

Simen Rød Sandve

**Evolusjon av insektmiddelresistente populasjoner:
fokus på malariamygg**

Evolution of insecticide resistant populations:
focus on malaria vectors

Universitetet for miljø- og biovitenskap
Norwegian University of Life Sciences

Institutt for Naturforvaltning
Mastergradsoppgave 30 stp. 2005



Sammendrag

Malaria er den viktigste insekt-vektorovertførte sykdommen i verden. Kontroll av malariamyggepopulasjoner med insektmiddel er et betydningsfullt malariakontrolltiltak i malariaendemiske områder. I dag har malariamygge utviklet resistens mot alle hovedgruppene av konvensjonelle insektmidler og insektmiddelresistens ansees derfor som en alvorlig trussel mot effektiv malariakontroll. Evolusjon av insektmiddelresistente populasjoner blir styrt av de fire evolusjonskreftene: mutasjon, seleksjon, genflyt og genetisk drift. Allel som koder for insektmiddelresistens oppstår spontant ved mutasjoner og mutasjonsfrekvensen til resistensmutasjoner varierer mellom ulike resistensallel. Seleksjon, genflyt og genetisk drifts innvirkning på resistensevolusjonen blir påvirket av insektenes biologi og miljøet insektene lever i. Evolusjon av resistente insektpopulasjoner er derfor produktet av komplekse samspill mellom biotiske og abiotiske faktorer, men på tross av kompleksiteten og variabiliteten i resistensevolusjonsprosessen er det mulig å finne frem til generelle prinsipper som er gjeldene for utviklingen av alle insektmiddelresistente insektpopulasjoner. Malariamygge blir primært eksponert for insektmidler fra vektorkontrolltiltak, men insektmidler brukt i jordbruket kan også bidra til et seleksjonspress mot malariamyggepopulasjoner. I denne oppgaven ble tre thailandske malariavektorer evaluert for resistens mot insektmidler som benyttes i sitrusplantasjer. To populasjoner av hver myggart ble testet for resistens, en populasjon fra en sitrusplantasje og en populasjon fra et jordbruksområde med begrenset insektmiddelbruk. Myggpopulasjonenes følsomhet for insektmidlene ble evaluert med CDC bottle-bioassay. Probitanalyse og LTR-estimat ble benyttet til å bestemme om det var forskjeller i insektmiddelfølsomhet mellom populasjonene. Resultatene tydet på at bruken av insektmidler i sitrusplantasjene selekterer for insektmiddelresistens i malariamyggepopulasjoner i Nord-Thailand. Insektmiddelbruk i sitrusplantasjer kan utgjøre en trussel for fremtidig vektorkontroll.

Abstract

Malaria is the most important insect-vector transmitted disease. Insecticide-based vector control strategies are key measures in many malaria endemic areas. To day, resistance to all groups of conventional insecticides has been identified in malaria vectors, and insecticide resistance is therefore a serious threat to malaria control. Evolution of insecticide resistant populations is controlled by four evolutionary forces: mutation, selection, gene flow and genetic drift. Resistance genes arise spontaneous by mutations. Different resistance mutations vary in their mutation frequency. Insect biology and the environment the insects live in influence how selection, gene flow and genetic drift affect the evolution of insecticide resistant populations. The total evolutionary pressure towards insecticide resistant populations consists of complex interactions between biotic and abiotic factors. Even so, several general principles on the evolution of insecticide resistant populations can be derived. Malaria vectors are primarily exposed to insecticides used in vector control measures, but agricultural insecticides can also contribute to a selection pressure on mosquito populations. In this thesis three Thai malaria vectors was screened for resistance against two agricultural insecticides used in citrus plantations. For each vector species two populations was tested for resistance, one population from a citrus orchard and one population from an agricultural ecosystem with limited use of insecticides. CDC bottle-bioassay was used to test the insecticide susceptibility. Probit analysis and LTR-estimates were used to determine differences in the response to the insecticides between the populations. The results indicate that the insecticide regime in citrus orchards selects for insecticide resistance in malaria vector populations in Northern Thailand. Insecticides used in citrus plantations may pose a threat to future vector control.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	5
1. Innledning.....	6
2. Insektmiddelresistens og resistensdynamikk	12
2.1 Resistensbegrepet	12
2.2 Resistensmekanismer	13
2.2.1 Target site resistens	13
2.2.2 Avgiftningsresistens	15
2.2.3 Resistens mot ikke-konvensjonelle insektmidler	17
2.2.4 Kryssresistens og multipelresistens	17
2.3 Resistensevolusjon og resistensdynamikk	18
2.3.1 Insektmiddelresistens i naturlige populasjoner	19
2.3.2 Seleksjonstrykket	22
2.3.3 Genflyts konservative og kreative innvirkning på evolusjonen	28
2.3.4 Pleiotrofiske effekter og fitnesskostnader	29
2.3.5 Generasjonstiden og fertilitetens innvirkning på resistensdynamikk.....	31
2.3.6 Genetisk drift og ”founder effekt”	33
2.3.7 Oppsummering	33
3. Indikasjon på seleksjon for insektmiddelresistente <i>Anopheles</i> -populasjoner (Diptera: Culicidae) i et område med sitrusplantasjer i Nord-Thailand	35
3.1 Sammendrag.....	35
3.2 Introduksjon	35
3.3 Material og metode.....	38
3.3.1 Områdebeskrivelse	38
3.3.2 Myggene.....	39
3.3.3 Mygginnsamling.....	39
3.3.4 Oppformering til F1-generasjon.....	40
3.3.5 CDC bottle-bioassay metode.....	40
3.3.6 Statistikk.....	42
3.4 Resultat.....	42
3.5 Diskusjon.....	45
Litteratur.....	51

"Spraying kills off the weakling. The only survivors are insects that have some inherent quality that allows them to escape harm. These are the parents of the next generation, which, by simple inheritance, possess all the qualities of "toughness" inherent in its forebears."

Rachel Carson, Silent Spring, 1962.

Forord

Dette er den avsluttende oppgaven i min mastergrad i økologi på Universitetet for Miljø og Biovitenskap, Institutt for Naturforvaltning. Oppgaven skal tilsvare 30 studiepoeng (1 semester) arbeidsinnsats og består både av en generell litteraturstudiedel og en artikkeldel. Artikkeldelen er basert på arbeid jeg gjorde i Chiang Mai, Thailand sommeren 2004. Arbeidet mitt i Thailand var en del av Dr. Overgaard sitt prosjekt "Effects of fruit orchards, pesticide use, and landscape structure on disease transmitting mosquitoes in Thailand".

Jeg har mange jeg vil takke for hjelp, konstruktiv kritikk, skryt, kjeft og moro. Aller først kommer en stor takk til min veileder Dr. Overgaard som turte å ha meg med på sitt prosjekt og for all hjelp jeg fikk av han; hjelp til å komme i gang med arbeidet i Thailand, økonomisk hjelp og hjelp til å strukturere og planlegge oppgaven min. Dr. Overgaard vært også vært en stor ressurs i forhold til konstruktiv kritikk til mitt manuskript. Førsteamanuensis Fred Midtgaard, min interne veileder på UMB, fortjener også en stor takk for god veiledning og kloke kommentarer til manuskriptet. Takk til min meget gode venn og akademiske inspirasjonskilde Magnus Dehli Vigeland for hjelp til de statistiske analysene av mine data og for kommentarer til manuskriptet. Takk til Marte Lilleeng, Chris "Andy" Aalerud og Vegard "Candy" Martiniussen for støtte og kommentarer til manuskriptet. Takk til alle ved Office of Vector-Borne Diseases Control no. 10., Chiang Mai, for opplæring i insektavl og hjelp til gjennomføring av laboratoriarbeid. Takk til familie og andre venner som har skrytt av meg, kjeftet på meg og inspirert meg under arbeidet med oppgaven. Takk også til Institutt for Naturforvaltning ved UMB for økonomisk støtte til å gjennomføre prosjektet mitt.

Simen Rød Sandve

Ås, april 2005.

1. Innledning

Malaria er forårsaket av encellede parasitter som tilhører slekten *Plasmodium*. Det finnes ca. 120 *Plasmodium*-arter i verden, og for å fullføre sin livssyklus er alle artene avhengig av en mellomvert for aseksuell formering og en hovedvert for seksuell formering. Mellomverte er vertebrater og omfatter forskjellige fugler, reptiler og pattedyr. Kun fire *Plasmodium*-arter har mennesket som mellomvert; *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* og *P. falciparum*. *P. malariae* er også funnet i afrikanske aper, og er den eneste av de fire artene som ikke er fullstendig vertsspesifikk til mennesker (Sinden og Gilles 2002). Hovedverte er invertebrater, hovedsakelig stikkemygg. Det finnes ca. 3200 stikkemyggarter (Diptera: Culicidae) fordelt på 42 slekter, men bare én slekt, *Anopheles*, kan overføre malariaparasittene til mennesker. Over 70 forskjellige *Anopheles*-arter kan være vektorer for parasitten, men kun ca. 40 arter er viktige i malariaepidemiologisk sammenheng (Service og Townson 2002). I resten av oppgaven vil for enkelthets skyld stikkemygg bli omtalt som mygg.

