Thesis Title Development of an Allele-specific PCR (AS-PCR) Technique for the Detection of a Valine to Glycine Substitution at Position 1016 (V1016G) in Domain II of the Voltage Gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Author Mr. Steven Andy Stenhouse

Degree Master of Science (Parasitology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Pradya Somboon	Advisor
Asst. Prof. Dr. Anchalee Wannasarn	Co-advisor
Lect. Dr. Jintana Yanola	Co-advisor

ABSTRACT

Resistance to pyrethroid insecticides is widespread among populations of *Aedes aegypti*, an important vector for the viruses responsible for dengue fever. One of the major resistant mechanisms is target-site insensitivity known as knockdown resistance (*kdr*). A number of different single nucleotide polymorphisms within the voltage-gated sodium channel (VGSC) gene can lead to amino acid substitutions which in turn can affect the action of pyrethroids if such mutations modify the insecticide binding site. One such mutation at position 1016 in domain II, segment 6 of the VGSC gene in *Ae. aegypti* leads to a valine to glycine substitution (V1016G) that is known to confer resistance to deltamethrin.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

This study developed and utilized an allele-specific PCR (AS-PCR) assay that could be used to detect the V1016G mutation. The assay was validated against a total of 90 sequenced DNA samples representing all three genotypes and was found to be in complete agreement. Additionally, larvae and pupae were collected from various locations throughout Thailand. These were reared to adulthood and their deltamethrin resistance status was determined by standard WHO susceptibility bioassays. Deltamethrin-resistant and susceptible insects were then genotyped for the V1016G mutation by AS-PCR. Additionally, some samples were genotyped for a second mutation at position 1534 in domain III leading to a phenylalanine to cysteine substitution (F1534C), which is also known to confer pyrethroid resistance.

The bioassay results revealed an average knockdown rate of 83.2% and an overall mortality of 77.6% among 1465 female mosquitoes exposed to deltamethrin. All sampled populations displayed some degree of resistance. Homozygous 1016G (G/G) individuals survived at higher rates than either heterozygous (V/G) or wild-type (V/V) mosquitoes. The 1016G allele was significantly and positively associated with deltamethrin resistance and was widely distributed throughout Thailand at an overall frequency of 0.251. However, resistance in some populations cannot be attributed solely to this *kdr* mutation and indicates that other resistance mechanisms may be operating. Interestingly, all wild-type 1016V mosquitoes tested were homozygous for the 1534C mutation (C/C), and all heterozygous (V/G) mosquitoes were also heterozygous for 1534C (F/C). Mutant homozygous (G/G) mosquitoes expressed the wild-type (F/F) at position 1534. The presence of this mutation alone may not fully explain the resistance phenotype we see among Thai *Ae. aegypti* populations.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเทคนิค Allele-specific PCR (AS-PCR) สำหรับการตรวจหาการแทนที่วาลีนด้วยไกลซีนที่ตำแหน่ง 1016 (V1016G) ใน Domain II ของ Voltage Gated Sodium Channel ยีนของยุงลาย *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

ผู้เขียน นาย สตีเว่น แอนดี้ สเตนเฮ้าส์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปรสิตวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.ปรัชญา สมบูรณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ.ดร. อัญชลี วรรณสาร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อ.ดร.จินตนา ยาโนละ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การดื้อต่อสารไพรีทรอยด์พบได้อย่างแพร่หลายในประชากรยุงลาย *Aedes aegypti* ซึ่งเป็นพาหะสำคัญของไวรัสที่ก่อโรคไข้เดงกี่ กลไกการดื้อที่สำคัญประการหนึ่งคือ การลดความไวของเป้าหมาย (target-site insensitivity) ที่รู้จักกันในนาม knockdown resistance (*kdr*) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคิลโอไทด์เดี่ยวภายใน voltage-gated sodium channel (VGSC) ยีน ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่เป็นเป้าหมายของสารไพรีทรอยด์ เป็นที่รู้กันว่าการกลายพันธุ์จาก valine ไปเป็น glycine ที่ตำแหน่ง 1016 (V1016G) ใน domain II segment 6 ของ VGSC ยีน ใน *Ae. aegypti* ทำให้เกิดการดื้อต่อสารเดลต้าเมทริน

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธี allele-specific PCR (AS-PCR) และนำไปใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ V1016G

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยก่อนนำไปใช้ได้เปรียบเทียบกับวิธี DNA sequencing ใน 90 ตัวอย่างที่ทราบ genotype 3 แบบ พบว่าได้ผลเหมือนกันทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ยังได้เก็บตัวอย่างลูกน้ำและตัวโม่งจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศไทย นำมาเลี้ยงเป็นตัวเต็มวัยแล้วทดสอบความไวต่อสารเคลต้าเมทรินตามวิธี bioassay ขององค์การอนามัยโลก นำยุงที่ดื้อและไวต่อสารเคลต้าเมทรินนำมาตรวจหา V1016G ด้วย AS-PCR ยุงบางส่วนนำมาตรวจหาการกลายพันธุ์จาก phenylalanine ไปเป็น cysteine ที่ตำแหน่ง 1534 ใน domain III (F1534C) ซึ่งเป็นตัวหนึ่งที่ทำให้เกิดการดื้อต่อ ไพรีทรอยด์ ผลการทำ bioassay ยุงตัวเมียทั้งสิ้น 1,465 ตัวต่อเคลต้าเมทรินพบว่า ค่าเฉลี่ยของ knockdown rate อยู่ที่ 83.2% และอัตราตายรวม 77.6% โดยยุงจากท้องที่ทุกแห่งมีการดื้อแตกต่างกันไป ยุงที่เป็น homozygous 1016G (G/G) มีการอยู่รอดสูงกว่าทั้ง heterozygous (V/G) และยุงที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (wild type V/V) ความถี่โดยรวมของ allele 1016G อยู่ที่ 0.251 และพบว่าการมี allele 1016G มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการดื้อต่อเคลต้าเมทริน อย่างไรก็ตามในบางพื้นที่การดื้อไม่สอดคล้องกับ *kdr* และอาจเกี่ยวข้องกับกลไกอื่น เป็นที่น่าสนใจว่ายุงที่เป็น V/V ทุกตัวเป็น homozygous 1534C (C/C) และ heterozygous V/G ทุกตัวเป็น heterozygous F/C ด้วยเช่นกัน ยุงที่เป็น homozygous G/G ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 1534 (F/F) ลักษณะการแสดงออกในดื้อของยุง *Ae. aegypti* จากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย อาจจะไม่ได้เกิดจากการกลายพันธุ์นี้เพียงอย่าง เดียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved