

XÁC ĐỊNH ĐỘ BIẾN KHÁNG NGÃ GỤC (KNOCK DOWN RESISTANCE - *kdr*) TRÊN GEN *VGSC* Ở MUỖI *Aedes albopictus* THU THẬP Ở HÀ NỘI VÀ HẢI PHÒNG

Nguyễn Thị Kim Liên^{1,✉}, Nguyễn Thu Hiền¹, Nguyễn Huy Hoàng¹, Nguyễn Thị Hồng Ngọc², Nguyễn Thị Hương Bình²

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: ntkimlienibt@gmail.com

Ngày nhận bài: 25.9.2017

Ngày nhận đăng: 15.11.2017

TÓM TẮT

Việt Nam là một trong những nước chịu ảnh hưởng của dịch sốt xuất huyết ở khu vực Đông Nam Á. Dịch sốt xuất huyết đang diễn biến rất phức tạp và cần có sự kiểm soát tốt đối với vector truyền bệnh. Muỗi *Aedes albopictus* được xác định là một trong hai vector chính truyền bệnh sốt xuất huyết. Nghiên cứu gần đây cho thấy muỗi *A. albopictus* có mặt tại một số nơi trên địa bàn Hà Nội và Hải Phòng. Để kiểm soát tốt vector truyền bệnh cũng như kiểm soát được dịch bệnh rất cần sự hiểu biết về mức độ kháng và cơ chế kháng với hóa chất diệt của vector truyền bệnh. Hai cơ chế kháng quan trọng ở côn trùng nói chung và ở muỗi nói riêng là cơ chế kháng do đột biến trên protein mục tiêu của hóa chất diệt côn trùng và cơ chế kháng do tăng cường hoạt động của các enzyme phân giải hóa chất diệt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu thập mẫu muỗi *A. albopictus* ở Hà Nội và Hải Phòng để xác định mức độ kháng và xác định các đột biến kháng ngã gục trên gen mã hóa cho kênh vận chuyển natri nằm trên màng tế bào thần kinh (voltage gated sodium channel - *VGSC*) của muỗi ở hai địa điểm trên. Kết quả thử nghiệm tính kháng cho thấy, muỗi *A. albopictus* ở Hà Nội và Hải Phòng còn nhạy với hóa chất thuộc nhóm organophosphate nhưng đã kháng với dichloro diphenyl trichloroethane (DDT), carbamate và hóa chất thuộc nhóm pyrethroid. Chúng tôi không xác định được các đột biến Ser989Pro, Ile1011Met, Val1016Gly và Phe1534Cys trên muỗi *A. albopictus* ở Hà Nội và Hải Phòng. Tuy nhiên, chúng tôi đã xác định được một đột biến Tyr986His trên kênh vận chuyển natri *VGSC* trên mẫu muỗi ở cả hai địa điểm.

Từ khóa: *Aedes albopictus*, đột biến kháng ngã gục, gen *VGSC*, muỗi truyền bệnh sốt xuất huyết, pyrethroid

MỞ ĐẦU

Muỗi *Aedes albopictus* là loài muỗi có nguồn gốc ở châu Á, tuy nhiên, hiện nay đã phân bố rộng khắp trên thế giới và được biết đến là một trong hai vector chính truyền virus sốt xuất huyết. Bệnh sốt xuất huyết hàng năm gây ảnh hưởng lên khoảng 3,97 tỷ người, 390 triệu ca mắc bệnh trên thế giới (Bhatt *et al.*, 2013). Ở Việt Nam, bệnh sốt xuất huyết đang diễn biến ngày càng phức tạp với số ca mắc bệnh ngày càng gia tăng. Năm 2016, số ca mắc bệnh sốt xuất huyết của Việt Nam đã lên đến 50000 ca. Cho đến nay, chưa có vaccine phòng bệnh sốt xuất huyết, vì vậy biện pháp phòng trừ bệnh là kiểm soát vector truyền bệnh. Tuy nhiên, việc sử dụng các loại thuốc diệt côn trùng trong quá trình kiểm soát vector truyền bệnh đang gây ra hiện