Malariaparasittene blir overført mellom mennesker som en følge av hunnmyggenes behov for blod. Blodet er nødvendig for å kunne ferdigutvikle befruktede egg. Når blodkilden(e) er lokalisert og blodet er fordøyd, finner hunnmyggen et passende eggleggingshabitat. Egg- og larvehabitatene varierer mye mellom *Anopheles*-arter. Eggene kan bli lagt i alt fra innsjøer, sakteflytende elver, bekker, myrer, småpytter til vannfylte hulrom på planter eller vannfylte fordypninger i bakken (Service og Townson 2002). Dersom blodmåltidet ble tatt fra et menneske med malariainfeksjon, kan hunnmyggen være smittefarlig 10-15 dager senere. I løpet av disse 10-15 dagene har *Plasmodium*-gameter smeltet sammen i myggens tarm og det har blitt dannet smittsomme cellestadier, sporozoiter, som har forflyttet seg til myggens spyttkjertel. Hvis hunnmyggen overlever lenge nok til å ta et nytt blodmåltid vil sporozoitene bli overført til neste menneske myggen biter. I mennesker danner sporozoitene først nye cellestadier, schizonts, i levercellene. Schizontene produserer enda et nytt cellestadium, merozoiter, som vandrer ut i blodet og parasitterer de røde blodcellene. I de infiserte blodcellene blir det enten produsert nye merozoiter, eller det dannes hannlige og hunnlige gameter som kan bli tatt opp av en ny malariamygg.

Malaria representerer et alvorlig helseproblem i mer enn 90 land. Globalt er det mellom 300 og 500 millioner tilfeller av klinisk malaria årlig, hvorav 90 % er fra det afrikanske

kontinentet sør for Sahara (WHO 2000a). Mellom 1,1 og 2,7 millioner mennesker dør hvert år av malaria alene eller av malaria i kombinasjon med andre sykdommer. Rundt en million av dødsfallene utgjøres av afrikanske barn under fem år, noe som tilsvarer 25 % av den totale barnedødeligheten i Afrika sør for Sahara (WHO 2000a). Så selv i dag, med all kunnskapen vi har om malariaepidemiologi, har vi store vanskeligheter med å kontrollere sykdommens omfang. Dette reflekteres ikke minst i at World Health Organization (WHO), Verdensbanken, UNICEF og UNDP så sent som i 1998 etablerte et nytt globalt initiativ mot malaria, "Roll Back Malaria" (RBM). De siste tiårene har det vært en tilbakevending av malaria i mange områder der sykdommen tidligere har vært regnet for utryddet (WHO 2000a). I tillegg har man sett en økning av malariaepidemier i endemiske områder (WHO 2000a). Endringer i klima, både på globalt og lokalt nivå, får mye av skylden for oppsvinget i malariaepidemier. På globalt nivå er klimatiske faktorer som økt nedbør, høyere fuktighet og forlengede regnperioder med på å legge forholdene til rette for større myggpopulasjoner, og dermed økt smittefare (WHO 2003a). På lokalt nivå er jordbrukspraksis, vanningsystemer, dammer, treplanting og andre endringer i arealanvendelse med på å endre økosystemene og bedre forholdene for malariavektorer (WHO 2003a). En annen årsak til økning i malariaepidemier er folkevandringer, for det meste et resultat av fattigdom, krig og hungersnød. Et godt eksempel er fra grenseområdene mellom Thailand og de fattige nabolandene Myanmar og Kambodsja. Malariainfiserte flyktninger og ulovlige arbeidere fra Myanmar og Kambodsja bringer med seg malariainfeksjoner som fører til epidemiutbrudd i grenseområdene til Thailand (Personlig meddelelse Wannapa Suwonkerd, Office of Vector Borne Disease Control No. 10, Chiang Mai).

