

**DETEKSI RESISTENSI INSEKTISIDA SINTETIK PIRETROID PADA
Aedes aegypti (L.) STRAIN PALEMBANG MENGGUNAKAN TEKNIK
POLYMERASE CHAIN REACTION**

***Detection of Insecticide Synthetic Pyrethroid Resistance on Dengue Vector
Aedes aegypti (L.) in Palembang using Polymerase Chain Reaction***

Ahmad Ghiffari^{1*} Humairo Fatimi², Chairil Anwar¹

¹Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Jl. Moh Ali Km 3,5, 30126 Palembang, Indonesia

²Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang, Jl. Inspektur Yazid no.2 Km 2,5, 30126 Palembang, Indonesia

Abstract. *Aedes aegypti* is a vector of several pathogens including dengue fever/dengue hemorrhagic fever virus. Five hundred thousand dengue haemorrhagic fever new cases occur every year throughout the world. Vector control is an effective way to break the transmission; unfortunately constant insecticide ultimately caused resistance. Insecticides resistance in *Ae.aegypti* was first discovered on trichloroetane diphenyl dichloro (DDT), followed by temephos and synthetic pyrethroid. Three detection ways according to WHO procedure are bioassay, biochemistry and molecular. The biochemical detection that conducted previously in Palembang were turned out negative, nevertheless incidence rate has not yet decreased. Molecular detection is needed to determine the mechanisms of insecticide resistance. Molecular detection can detect gene mutations in the metabolic enzyme and target site insecticides, such as the voltage gated sodium channel (VGSC). The purpose of research was to identify the Val1016Ile and Val1016Gly point mutation in the VGSC gene of *Ae.aegypti* in Palembang. Population were all 3rd and 4th instar larvae of *Ae.aegypti* derived from breeding eggs obtained from villages of Bukit Kecil, Ilir timur I and Sukarami sub distric. Identification took place in BBLK Palembang while molecular test took place both in BBLK Palembang and Clinical Microbiology Department of Muhammad Hoesin Hospital Palembang. Results showed that there has been Val1016Ile point mutation and there is no Val1016Gly point mutation of voltage gated sodium channel gene. It can be concluded that there has been Val1016Ile point mutation in the voltage gated sodium channel gene of *Ae.aegypti* as the marker of synthetic pyrethroid insecticides resistance in Palembang

Keywords: *Aedes aegypti*, synthetic pyrethroid resistance, point mutation VGSC, target site, Val1016Ile

Abstrak. *Aedes aegypti* merupakan vektor dari berbagai patogen, termasuk diantaranya virus dengue fever. Sebanyak 500 ribu kasus baru demam berdarah dengue (DBD) terjadi tiap tahunnya di seluruh dunia. Pengendalian nyamuk vektor merupakan cara efektif memutus rantai penularan DBD. Namun penggunaan satu jenis insektisida secara intensif dalam waktu lama terbukti menyebabkan resistensi. Resistensi *Ae.aegypti* terhadap insektisida awalnya terjadi pada *dichloro diphenyl trichloroetane* (DDT), lalu terhadap temefos kemudian sintetik piretroid. Tiga cara mendeteksi resistensi sintetik piretroid menurut WHO yaitu bioassay, biokimia dan molekuler. Deteksi biokimia yang pernah dilakukan di Palembang menunjukkan hasil negatif, tetapi kenyataan *incidence rate* DBD belum turun. Penelitian lebih lanjut menggunakan deteksi molekuler diperlukan untuk mengetahui mekanisme resistensi insektisida. Deteksi molekuler dapat mendeteksi mutasi pada gen enzim metabolisme dan gen target site insektisida, semisal pada *voltage gated sodium channel* (VGSC). Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi mutasi titik gen VGSC Val1016Ile dan Val1016Gly *Aedes aegypti*. Desain penelitian ini adalah berupa deskriptif laboratoris dengan uji molekuler. Populasi adalah seluruh larva instar III-IV *Ae. aegypti* yang berasal dari pembiakan telur yang diperoleh dari kelurahan-kelurahan di Kecamatan Bukit Kecil, Sukarami dan Ilir Timur I kota