tượng kháng thuốc diệt ở muỗi. Trong các loại thuốc diệt côn trùng, pyrethroid là hóa chất được sử dụng phổ biến hiện nay trên thế giới và Việt Nam. Hóa chất thuộc nhóm pyrethroid gồm các loại hóa chất như cypermethrin, permethrin, deltamethrin..., các chất này tác động lên kênh vận chuyển natri (voltage gated sodium channel – *VGSC*) nằm trên màng tế bào thần kinh của côn trùng nói chung và ở muỗi nói riêng gây ra hiện tượng ngã gục ở côn trùng (Brito *et al.*, 2013). Kênh vận chuyển natri được cấu tạo bởi một protein bao gồm bốn domain tương đồng (I – IV), mỗi domain gồm sáu phân đoạn kỵ nước (S1 – S6) (Catterall *et al.*, 2003). Đột biến trên gen *VGSC* mã hóa cho kênh vận chuyển natri dẫn đến hiện tượng kháng ngã gục (knockdown resistance - *kdr* mutations) ở muỗi truyền bệnh sốt xuất huyết đã được nghiên cứu ở

hiều nơi trên thế giới (Bregues *et al.*, 2003; Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2009; Marcombe *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009a, b; Harris *et al.*, 2010; Kawada *et al.*, 2009, 2014; Yanola *et al.*, 2010).

Nghiên cứu cho thấy đột biến kháng ngả gục chủ yếu xảy ra trên phân đoạn IIS6 và IIS6 của kênh vận chuyển natri có liên quan đến tính kháng với pyrethroid và DDT (Bregues *et al.*, 2003; Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009a, b; Harris *et al.*, 2010). Tuy nhiên, các đột biến kháng ngả gục được tìm thấy chủ yếu trên các quần thể muỗi *A. aegypti* kháng perythroid bao gồm: đột biến Gly923Val, Leu982Trp, Ile1011Met, Val1016Gly trên domain II (Bregues *et al.*, 2003). Đột biến Phe1534Cys trên IIS6 cũng được phát hiện ở muỗi *A. aegypti* kháng DDT/permethrin ở Thái Lan và Việt Nam (Kawada *et al.*, 2009; Yanola *et al.*, 2010, 2011). Các đột biến Ser989Pro và Asp1763Tyr được tìm thấy đồng thời với Val1016Gly ở quần thể muỗi Đài Loan (Chang *et al.*, 2009) và Thái Lan (Stenhouse *et al.*, 2013). Một đột biến mới được phát hiện Thr1520Ile đi cùng với Phe1534Cys ở quần thể muỗi của Ấn Độ (Kushwah *et al.*, 2015a).

Đối với muỗi *A. albopictus*, đột biến trên gen *VGSC* được tìm thấy trên một số ít quần thể muỗi ở các nước khác nhau. Đột biến Phe1534Cys được tìm thấy trên muỗi *A. albopictus* ở Singapore (Kasai *et al.*, 2011), trong khi đột biến Phe1534Leu chỉ được tìm thấy ở các quần thể *A. albopictus* ở Mỹ (Marcombe *et al.*, 2014) và đột biến Phe1534Ser/Leu được tìm thấy trên các quần thể *A. albopictus* ở đảo Hải Nam, Trung Quốc (Chen *et al.*, 2016). Nghiên cứu của Xu *et al.* (2016) trên quần thể muỗi *A. albopictus* ở Nhật Bản, Trung Quốc, Singapore, Hy Lạp, Ý và Mỹ đã xác định được hai đột biến mới Ile1532Thr ở Ý và Phe1534Ser ở Trung Quốc và Mỹ.

Nghiên cứu đột biến trên gen *VGSC* trên vector truyền bệnh sốt xuất huyết, cho thấy các đột biến làm thay đổi tương tác của pyrethroid và kênh vận chuyển natri, những hiểu biết này là rất quan trọng giúp chúng ta hiểu biết hơn về cơ chế hoạt động của pyrethroid và góp phần xây dựng chiến lược kiểm soát hiệu quả đối với vector truyền bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định đột biến kháng ngả gục trên gen *VGSC* ở quần thể muỗi *A. albopictus* ở Hà Nội và Hải Phòng nhằm tìm hiểu cơ chế kháng với pyrethroid của muỗi *A. albopictus* ở hai địa điểm trên.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thu thập mẫu và định loại loài

Mẫu muỗi được thu thập ở Hà Nội, Hải Phòng. Các mẫu muỗi được thu thập và định loại loài bằng hình thái sơ bộ theo khóa định loại thường quy của Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương và định loại phân tử bằng phương pháp PCR đa môi sử dụng các cặp mồi đặc hiệu cho hai loài *A. aegypti* và *A. albopictus* trên vùng gen ITS theo Higa và đồng tác giả (2010) với kích thước sản phẩm: 550bp đặc trưng cho *A. aegypti* và 950 đặc trưng cho *A. albopictus*.