Menneskets "kamp" mot malaria har pågått lenge og RBM er kun det siste i en lang rekke mer eller mindre organiserte forsøk på å kontrollere sykdommen. Malaria er nemlig ingen "ny" sykdom, men en sykdom mennesket har levd med lenge. Flere tusen år gamle religiøse og medisinske tekster fra Assyria, Kina og India beskriver malarialignende symptomer, for eksempel periodevis feber. Kunnskapen om naturlegemidler som "feber tre bark" er et annet tegn på menneskets lange historie med den dødelige sykdommen. Bruken av denne barken mot malarialignende symptomer ble første gang nedtegnet av en Jesuit-misjonær på 1600-tallet i Peru (Gilles 2002). Senere viste det seg at denne barken inneholdt kinin. Kinin er i dag utgangspunktet for fremstilling av den syntetiske avarten klorokin, et av de viktigste malariamedikamentene vi har. Kanskje den mest spektakulære indikasjonen på menneskets lange sameksistens med malariaparasitten er evolusjonen av sigdcelleanemi. Personer med

sigdcelleanemi har anormale, sigdformede røde blodceller forårsaket av en mutasjon i genet som koder for hemoglobinmolekylet. Homozygote individer for denne mutasjonen har svært redusert levetid og når sjeldent reproduktiv alder. Heterozygote genotyper opplever vanligvis ingen effekt av sigdcellemutasjonen, men ved lave oksygenkonsentrasjoner i blodet vil blodcellene endres til sigdformen. Det har vist seg at heterozygote for sigdcellemutasjonen har lavere antall malariainfeksjoner enn mennesker uten mutasjonen. Det muterte hemoglobingenet finnes i høy frekvens i afrikanske malariaendemiske områder, til tross for de svært negative effektene genet har på individer som er homozygote for mutasjonen (Halliburton 2004).

Mennesker lenge har gjenkjent malariasymptomene, og har til en viss grad også har kunnet behandle malaria. Men det var ikke før de siste 20 årene av 1800-tallet at den menneskelige malariaparasitten ble identifisert for første gang, og mysteriet rundt smitten av sykdommen ble løst. Forståelse av myggens rolle i malariaepidemiologien førte til at de første moderne kontrolltiltak så dagens lys på slutten av 1800-tallet. De første forsøkene på å kontrollere sykdommen fokuserte på vektorkontroll, i form av fysiske manipulasjoner av mygglarvehabitatene. Fra 1899 og utover på 1900-tallet ble en rekke larvekontrollprogrammer gjennomført i bl.a. Sierra Leone, Cuba, Malaysia og Egypt, og på 1930-tallet ble for første gang insektmidler tatt i bruk i storskala larvekontroll (Gilles 2002).

Vektorkontroll innebærer i dag fysiske habitatmanipulasjoner og bekjemping av mygg med insektmidler (Beales og Gilles 2002). Habitatmanipuleringer kan for eksempel bestå av å regulere vannstanden i larvehabitat (regulerte vannmagasiner) eller fullstendig fjerne myggens eggleggingshabitat (drenering av våtmarker). Fysisk manipulering av mygg habitat er ofte svært ødeleggende for landskapet og går ut over mange ikke-målgruppe organismer. Slike initiativ er derfor lite egnet til annet enn lokale vektorkontrolltiltak. I tillegg har flere viktige malariavektorer larvehabitat som det er vanskelig å kontrollere utbredelsen av. *An. gambiae* (Diptera: Culicidae), verdens viktigste malariavektor, kan for eksempel bruke små vannfylte fordypninger til larvehabitat (Minakawa et al. 2004). Begrensning av denne typen larvehabitat er vanskelig å gjennomføre på en effektiv måte (Pates og Curtis 2005). Kontroll av vektorpopulasjoner med insektmidler er derfor mange steder en foretrukket strategi, som ofte har vist seg å være svært effektiv (WHO 2005). Insektmidlene kan benyttes mot larvestadiet, til utendørs sprøyting mot voksne malariavektorer eller til innendørs bruk rettet mot hunnmygg på søken etter blod (Beales og Gilles 2002). I dag er selektiv sprøyting mot

larvestadiet og innendørs bruk av insektmidler vanlige tiltak mot malariamygg og andre insektvektorer (Vulule et al. 1996; Coetzee et al. 1999; Hargreaves et al. 2003; Zhang et al. 2004).