* Alamat Korespondensi: e-mail: chairil53@yahoo.co.id Telp/Faks: (0711) 373438

Palembang. Identifikasi larva dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Palembang dan uji molekuler dilakukan di Departemen Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Muhammad Hoesin Palembang dan BBLK Palembang. Hasil penelitian menunjukkan terjadi mutasi titik *Val1016Ile* serta tidak terjadi mutasi titik *Val1016Gly* gen *VGSC*. Disimpulkan terjadi mutasi titik *Val1016Ile* gen *VGSC* *Ae.aegypti* sebagai penanda resistensi yang bersifat *target site* atas sintetik piretroid di Palembang.

Kata Kunci: *Aedes aegypti*, resistensi insektisida, mutasi titik, target site, Val1016Ile

Naskah masuk: 04 Oktober 2013 | Review 1: 17 Oktober 2013 | Review 2: 14 Desember 2013 | Layak Terbit: 20 Desember 2013

PENDAHULUAN

Aedes aegypti merupakan vektor dari berbagai patogen, termasuk diantaranya virus dengue. Penyakit hiperendemis di Asia Tenggara ini berakibat fatal dengan bentuk yang paling berbahaya berupa *dengue shock syndrome* (DSS) pada anak-anak. Diperkirakan lebih kurang 2,5 milyar orang beresiko terinfeksi dengan kasus demam berdarah per tahunnya.¹ Pada tahun 2011, total kasus DBD di seluruh provinsi di Indonesia mencapai 26.015, dengan jumlah kematian sebanyak 389 orang (CFR=1,53%), dan di kota Palembang incidence rate tercatat sebesar 49,68%. Dengan 3 tempat kasus terbanyak terjadi di kecamatan Ilir Timur I (IR=90,77%), kecamatan Bukit Kecil (IR=79,89%) dan kecamatan Sukarami (68,31).²

Sampai saat ini obat untuk pengobatan DBD maupun vaksin untuk mencegahnya belum ditemukan dan pengendalian vektor merupakan cara untuk memutus rantai penularannya. Upaya penanggulangan DBD telah dilakukan dengan penggunaan insektisida melalui teknik *fogging*, abatisasi serta pemberantasan sarang nyamuk (PSN), tetapi incidence rate beberapa tahun terakhir ini tetap sulit diturunkan dan bahkan telah terjadi beberapa kejadian luar biasa.³ Peningkatan kasus DBD tersebut dapat terjadi akibat penggunaan satu jenis insektisida secara intensif dalam waktu lama atau terus menerus untuk mengontrol nyamuk vektor DBD yang pada akhirnya menyebabkan

resistensi vektor.⁴ Resistensi insektisida pada *Aedes aegypti* mudah terjadi dan meluas di seluruh dunia. Bermula terhadap dichloro diphenyl trichloroetane (DDT) di Karibia pada tahun 1955 dan Thailand.^{4,5} Resistensi juga terjadi pada sintetik piretroid di Brazil, Thailand, dan Indonesia.^{6,7,8}

Tiga cara mendeteksi resistensi sintetik piretroid menurut WHO yaitu bioassay, biokimia dan molekuler. Mekanisme deteksi biokimia ialah dengan mendeteksi peningkatan kadar enzim yang mendetoksifikasi insektisida (resistensi metabolik). Enzim-enzim yang sering digunakan sebagai penanda perubahan antara lain cytochrome P450 monooxygenases (P450s), glutathione S-transferases (GSTs) dan carboxy/cholinesterases (CCEs).^{9,10,11} Dalam perkembangan selanjutnya telah ditemukan bahwa kejadian resistensi tanpa adanya peningkatan enzim biokimiawi ternyata telah terjadi.¹² Hal tersebut telah mendorong para ahli untuk menemukan cara lain, yaitu menggunakan uji molekuler. Uji tersebut mendeteksi resistensi sintetik piretroid pada *Ae.aegypti* dengan cara menemukan mutasi titik gen *voltage-gated sodium channel* *VGSC* sebagai target site tempat kerja insektisida (resistensi target).¹³