Thử nghiệm tính kháng với hóa chất diệt côn trùng

Thử nghiệm tính kháng với hóa chất diệt côn trùng được tiến hành theo quy trình của Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2016) sử dụng muỗi trưởng thành ở thế hệ F2 với bốn lần lặp lại, 25 cá thể muỗi trưởng thành cho mỗi lần lặp lại. Các hóa chất thử nghiệm gồm: permethrin (thuộc nhóm pyrethroid) nồng độ 0,75%; deltamethrin (pyrethroid) nồng độ 0,05%; lambda-cyhalothrin (pyrethroid) nồng độ 0,05%; DDT (organochlorine) nồng độ 4%; propoxur (carbamate) nồng độ 1% và malathion (organophosphate) nồng độ 5%. Muỗi sống sót sau thử nghiệm được sử dụng cho việc xác định đột biến kháng ngả gục. Chúng nhạy cảm Bora được sử dụng làm mẫu đối chứng.

Xác định đột biến trên gen *VGSC*

Để xác định đột biến trên gen *VGSC* ở các quần thể muỗi thu được ở Hà Nội và Hải Phòng, mẫu muỗi trưởng thành được tiến hành tách chiết DNA tổng số: Mẫu muỗi được cho vào ống eppendorf 1,5 mL, bổ sung 50 μ L đệm chiết (5 M NaCl, 1 mM Tris-HCl pH 8,6, 0,5 mM EDTA pH 8,0) nghiền nhỏ, ủ ở 65°C trong 30 min, ly tâm 8000 rpm trong 2 min. Loại bỏ dịch nổi, bổ sung 7 μ L Kac 8M và giữ ở -20°C trong 30 min. Ly tâm 12000 rpm trong 20 min. Chuyển phần dịch nổi sang ống eppendorf mới, thêm 100 μ L cồn tuyệt đối lạnh và ly tâm 12000 rpm trong 20 min. Loại bỏ dịch nổi và hòa tan cặn trong 50 μ L TE. Phản ứng PCR nhân đoạn gen *VGSC* được tiến hành theo Kawada và đồng tác giả (2014) nhằm xác định các đột biến Ser989Pro, Ile1011Met, Val1016Gly và Phe1534Cys. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp trên máy giải trình tự tự động ABI PRISM 3500 (Mỹ) theo phương pháp của Sanger và đồng tác giả (1977). Để xác định

các đột biến trên gen *VGSC*, kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự gen *VGSC* mã số XM019696519 trên Ngân hàng gen quốc tế GenBank bằng phần mềm BioEdit 7.0.9.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Định loại loài và thử nghiệm tính kháng với hóa chất diệt côn trùng

Mẫu muỗi thu thập từ hai địa điểm Hà Nội và Hải Phòng được nuôi tại phòng thí nghiệm của Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương phục vụ cho các thử nghiệm tính kháng với hóa chất diệt côn trùng và định loại loài bằng hình thái và phân tử. Kết quả đánh giá về hình thái cho thấy các cá thể muỗi trưởng thành với phần đuôi có một sọc trắng hẹp dưới da bụng, các mảng vảy trắng không tách biệt tạo thành miếng vá trắng hình chữ V₂ phần trước của bụng chân không có sọc dọc màu trắng và không có vảy trắng ở đầu thuộc về loài *A. albopictus*. Kết quả đánh giá phân tử bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho loài (Hình 1A) cũng cho thấy mẫu muỗi thu được từ hai địa điểm trên thuộc loài *A. albopictus*.