Det var først etter andre verdenskrig at verdenssamfunnet med WHO i spissen, forstod omfanget av malariasykdommen. Malaria drepte den gang flere mennesker enn noen annen sykdom og var en av de fremste truslene for utvikling av jordbruk og industri i mange av de nye landene som trådte frem på 1940-50 tallet (Beales og Gilles 2002). Kombinasjonen av økt kunnskap om malariaepidemiologi og utvikling av mer effektive syntetiske insektmidler gjorde at ideen om malariautryddelse ble unnfanget. Utryddelsesstrategien var basert på at malariaepidemiologi ble sett på som et enkelt system. Hvis levetiden til hunnmyggene ble redusert tilstrekkelig, slik at malariaparasitten ikke rakk å utvikle seg til det smittsomme stadiet i myggene, kunne sykdomssyklusen brytes (Beales og Gilles 2002). Mellom 1946 og 1957 ble særdeles vellykkede malariautryddelseskampanjer gjennomført på Kypros og Sardinia og i Guyana, Venezuela og Hellas ved hjelp av massiv bruk av DDT og andre insektmidler (Gilles 2002). I 1955 ble prinsippet om malariautryddelse adoptert av WHO som en global strategi for bekjempelse av sykdommen. Men selv om utryddelseskampanjene førte til at malariadødsfallene mange steder falt drastisk, skulle det vise seg at denne ”enkle” måten å drive malariabekjempelse på ikke var effektiv i alle områder og heller ikke bærekraftig.

I midten av 70-årene endret WHO fokus fra sykdomsutryddelse til sykdomskontroll. Den nye strategiplanen mot malaria som ble utviklet av WHO i 1979, Malaria Control Program, stod i sterk kontrast til de tidligere utryddelsesprogrammene. Malariakontroll hadde i motsetning til malariautryddelse ikke som mål å fullstendig eliminere malaria, men å redusere mortaliteten og sykdomstilfellene slik at malaria ikke lenger var et folkehelseproblem (Beales og Gilles 2002). Mens malariautryddelsesstrategien hovedsakelig var basert på storskala vektorkontroll med insektmidler, var fokuset på denne typen vektorkontroll betraktelig tonet ned i den nye malariakontrollstrategien (Roberts et al. 1997). Malariakontroll er bygget på fire fundamentale prinsipper: (1) Tidlig diagnose og behandling (2) Selektive og bærekraftige preventive tiltak, inkludert bruk av vektorkontroll (3) Tidlig påvisning eller prognose av epidemier og rask implementering av kontrolltiltak (4) Styrking av kapasiteten til lokal grunnforskning og anvendt forskning, for å fremme regelmessig overvåkning av malariasituasjonen (WHO 2005). Etter 1979 har WHO implementert to andre

malariakontrollprogram, Global Malaria Control Strategy (WHO 1993) og RBM-programmet, som er aktivt i dag (WHO 2000b).

Det er mange årsaker til WHO's kursendring fra malariautryddelse til kontroll, både politiske, økonomiske, praktiske og ikke minst biologiske. Jeg vil ikke gå nøye inn på diskusjonen om hvor malariautryddelseskampanjen slo feil, eller hvordan vi bør designe gode malariakontrollprogram. Resten av oppgaven vil konsentrere seg om ett av problemene som lå til grunn for WHO's skifte av fokus til malariakontroll, nemlig den dramatiske økningen av insektmiddelresistens i myggpopulasjoner (Hemingway og Ranson 2000). I myggkontrollssammenheng ble man første gang oppmerksom på resistensproblemet tidlig på 50-tallet, i kjølvannet av de første utryddelseskampanjene. De første resistente populasjonene av malariamyggen *Anopheles sacharovi* ble oppdaget i Hellas i 1951, etter intensiv DDT sprøyting (Spielman og D'Antonio 2001). Utover andre halvdel av 1900-tallet økte resistensproblemet i takt med intensivert sprøyting mot malariavektorene. I 1975 rapporterte WHO at 256 millioner mennesker levde i områder der insektmiddelresistens direkte underminerte effektiviteten av myggkontrolltiltak, og da var ikke Afrika tatt med i statistikken (Hemingway og Ranson 2000).

Nå, mer enn 50 år etter de første malariamyggpopulasjonene ble rapportert resistente mot DDT, er det påvist resistens mot alle hovedgrupper av insektmidler hos malariamygg (Hemingway et al. 2004). Selv om insektmiddelbruken ble kraftig redusert i vektorkontrollen fra midten av 70-tallet, har allikevel myggbekjempelse med insektmidler vært en viktig del av malariakontrollen frem til i dag. I WHO's nyeste kontrollinitiativ RBM er både innendørs insektmiddelsprøyting (Indoor Residual Spraying, IRS) og insektmiddelimpregnerte sengetett (Insecticide-Treated Nets, ITNs) viktige tiltak (WHO 2005). Insektmiddelresistens ansees derfor fremdeles som en alvorlig trussel mot en effektiv malariakontroll (Greenwood og Mutabingwa 2002; Hemingway et al. 2002). Per februar 2005 var det registrert tilfeller av resistens mot et eller flere insektmidler hos 63 arter av *Anopheles*-mygg på verdensbasis (Center for Integrated Plant Studies 2005). Skrekkeeksempelet er malariavektoren *An. albimanus* fra Sentral-Amerika. Denne malariavektoren er rapportert å være resistent mot 21 ulike kjemiske forbindelser og har dermed den tvilsomme æren å være den 20'ende mest resistente artropoden i verden (Mota-Sanchez et al. 2002).