Di Palembang didapatkan kontroversi hasil uji biokimia deteksi resistensi *Ae.aegypti* terhadap insektisida sintetik piretroid dengan tingkat kejadian DBD yang cukup tinggi.¹⁴ Hasil penelitian menyatakan belum terjadi peningkatan

kadar enzim pendetoksifikasi insektida yang menetralkan insektisida sintetik piretroid. Resistensi target dicurigai sebagai mekanisme resistensi insektisida yang terjadi, karenanya perlu dilakukan penelitian molekuler untuk mendeteksi mutasi gen (VGSC) tersebut dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) pada *Ae. aegypti* di Palembang sebagai pembuktian.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan sampel dilakukan di tiga kelurahan Palembang yang memiliki *incidence rate* 2012 DBD tinggi yaitu Sukarame, Bukit Kecil dan Ilir Timur I. Tempat identifikasi mikroskopis pada Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang (BBLK), sementara tempat Identifikasi Molekuler dilakukan di BBLK dan Departemen Mikrobiologi Klinik Rumah Sakit Muhammad Hoesin Palembang. Alat yang digunakan dalam memperoleh larva berupa Ovitrap (penangkap larva nyamuk); Rearing (alat pemeliharaan larva).

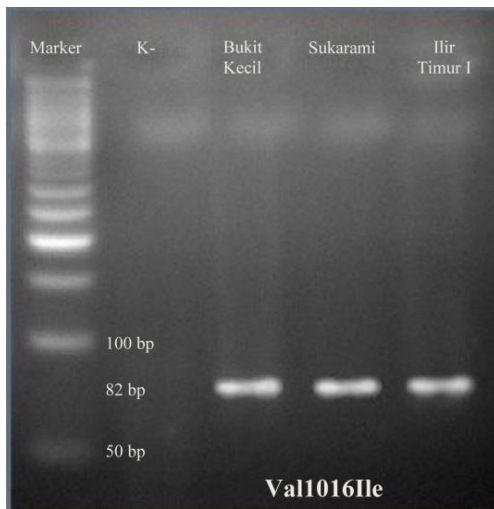
Metode biomolekuler yang digunakan adalah sebagai berikut: (1) Total DNA diisolasi menggunakan metode *Promega Wizard Extraction* berdasarkan protokol penyelia. Masukkan 600 μ l nuclei lysis solution dalam tabung 1,5 ml, dinginkan. Tambahkan 10-20 mg (\pm 20 ekor) larva. Homogenkan selama 10 detik. Tambahkan 17,5 μ l protein kinase K ke dalam campuran. Selanjutnya diinkubasi selama 15-30 menit dalam suhu 65°C. Tambahkan 3 μ l RNAase solution, homogenkan. Diinkubasi 30 menit 37°C. Diamkan pada suhu ruangan selama 5 menit. Tambahkan 200 μ l protein precipitation solution. Vorteks selama 20 detik. Dinginkan sampel pada es selama 5 menit. Sentrifugasi 13.000 rpm selama 4 menit. Sementara itu, siapkan 600 μ l isopropanol ke dalam tabung 1,5 ml baru. Pindahkan supernatan ke dalam tabung yang telah diisi isopropanol tersebut. Aduk perlahan sampai terbentuk benang putih.

Sentrifugasi 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. Buang supernatan, kemudian tambahkan etanol 70% pada suhu ruang. Sentrifugasi 13.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. Hisap etanol pakai mikropipet, sisa etanol menggunakan kertas saring. Keringkan pelet dalam suhu ruangan selama 10-15 menit. Larutkan pelet DNA dengan 100 μ l DNA dehydration solution. Inkubasi sampel pada suhu 65°C selama 1 jam (atau 40°C selama 24 jam). (2) Fragment gen diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer Ile1016r/ Val1016f/ Ile1016f/ Gly1016r/ Val1016f/ Gly1016f.