Theo tiêu chuẩn đánh giá của WHO (2016): nếu tỷ lệ muỗi chết sau khi thử nghiệm từ 98 - 100% thì được coi là vẫn nhạy cảm với hóa chất thử nghiệm; nếu tỷ lệ muỗi chết ≤ 98% thì được coi là muỗi đã kháng với hóa chất thử nghiệm. Trong nghiên cứu

của chúng tôi, kết quả thử nghiệm tính kháng với hóa chất diệt côn trùng (Bảng 1) cho thấy muỗi *A. albopictus* thu ở Hà Nội còn nhạy với hóa chất thuộc nhóm organophosphate nhưng muỗi đã kháng với DDT và các hóa chất thuộc nhóm pyrethroid, carbamate. Mẫu muỗi thu được ở Hải Phòng còn nhạy với hóa chất thuộc nhóm organophosphate, carbamate và deltamethrin thuộc nhóm pyrethroid nhưng đã kháng với DDT và các hóa chất thuộc nhóm pyrethroid là lambda-cyhalothrin và permethrin. Kết quả thử nghiệm tính kháng ở 5 quần thể muỗi *A. albopictus* của Thái Lan cũng cho thấy 4 quần thể muỗi kháng với permethrin (tỷ lệ muỗi chết 97 - 80%), tuy nhiên cả 5 quần thể muỗi vẫn còn nhạy với lambda-cyhalothrin và deltamethrin (Chuaycharoensuk *et al.*, 2011). Kết quả thử nghiệm tính kháng ở 6 quần thể muỗi *A. albopictus* của Trung Phi cũng cho thấy 2 quần thể muỗi kháng với DDT (tỷ lệ muỗi chết 36 - 71%), 1 quần thể kháng với deltamethrin (tỷ lệ muỗi chết 83%), tuy nhiên các quần thể muỗi còn lại vẫn còn nhạy với DDT, propoxur, deltamethrin (Kamgang *et al.*, 2011). Nghiên cứu của Sivan và đồng tác giả (2015) trên quần thể muỗi *A. albopictus* ở Ấn Độ cho thấy muỗi ở đây kháng với cả ba loại hóa chất thuộc nhóm pyrethroid. Như vậy, các quần thể muỗi ở Hà Nội và Hải Phòng đã xuất hiện tính kháng với hóa chất diệt côn trùng. Các cá thể muỗi sống sót sau thử nghiệm tính kháng với hóa chất diệt côn trùng được sử dụng cho việc xác định đột biến trên gen *VGSC*.

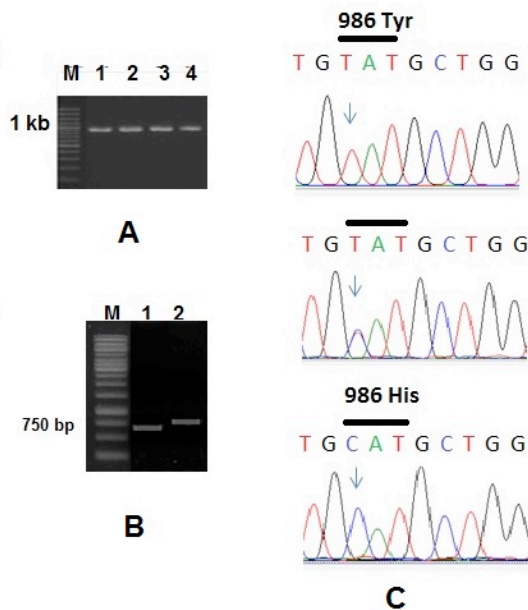
Bảng 1. Kết quả thử nghiệm tính kháng với các hóa chất diệt của mẫu muỗi *A. albopictus*.

Hóa chất thử nghiệm	Nồng độ thử nghiệm (%)	Mẫu muỗi thu ở Hà Nội		Mẫu muỗi thu ở Hải Phòng	
		Tỷ lệ muỗi chết (%)	Tính kháng	Tỷ lệ muỗi chết (%)	Tính kháng
DDT (Organochlorine)	4	33	Kháng	42	Kháng
Propoxur (Carbamate)	1	91	Kháng	99	Nhạy
Malathion (Organophosphate)	5	100	Nhạy	100	Nhạy
Deltamethrin (Pyrethroid)	0,05	92	Kháng	100	Nhạy
Lambda-Cyhalothrin (Pyrethroid)	0,05	89	Kháng	98	Kháng
Permethrin (Pyrethroid)	0,75	84	Kháng	97	Kháng

Đột biến trên gen *VGSC*

Mẫu muỗi được tách chiết DNA tổng số và PCR để nhân hai đoạn gen từ exon 19 đến exon 31 có kích

thước khoảng 700 - 750 bp cho mỗi đoạn. Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 1B) cho thấy hai đoạn gen đã được nhân lên với kích thước đúng như dự kiến và có chất lượng đủ để tiến hành giải trình tự.