Denne oppgaven holder seg tematisk innenfor evolusjon av insektmiddelresistente populasjoner av malariamygg, og består av to ulike deler. Den første delen er en generell del om insektmiddelresistens og resistensdynamikk i insektpopulasjoner, med hovedvekt på malariamygg. Her kommer jeg kort inn på mekanismene bak resistens mot konvensjonelle insektmidler, men fokus er først og fremst rettet mot dynamikken i evolusjonsprosessen som leder til resistente insektpopulasjoner. Andre del av oppgaven er et studium av insektmiddelresistens på tre malariavektorer i Thailand. I denne delen går jeg nærmere inn på en problemstilling som har vært omdiskutert: i hvilken grad selekterer insektmidler som brukes mot skadedyr i landbruket for insektmiddelresistens i malariamyggpopulasjoner? Flere studier, blant annet fra Sri Lanka (Hemingway et al. 1986), El Salvador (Lines 1988) og Burkina Faso (Diabate et al. 2002), har vist at jordbruksinsektmidler kan spille en viktig rolle i evolusjonen av insektmiddelresistente myggpopulasjoner. I mitt studium forsøker jeg å evaluere om to vanlige insektmidler som brukes i sitrusplantasjer i Nord-Thailand selekterer for insektmiddelresistens i malariamyggpopulasjoner.

2. Insektmiddelresistens og resistensdynamikk

2.1 Resistensbegrepet

Evolusjon av insektmiddelresistens kan defineres som en genetisk forandring som endrer insektenes motstandsdyktighet mot insektmidler. Den genetiske forandringen kommer som en følge av naturlig seleksjon etter eksponering for insektmidler. Insektmiddelresistensen kan være fysisk eller atferdsmessig. Fysisk resistens er økt motstandsdyktighet mot insektmidler som en følge av morfologiske og/eller fysiologiske endringer. For at resistensen skal kunne defineres som atferdsmessig må en atferdsendring frembringe økt motstandsdyktighet mot insektmidler. Ekte atferdsresistens, direkte forårsaket av en genetisk forandring, har vist seg å være vanskelig å påvise. Et eksempel på dette var oppdagelsen av en malariamykkart i Afrika som begynte å unngå insektmiddelsprøytede hus etter en tid med DDT sprøyting. I ettertid har det vist seg at denne ”atferdsmessige resistente” populasjonen bestod av flere nært beslektede arter med ulik atferd (Mota-Sanchez et al. 2002). Det er i dag kun påvist ekte atferdsmessig resistens hos en art, *Lucillia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) (Mota-Sanchez et al. 2002).

En tredje type motstandsdyktighet mot insektmidler er økning av insekters naturlige insektmiddeltoleranse. Økt kutikulatykkelse, økt fettinnhold og økt kroppsstørrelse er faktorer som kan være med på å forhøye toleransen mot insektmidler (WHO 1975). Denne typen ”resistens” innebærer ikke at spesifikke resistensgen endrer følsomheten for insektmidler. En populasjons naturlige toleranse kan økes fordi det alltid vil eksistere individuelle forskjeller i insektenes evne til å motstå sprøytemidlenes toksiske effekt. Ved eksponering for insektmidler vil de mest tolerante individene overleve, og danne basis for neste generasjon. Den naturlige toleransen for insektmidler kan derfor også variere i insektpopulasjoner på grunn av sesongmessige variasjoner i morfologiske og fysiologiske karaktertrekk.