Kondisi PCR terdiri dari tahap denaturasi Awal selama 12 menit pada 95°C dan tahap 39 siklus Denaturasi selama 20 detik pada 95°C, *annealing* 60 detik pada 60°C, dan elongation 30 detik 72°C, tahap terakhir Tahap Ekstensi Tambahan 5 menit pada 72°C. (3) Produk PCR selanjutnya dielektroforesis pada agarose 2% gel Tris/Borate/Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer (TBE buffer, 89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA). Gels di-*running* selama 90 menit pada 80 volt, dan dievaluasi dibawah sinar UV (300 nm). Sampel yang mengandung produk PCR berada pada berat basa masing-masing 82 bp dan 60 bp. Master mix terdiri dari 5 μ l DNA template, 24 μ l ddH₂O, Go Taq 10 μ l dan masing-masing 1 μ l primer Ile1016r/ Val1016f/ Ile1016f/ Gly1016r/ Val1016f/ Gly1016f.

HASIL

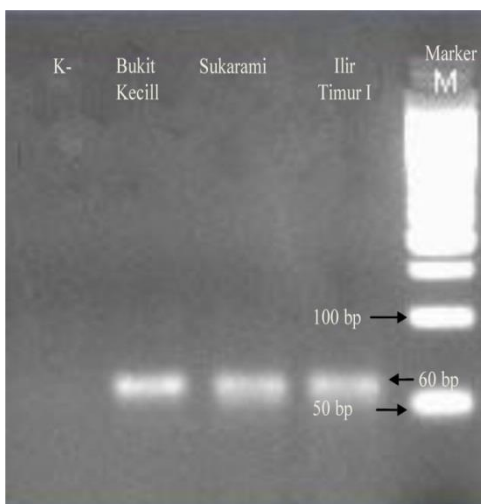
Deteksi mutasi diukur dengan menggunakan alat biomolekuler dengan hasil akhir pengoperasian alat berupa tampilan pita (berat basa) pada elektroforesis.



Gambar 1.

Keterangan:

- Tulisan Horizontal pada bagian atas yaitu: Bukit Kecil, Sukarami dan Ilir Timur I, menunjukkan nama tempat dimana sampel nyamuk diambil
- Tulisan 50 dan 100 bp menunjukkan berat pasangan basa; 82 bp adalah spesifik untuk berat pita pita mutan/nyamuk resisten
- Dari gambar di samping, terdapat satu pita (band) dengan berat basa 82



Gambar 2.

Keterangan:

- Tulisan Horizontal pada bagian atas yaitu: Bukit Kecil, Sukarami dan Ilir

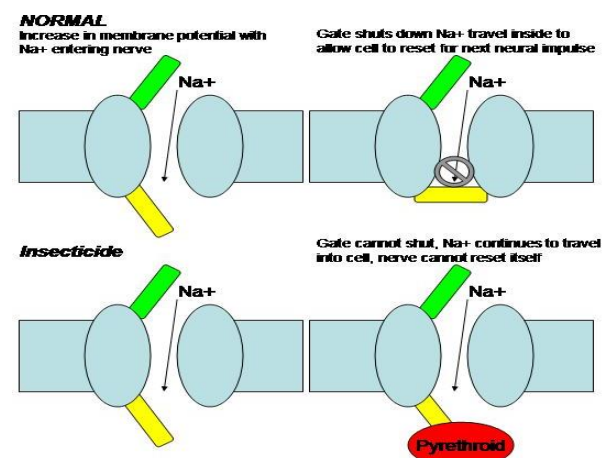
Timur I, menunjukkan nama tempat dimana sampel nyamuk diambil

- Tulisan 50 dan 100 bp menunjukkan berat pasangan basa; 60 bp adalah spesifik untuk berat pita wild/nyamuk suseptible;
- Dari gambar di samping, terdapat satu pita (band) dengan berat basa 60

PEMBAHASAN

Mekanisme insektisida sintetik piretroid bekerja pada sistem syaraf serangga yaitu menghambat akson pada kanal ion sehingga terjadi aksi potensial yang terus menerus.¹⁶ Sintetik piretroid mengikat protein *voltage-gated sodium channel* (VGSC) yang mengatur denyut impuls syaraf. Akibatnya impuls syaraf akan mengalami stimulasi secara terus menerus dan mengakibatkan serangga mengalami hipereksitasi (kegelisahan) dan konvulsi (kekejangan).