Hình 1. Kết quả định loại loài và đột biến trên gen *VGSC* ở các cá thể muỗi thu thập tại Hà Nội và Hải Phòng. A. Sản phẩm PCR xác định loài *A. albopictus*. M: Marker 100 bp, 1 – 4: sản phẩm PCR nhân đoạn gen đặc hiệu cho loài *A. albopictus*. B. Sản phẩm PCR nhân đoạn gen *VGSC*. M: Marker 1 kb, 1 - 2: sản phẩm PCR nhân các đoạn gen từ exon 19 đến exon 31 trên gen *VGSC* của mẫu muỗi thu được ở Hà Nội. C. Kết quả xác định đột biến trên gen *VGSC* ở các cá thể muỗi thu thập tại Hà Nội và Hải Phòng

Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự trên máy giải trình tự tự động. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự gen *VGSC* của loài *A. albopictus* đã được công bố trên GenBank với mã số XM019696519. Các đột biến Ser989Pro, Ile1011Met, Val1016Gly và Phe1534Cys đã không được tìm thấy trên các cá thể muỗi thu được ở Hà Nội và Hải Phòng. Kết quả tương tự cũng được báo cáo trên quần thể muỗi *A. albopictus* ở Malaysia (Ishak *et al.*, 2015), Costa Rica (Chaves *et al.*, 2015), Ấn Độ (Kushwah *et al.*, 2015b) và Trung Phi (Ngoagouni *et al.*, 2016). Việc không xác định được các đột biến trên gen *VGSC* ở muỗi *A. albopictus* có thể là do ở muỗi *A. albopictus* đã tồn tại một cơ chế kháng hóa chất diệt côn trùng khác so với muỗi *A. aegypti* như việc tăng cao các enzyme liên quan đến giải độc (Ngoagouni *et al.*, 2016).

Điều đáng chú ý là với 14 cá thể muỗi thu ở Hà Nội và 10 cá thể muỗi thu ở Hải Phòng, chúng tôi đã xác định được 7 cá thể muỗi ở Hà Nội mang đột biến

đồng hợp tử (nucleotide T>C) ở vị trí 2956 trên cDNA và 7 cá thể muỗi ở Hải Phòng mang đột biến đồng hợp tử tại vị trí này (Hình 1C). Bên cạnh đó 2 cá thể muỗi ở mỗi địa điểm mang kiểu gen dị hợp tử. Sự thay đổi này dẫn đến sự thay thế amino acid Tyrosine thành Histidine ở vị trí 986 (Tyr986His) trên kênh vận chuyển natri *VGSC*.

Như vậy, trên hai quần thể muỗi thu thập ở Hà Nội và Hải Phòng, chúng tôi đã xác định được một đột biến Tyr986His trên gen *VGSC*. Đây là những thông tin hữu ích trong việc kiểm soát hiệu quả vector truyền bệnh sốt xuất huyết.

KẾT LUẬN

Đánh giá tính kháng với các hóa chất diệt côn trùng của các cá thể muỗi *A. albopictus* thu thập từ hai địa điểm Hà Nội và Hải Phòng cho thấy các cá thể muỗi ở Hải Phòng còn nhạy cảm với hóa chất thuộc nhóm organophosphate, carbamate và deltamethrin thuộc nhóm pyrethroid nhưng đã kháng với DDT và các hóa chất thuộc nhóm pyrethroid là lambda-cyhalothrin và permethrin. Tuy nhiên, các cá thể muỗi thu ở Hà Nội chỉ nhạy với hóa chất thuộc nhóm organophosphate nhưng đã kháng với DDT và các hóa chất thuộc nhóm pyrethroid, carbamate. Chúng tôi cũng xác định được một đột biến Tyr986His trên gen *VGSC* ở cả hai quần thể muỗi thu thập từ Hà Nội và Hải Phòng.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự tài trợ của Quỹ Nafosted cho đề tài: Nghiên cứu sự biểu hiện và đột biến gen liên quan đến tính kháng hóa chất diệt côn trùng (pyrethroid) của muỗi *Aedes aegypti* và *Aedes albopictus* truyền bệnh sốt xuất huyết. Mã số: 106-NN.02-2015.17