Resistens kan betraktes på både individnivå og populasjonsnivå. Dersom insekt har et resistensgen som øker motstandsdyktigheten mot insektmidler kan individet defineres som resistant. Resistens på populasjonsnivå er mer komplisert å definere. For det første eksisterer det ofte resistente enkeltindivider i en populasjon uten at populasjonen kan kalles resistant. For det andre er det mange andre faktorer enn frekvensen av resistensgen i populasjonen som virker inn på insektmidlenes effekt på insektpopulasjonene i naturen. Blant annet kan

variasjoner i været, insektenes atferd og insektmiddelets nedbrytningstid medføre forskjeller i virkningen av insektmiddelsprøyting. Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) har derfor laget en mer presis definisjon på resistens (Tomlin 1997), som sier at en insektpopulasjon kan kalles resistent når følgende kriterier gjelder:

1. Insektmiddelet er anbefalt brukt mot skadeinsektet og har gitt god virkning tidligere.
2. Manglende effekt ikke er forårsaket av ukorrekt lagring, dosering og bruk, eller av uvanlige forhold.
3. Den anbefalte dosen ikke reduserer insektpopulasjonen under den økonomiske skadeterskelen.
4. Den manglende effekten av insektmiddelet er forårsaket av en arvelig endring i følsomhet for middelet hos insektpopulasjonen.

En svakhet ved denne definisjonen er at punkt 3 ikke sier noe spesifikt om vektorinsekt. Man kunne derfor tenke seg en tilføyelse til punkt tre: "Den anbefalte dosen ikke reduserer insektpopulasjonen under den økonomiske *eller medisinske skadeterskelen*".

2.2 Resistensmekanismer

Det finnes to hovedmekanismer for insektmiddelresistens "target site resistens" og avgiftningsresistens. De to hovedmekanismene gir resistens for alle fire hovedgrupper av konvensjonelle insektmidler: organofosfater (OP), organoklorider (OC), pyretroider (PY) og karbamater (CB) (Hemingway et al. 2004). Target site resistens er forårsaket av strukturelle forandringer av aminosyrer som medfører at insektmidlene ikke lenger kan bindes til sitt virkningssted i nervesystemet. Avgiftningsresistens innebærer at kvalitative eller kvantitative endringer av naturlige avgiftningsenzymmer øker insektets motstandsdyktighet mot insektmidler.

2.2.1 Target site resistens

Target site resistensmekanismene kan deles i tre grupper: (1) ufølsomt AChE, (2) kdr og (3) GABA-resistens. Ufølsomt acetylcholinesterase (AChE) gir resistens mot OP- og CB-insektmidler. AChE er ansvarlig for termineringen av nerveimpulser (Nauen et al. 2001) og er et av de viktigste enzymene i insektenes sentralnervesystem (Sonderlund og Bloomquist 1990). OP og CB virker ved at de binder opp og hemmer acetylcholinesterase i

nervesynapsene (Hemingway et al. 2004). Eksponering for OP- eller CB-insektmidler fører dermed til at nerveimpulser blir til en kontinuerlig strøm av nervesignaler, som til slutt dreper insektene. Dersom insekt har ufølsomt AChE vil ikke OP- og CB-midlene kunne binde opp AChE i nervesynapsene like effektivt som i ikke-resistente insekt. AChE-resistens kan deles i to kategorier. Den første kategorien AChE-resistens gir høy CB- og lav OP-resistens, mens den andre kategorien gir høy OP-resistens og tilsvarende eller lavere resistens mot CB-midler (Russel et al. 2004). Ufølsomt AChE har forårsaket resistens hos viktige malariavektorer (Tabell 1) og alle tilfeller av AChE-resistens i *Anopheles*-mygg har tilhørt den første kategorien AChE-resistens (Hemingway et al. 2004). Den genetiske basisen til AChE-resistens i mygg er assosiert med en enkelt aminosyresubstitusjon (glysin→serin) i proteinet transkribert fra AChE1-genet (Weill et al. 2003).

”Knock down resistens” (kdr) gir resistens mot OC- (DDT) og/eller PY-insektmidler. Disse insektmidlene har natriumkanalene i nervemembranen som virkningssted (Zlotkin 2001). I ikke-resistente insekt vil OC og PY binde seg til reseptorer på natriumkanalene og forstyrre ionetransporten over nervemembranen. Hos insekt med kdr har en mutasjon ført til en strukturforandring på natriumkanalene, slik at insektmiddelet ikke lenger bindes effektivt til disse reseptorene (Hemingway og Ranson 2000). Kdr har fått mye oppmerksomhet fordi man nå frykter at denne resistensmekanismen truer effektiviteten til PY-impregnerte sengenett, et av de viktige malariakontrolltiltak i malariaendemiske områder (Ranson et al. 2004). Det er identifisert mer enn 20 ulike kdr-mutasjoner i insekt (Sonderlund og Knipple 2003). Den vanligste kdr-mutasjonen, en leucin→phenylalanin substitusjon i natriumkanalene, er funnet i mange ulike insekt, for eksempel *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) (Williamson et al. 1996), *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) (Martinez-Torres et al. 1999) og *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) (Bass et al. 2004). Denne leucin→phenylalanin mutasjonen er også vanlig i PY- og DDT-resistente *Anopheles*-populasjoner (Tabell 1). I tillegg er det funnet to andre aminosyresubstitusjoner i samme gen, som også er assosiert med kdr i *Anopheles*-mygg (Ranson et al. 2000; Luleyap et al. 2002).