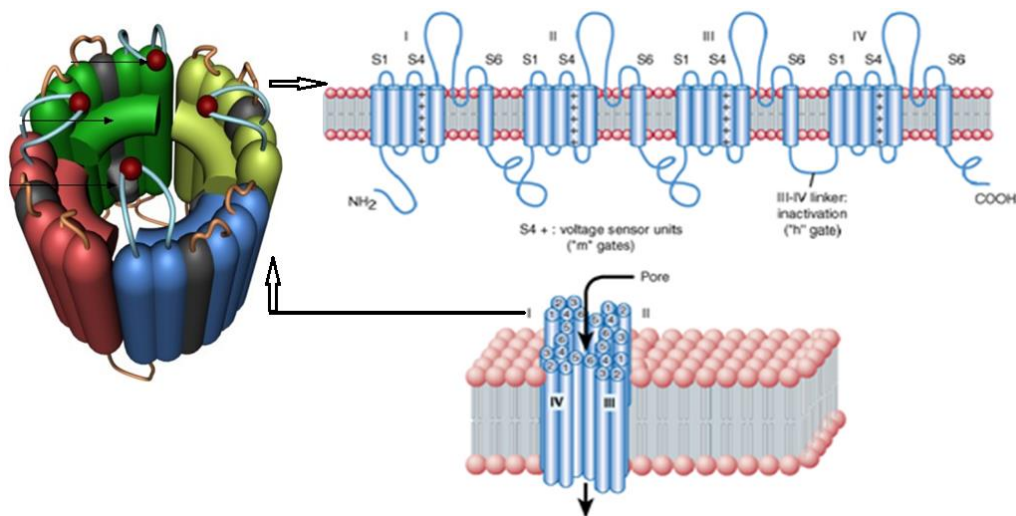
Deteksi resistensi insektisida sintetik piretroid secara uji molekuler diketahui melalui dua cara yaitu perubahan enzim detoksifikasi dan perubahan target site, *voltage-gated sodium channel* (VGSC). Deteksi enzim detoksifikasi yaitu deteksi mutasi titik gen yang menyebabkan peningkatan kadar enzim yang mendetoksifikasi insektisida (resistensi metabolik).



Gambar 3. Cara Kerja Sintetik Piretroid pada VGSC.¹⁷

Tiga enzim yang berhubungan dengan detoksifikasi insektisida antara lain cytochrome P450 monooxygenases (P450s)⁹, glutathione S-transferases (GSTs)¹⁰ dan carboxy/cholinesterases (CCEs)¹¹. Dan deteksi resistensi *target site*, gen VGSC. Mutasi VGSC pertama kali diidentifikasi pada L1014F domain II S6 gen VGSC *Musca domestica*, dimana kodon pengkode leusin disubsitusi oleh

fenilalanin.¹⁸ Deteksi mutasi yang sering diteliti pada *Aedes aegypti* adalah Val1016Ile, yaitu perubahan kodon pengkode valine menjadi isoleucine. Pada mutasi Val1016Ile terjadi transisi basa guanin dengan adenin pada susunan GTA menjadi ATA pada populasi *Ae. aegypti* di Brazil.¹¹