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GRW, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496(7446): 504-507.
- Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J (2003) Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* 17: 87-94.
- Brito LP, Linss JGB, Lima-Camara TN, Belinato TA, Peixoto AA, Lima JBP, Valle D, Martins AJ (2013)

- Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLoS ONE* 8(4): e60878. doi:10.1371/journal.pone.0060878
- Catterall WA, Chandy KG, Clapham DE, Gutman GA, Hofmann F, Harmar AJ, Abernethy DR, Spedding M (2003) International union of pharmacology: Approaches to the nomenclature of voltage-gated ion channels. *Pharmacological Reviews* 55: 573-574.
- Chang C, Shen WK, Wang TT, Lin YH, Hsu EL, Dai SM (2009) A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 39: 272-278.
- Chaves LF, Kawashima E, Futami K, Minakawa N, Rodriguez MR (2015) Lack of *kdr* mutations in a population of Asian tiger mosquitoes from Costa Rica. *Bulletin of Insectology* 68(1): 61-63.
- Chen H, Li K, Wang X, Yang X, Lin Y, Cai F, Zhong W, Lin C, Lin Z, Ma Y (2016) First identification of *kdr* allele F1534S in *VGSC* gene and its association with resistance to pyrethroid insecticides in *Aedes albopictus* populations from Haikou city, Hainan island, China. *Infect Dis Poverty* 5: 31. doi: 10.1186/s40249-016-0125-x.
- Chuaycharoensuk T, Juntarajumnong W, Boonyuan W, Bangs MJ, Akwatanakul P, Thammaphalo S, Jirakanianakit N, Tanasinchavakul S, Chareonviriyaphap T (2011) Frequency of pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J Vector Ecol* 36: 204-212.
- Garcia GP, Flores AE, Fernandez-Salas I, Saavedra-Rodriguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, Bond JG, Casas-Martinez M, Ramsey JM, Garcia-Rejon J, Dominguez-Galera M, Ranson H, Hemingway J, Eisen L, Black WC (2009) Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *Plos Negl Trop Dis* 3: e531. doi.org/10.1371/journal.pntd.0000531.
- Harris AF, Rajatileka S, Ranson H (2010) Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg* 83: 277-284.
- Higa Y, Toma T, Tsuda Y, Miyagi I (2010) A multiplex PCR-base molecular identification of five morphologically related, medically important subgenus *Stegomyia* mosquitoes from genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) found in the Ryukyu Archipelago, Japan. *Jpn J Infect Dis* 63: 312-316.
- Ishak IH, Jaal Z, Ranson H, Wondji CS (2015) Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (*kdr*) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasit Vectors* 8: 181. doi.org/10.1186/s13071-015-0797-2.
- Kamgang B, Marcombe S, Chandre F, Nchoutpouen E, Nwane P, Etang J, Corbel V, Paupy C (2011) Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasit Vectors* 4: 79. doi: 10.1186/1756-3305-4-79.
- Kasai S, Ng LC, Lam-Phua SG, Tang CS, Itokawa K, Komagata O, Kobayashi M, Tomita T (2011) First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus*. *Jpn J Infect Dis* 64: 217-221.
- Kawada H, Higa Y, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Yen NT, Loan LL, Sanchez RAP, Takagi M (2009) Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e527. doi: 10.1371/journal.pntd.0000527.
- Kawada H, Oo SZM, Thaug S, Kawashima E, Maung YNM, Thu HM, Thant KZ, Minakawa N (2014) Co-occurrence of point mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Myanmar. *PLoS Negl Trop Dis* 8(7): e3032. doi: 10.1371/journal.pntd.0003032.
- Kushwah RB, Dykes CL, Kapoor N, Adak T, Singh OP (2015a) Pyrethroid-resistance and presence of two knockdown resistance (*kdr*) mutations, F1534C and a novel mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e3332. doi.org/10.1371/journal.pntd.0003332.
- Kushwah RBS, Mallick PK, Ravikumar H, Dev V, Kapoor N, Adak T, Singh OP (2015b) Status of DDT and pyrethroid resistance in Indian *Aedes albopictus* and absence of knockdown resistance (*kdr*) mutation. *J Vector Borne Dis* 52: 95-98.
- Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, Brengues C, Yebakima A, Ranson H, Corbel V, David JP (2009) Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics* 10: 494. doi: 10.1186/1471-2164-10-494.
- Marcombe S, Farajollahi A, Healy SP, Clark GG, Fonseca DM (2014) Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved. *PLoS ONE* 9, e101992. doi:10.1371/journal.pone.0101992.
- Martins AJ, Lins RM, Linss JG, Peixoto AA, Valle D (2009a) Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 81: 108-115.
- Martins AJ, Lima JB, Peixoto AA, Valle D (2009b) Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Trop Med Int Health* 14: 1351-1355.
- Ngoagouni C, Kamgang B, Brengues C, Yahouedo G, Paupy C, Nakouné E, Kazanji M, Chandre F (2016)

