้ว่ายุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมจากพื้นที่ศึกษาจังหวัดพิษณุโลกมีความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง fenitrothion และ malathion ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต รวมทั้ง fenobucarb ในกลุ่มคาร์บาเมต โดยมีอัตราการตายเฉลี่ยของยุงลายบ้านจากพื้นที่ศึกษาที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 100 และพบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในโปรตีนโซเดียมแชนแนลที่เป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์ ของสารไพรีทรอยด์ โดยมีการแทนที่กรดอะมิโนตำแหน่ง V1016G ในตัวอย่าง DNA ของยุงลายบ้านคือ สารไพรีทรอยด์ที่ตายจากการทดสอบความไวต่อ fenitrothion, malathion และ fenobucarb ที่ความถี่การกลายพันธุ์ เท่ากับ 0.52

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณประจำปี 2565 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลนิคมพัฒนา ตำบลนิคมพัฒนา อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Bureau of Vector-Borne Diseases Control (BVBD), Department of Disease Control (DDC). Dengue Fever [Internet]. 2022 [cited 2022 Nov 30]. Available from: http://doe.moph.go.th/surdata/506wk/y65/d262766_4765.pdf. (In Thai).
2. 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.
3. World Health Organization (WHO). Safety of pyrethroids for public health use. [Internet]. 2005 [cited 2022 Nov 25]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO.PCS.RA.2005.1>.
4. Division of Vector Borne Diseases (DVBD), Department of Disease Control (DDC). Reporting of Insecticide Susceptibility in Mosquito Vectors [Internet]. 2022 [cited 2022 Nov 20]. Available from: https://drive.google.com/drive/folders/1Kzxz3iEgyAzNpIDSEWJ0QTy_eVoS7FJY. (In Thai).
5. 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)
6. Srisa-ard B. Preliminary research. 10th ed. Bangkok: Suweriyasan Printing; 2017. (In Thai).
7. World Health Organization (WHO). Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations. Interim guidance for entomologists [Internet]. 2016 [cited 2022 Dec 10]. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204588/WHO_ZIKV_VC_16.1_eng.pdf.
8. 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)
9. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096. PMID: 29722887; PMCID: PMC5967553.
10. IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp; 2020.
11. Abbott W. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol*. 1925; 18:265-267.

12. 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):501-509.
13. Pusawang K, Sattabongkot J, Saingamsook J, Zhong D, Yan G, Somboon P, et al. Insecticide susceptibility status of *Anopheles* and *Aedes* mosquitoes in malaria and dengue endemic areas, Thai-Myanmar border. *Insects*. 2022;13(11):1035.
14. Stenhouse SA, Plernsub S, Yanola J, Lumjuan N, Dantrakool A, Choochote W. 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.
15. Sirisopa P, Thanispong K, Chareonviriyaphap T, Juntarajumnong W. Resistance to synthetic pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Kasetsart J Nat Sci*. 2014; 48:577-586.
16. Liu N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu Rev Entomol*. 2015; 60:537-559.
17. Du Y, Nomura Y, Satar G, Hu Z, Nauen R, He SY. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(29):11785-11790.
18. Haddi K, Tomé HVV, Du Y, Valbon WR, Nomura Y, Martins GF. 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.
19. Srisawat R, Komalamisra N, Eshita Y, Zheng M, Ono K, Itoh TQ. Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Appl Entomol Zool*. 2010; 45:275-282.
20. Saavedra-Rodriguez K, Maloof FV, Campbell CL, Garcia-Rejon J, Lenhart A, Penilla P, et al. Parallel evolution of *vgsc* mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. *Sci Rep*. 2018;8(1):6747.