Gambar 4. Struktur Voltage-gated Sodium Channel¹⁷

Penelitian resistensi insektisida sintetik piretroid secara biomolekuler sebelumnya di Palembang²⁰ mendapatkan tidak adanya titik mutasi pada gen VGSC *Ae. aegypti*. Titik mutasi yang diperiksa saat itu adalah F1534C, yang tidak mengekspresikan gen mutasi sebagaimana yang terjadi pada *Ae. aegypti* Australia di Kepulauan Cayman.²¹ Sampai saat ini telah ditemukan 26 titik mutasi yang berhubungan dengan resistensi VGSC namun pada titik yang berbeda pada masing-masing serangga, dan pada *Ae. aegypti* diketahui mutasi gen terjadi pada tujuh titik, yaitu: (1) Ile1011Met; ATA pada kodon pengkode isoleusin berubah menjadi ATG (metionin)⁹; (2) Ile1011Val, ATA pada kodon pengkode isoleusin berubah menjadi GTA (valin).²² ; (3) F1552C, TTC pada kodon pengkode fenil

alanin berubah menjadi TGC (cysteine)²³; (4) F1534C, TTC pada kodon pengkode fenil alanin berubah menjadi TGC (cysteine)²¹; (5) Val1023Gly, kodon pengkode valine berubah menjadi glycine²⁴; (6) Val1016Gly, kodon pengkode valine berubah menjadi glycine.^{25,26}; (7) F1023C, TTC pada kodon pengkode fenilalanin berubah menjadi TGC (cysteine).²⁶

Lanjutan penelitian resistensi insektisida secara biomolekuler di Palembang dilanjutkan dengan pengujian titik lainnya, yaitu Val1016Ile dan Val1016Gly. Pada mutasi Val1016Gly terjadi transisi basa timin dengan guanin pada susunan GTA menjadi GGA, sebagaimana didapatkan pada populasi di Thailand²⁶ dan Vietnam.²⁴ Terjadinya titik mutasi pada gen Val1016Ile terlihat

dengan adanya gambaran satu pita (band) dengan panjang 82 bp (resisten homozigot) atau dua pita dengan panjang 82 bp dan 102 bp (resisten heterozigot). Sementara *wild type* (suseptibel) akan tampak satu pita dengan panjang 102 bp. Sedangkan bila terjadi titik mutasi pada gen Val1016Gly terlihat dengan adanya gambaran satu pita dengan panjang 80 bp (resisten homozigot), atau dua pita dengan panjang 80 bp dan 60 bp (resisten heterozigot). Sementara *wild type* akan tampak satu pita dengan panjang 60 bp. Penelitian kali ini mendapatkan hasil temuan titik mutasi untuk gen Val1016Ile VGSC *Ae. aegypti* dan tidak ada titik mutasi untuk gen Val1016Gly.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian uji diagnostik molekuler ditemukan mutasi gen VGSC pada titik Val1016Ile; sebagai pembuktian mekanisme resistensi yang bersifat *target site* insektisida sintetik piretroid pada vektor dengue, *Ae. aegypti* di Palembang. Penelitian molekuler memberikan alternatif uji diagnostik resistensi insektisida sintetik piretroid lanjutan, terutama pada daerah dengan kejadian DBD tinggi namun uji diagnostik biokimia yang negatif (masih suseptibel). Hasil penelitian dapat menjadi masukan bagi instansi kesehatan untuk pilihan kebijakan strategi pengendalian vektor.

DAFTAR PUSTAKA

- World Health Organization [Internet]. Geneve: World Health Organization; c2011. Available at: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>
- Dinkes Kota Palembang [Internet]. Laporan Tahunan Dinas Kesehatan Kota Palembang; 2012. [diakses tanggal 20 Oktober 2013] Available at: <http://dinkes.palembang.go.id/tampung/dokumen/dokumen-56-57.pdf>
- Kementerian Kesehatan RI, Dirjen PP & PL. Peraturan Menteri Kesehatan RI tentang Pengendalian Vektor. Nomor: 374/Menkes/PER/III/2010; 2010.
- Ponlawat A, JG Scott, LC Harrington. Insecticide Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Across Thailand. *J. Med. Entomol.* 2005; 42(5): 821-825.
- WHO. Vector Resistance to Pesticides. Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control; 1992.
- Da Cunha MP, JBP Lima, WG Brogdon, GE Moya, D Valle. Monitoring of Resistance to the Pyrethroid Cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Population Collected Between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100: 441-444.
- Paeporn P, P. Ya-umphan, and K. Supaphathom. Insecticide Susceptibility and Selection for Resistance in A Population of *Aedes aegypti* from Ratchaburi Province, Thailand. National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand; 2002.
- Ahmad I, S Astari, M Tan. Resistance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in 2006 to Pyrethroid Insecticides in Indonesia and its Association with Oxidase and Esterase Level. *Pakistan J Biol Sci.* 2007; 10 (20): 3688-3692.
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science.* 2002; 297:2253-2256
- Che Mendoza A, Penilla RP, Rodriguez DA. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. *African Journal of Biotechnology.* 2009; 8 (8): 1386-1397.
- Martins AJ, RMM de Andrade, JGB Linss, AA Peixoto, D Valle. Voltage-Gated Sodium Channel Polymorphism and Metabolic Resistance in Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 81(1): 108-115
- Bregues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel

- mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology*. 2003; 17: 87-94.
13. Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Soares AF, Salas IF, Ranson H, Hemingway J, Black WC. QTL mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*. 2008; 180:1137-1152.
 14. Salim M, Ambarita LP, Yenni A, 2009. Efektivitas Malation dalam pengendalian vektor Demam Berdarah Dengue dan uji kerentanan larva *Aedes aegypti* terhadap Temefos di kota Palembang. Laporan Diseminasi Penelitian, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI, Baturaja.
 15. Promega Wizard Purification [Internet]. [diakses pada tanggal 13 Desember 2013] Available at: <http://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Wizard%20Genomic%20DNA%20Purification%20Kit%20Protocol.pdf>
 16. Soderlund DM, DC Knipple. The Molecular Biology of Knockdown Resistance to Pyrethroid Insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2003; 33:563-577.
 17. Shuyi LQ. Tetrodotoxin : Concepts of Ion Channels and Action Potential. Department of Chemistry Imperial College London. c2004. Available at: <http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/quek/chnact.htm> [diakses pada 9 Mei 2012]
 18. Hollingworth RM, Dong K. Biochemical and Molecular Basis of Resistance. In: *Global Pesticide Resistance in Arthropods*; Whalon ME, Sanchez DM, Hollingworth RM (eds); 2008. pp. 48-51.
 19. Ghiffari A, H Fatimi. Deteksi Mutasi Titik Gen *Natrium Voltage Gated Channel* Menggunakan *Polymerase Chain Reaction* pada *Aedes aegypti* Resisten Sintetik Piretroid di Palembang. *Buletin Spirakel* ed.2. 2011. pp.17-24. Available at: <http://ejournal.litbang.depkes.go.id/index.php/spirakel/article/view/2967>
 20. Harris AF, S Rajatileka, H Ranson. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 83(2): 277-284.
 21. Yanola J, P Somboon, C Walton, W Nachaiwieng, L. Prapanthadara. A Novel F1552/C1552 Point Mutation in The *Aedes aegypti* Voltage-Gated sodium Channel Gene Associated with Permethrin Resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2010; 96:127-131.
 22. Yanola J, P Somboon, C Walton, W Nachaiwieng, P Somwang, L. Prapanthadara. 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 Medicine and International Health*. 2011; 16(4):501-509.
 23. Kawada H, Y Higa, O Komagata. Widespread Distribution of A Newly Found Point Mutation in Voltage-Gated Sodium Channel in Pyrethroid Resistant *Aedes aegypti* Populations in Vietnam. *PloS Neglected Tropical Diseases*. 2009; 3, 5271-5277
 24. Lima EP, Paiva MHS., de Araújo AP, da Silva ÉVG, da Silva UM, de Oliveira, et al. 2008. Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* Populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vectors*. 2008; 4(5):1-12.
 25. Srisawat R, N Komalamisra, Y. Eshita. 2010. 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.
 26. Kasai S, L Ching, SG Lam-Phua, CS Tang, K. Itokawa, O. Komagata, M. Kobayashi, and T Tomita. 2011. First Detection of a Putative Knockdown Resistance Gene in Major Mosquito Vector, *Aedes albopictus*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2011; 64:217-221.