- Susceptibility profile and metabolic mechanisms involved in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* resistant to DDT and deltamethrin in the Central African Republic. *Parasit Vectors* 9: 599. doi: 10.1186/s13071-016-1887-5.
- Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Safas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black WC (2007) A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 16: 785-798.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12): 5463-5467.
- Sivan A, Shriram AN, Sunish IP, Vulhya PT (2015) Studies on insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* (Linn) and *Aedes albopictus* (Skuse) vectors of dengue and chikungunya in Andaman and Nicobar Islands, India. *Parasitol Res* 114: 4693-4702.
- Stenhouse SA, Plernsub S, Yanola J, Lumjuan N, Dantrakool A, Choochote W, Somboon P (2013) 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* 6(1): 253. doi: 10.1186/1756-3305-6-253.
- WHO (2016) Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes.
- Xu J, Bonizzoni M, Zhong D, Zhou G, Cai S, Li Y, Wang X, Lo E, Lee R, Sheen R, Duan J, Yan G, Chen XG (2016) Multi-country survey revealed prevalent and novel F1534S mutation in voltage-gated sodium channel (*VGSC*) gene in *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis* 10(5): e0004696. doi:10.1371/journal.pntd.0004696.
- Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Prapanthadara L (2010) A novel F1552 / C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Pestic Biochem Physiol* 96: 127-131.
- Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang P, Prapanthadara L (2011) 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. *Tropical Med Int Health* 16: 501-509.

IDENTIFICATION OF THE *kdr* MUTATIONS IN *VGSC* GENE OF THE DENGUE MOSQUITOES *AEDES ALBOPICTUS* COLLECTED FROM HANOI AND HAIPHONG

Nguyen Thi Kim Lien¹, Nguyen Thu Hien¹, Nguyen Huy Hoang¹, Nguyen Thi Hong Ngoc², Nguyen Thi Huong Binh²

¹*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*National Institute of Malariology Parasitology and Entomology*

SUMMARY

Vietnam is one of the countries that is affected by dengue fever in Southeast Asia. The dengue epidemic is becoming increasingly more complex so it is necessary to have a well control to vectors in order to limit the spread of the disease. The *Aedes albopictus* mosquito is determined as one of the two major vectors that transmitted the dengue. Recent research shows that *A. albopictus* is present in some parts of Hanoi and Haiphong. In order to control the vector as well as the disease, it is necessary to understand the level of resistance and the resistance mechanism of the vector. Two important resistance mechanisms of insect were known as the mutations in the target protein of the insecticides and enhancing the activity of enzymes that participate in the resolution of the insecticides. In this study, the mosquito samples were collected from Hanoi and Haiphong to identify the level of resistance and detect the knock down resistance mutations in voltage gated sodium channel (*VGSC*) in membrane of nerve cell of mosquito. The results of insecticide susceptibility test showed that *A. albopictus* in Hanoi and Haiphong were still sensitive to organophosphate but resistant to DDT, carbamate and pyrethroid. Ser989Pro, Ile1011Met, Val1016Gly and Phe1534Cys mutations were not detected in *A. albopictus* in Hanoi and Haiphong. However, we detected a novel mutation Tyr986His in *VGSC* protein.

Keywords: *Aedes albopictus*, *kdr* mutation, *VGSC* gene, dengue vector, pyrethroid