Den siste formen for target site resistens er GABA-resistens. Denne typen target site resistens påvirker følsomheten for syklo-diener, en type OC-midler. Disse insektmidlene har sitt virkningssted på de γ -amino-buttersyre (GABA) -styrte klorkanalene i nervemembranene (Bloomquist 2001). Diel-drin er et av de mest brukte syklo-dienermidlene, og mange insektarter har utviklet diel-drinresistens basert på en enkel substitusjonsmutasjon i Rdl-genet

(alanin→serin eller alanin→glycin) (ffrench-Constant et al. 2000). I mygg er alanin→serin substitusjonen identifisert i dieldrinresistente *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (Thompson et al. 1993) og i malariamyggen *An. stephensi* (Andreasen og ffrech-Constant 2002).

Tabell 1. Oversikt over noen tilfeller av target site resistens identifisert i viktige malariavektorer.

Target site mekanisme	Art	Kilde
Ufølsomt AChE	<i>An. albimanus</i>	Ayad og Georghiou 1979; Hemingway og Georghiou 1983
	<i>An. gambiae</i>	N'Guessan et al. 2003; Weil et al. 2003
kdr	<i>An. arabiensis</i>	Diabate et al. 2004 ¹
	<i>An. gambiae</i>	Martinez-Torres et al. 1998 ¹ ; Ranson et al. 2000 ² ; Yawson et al. 2004 ¹
	<i>An. sacharovi</i>	Lüleyap et al. 2002 ^{1,2}
	<i>An. stephensi</i>	Enayati et al. 2003 ¹
GABA-resistens	<i>An. stephensi</i>	Andreasen og ffrench-Constant 2002
Kjente kdr-mutasjoner: ¹ leucin→phenylalanin ² leucin→serin		

2.2.2 Avgiftningsresistens

Den andre hovedgruppen resistensmekanismer er avgiftningsresistens, også kalt metabolsk resistens. Denne hovedgruppen av resistensmekanismer kan virke på to måter, både kvantitativt og kvalitativt (Brogdon og McAllister 1998a). Tre grupper avgiftningsenzymmer er ansvarlige for insektmiddelresistens: (1) esteraser, (2) P450-monooxygenaser og (3) glutathion S-transferaser (GST).

Esteraser finnes naturlig i alle insekt, og deres oppgave er blant annet å hydrolysere esterbindinger. Insekt med esterasebasert resistens kan hydrolysere store deler av insektmiddelet som er tatt opp i insektet, før det når sitt virkningssted (Sonderlund og Bloomquist 1990). Det er påvist både kvantitativ og kvalitativ esterasebasert resistens hos insekt (Hemingway et al. 2004). Den vanligste formen for kvantitativ resistens er forårsaket av genamplifikasjon (Vaughan et al. 1995; Small og Hemingway 2000; Field og Blackman 2003). De to vanligste resistensallelene (est α 2 og est β 2) kan være amplifisert over 80 ganger i enkelte resistente *Culex*-mygg (Diptera: Culicidae) (Paton et al. 2000; Weill et al. 2000). Kvantitativ resistens assosiert med økning i transkripsjonsraten har også blitt rapportert om (Rooker et al. 1996). Kvantitativ esterasebasert PY- og OP-resistens er vanlig i *Anopheles*-mygg (Tabell 2), men hvilke gen(er) som er involvert i disse resistensformene i *Anopheles*-mygg er imidlertid ukjent (Hemingway et al. 2004). Kvalitativ esterasebasert resistens er påvist i flere insekt (Campbell et al. 1998; Hemingway et al. 2004), og også i *Anopheles*-

mygg (Tabell 2). Heller ikke for kvalitativ esterasebasert resistens er den genetiske basisen til resistensmekanismen(e) identifisert i *Anopheles*-mygg (Hemingway et al. 2004).

Endring i aktiviteten til P450-monooxygenaser kan gi resistens mot de fleste kjemiske insektmiddelgrupper (Hemingway et al. 2004). P450-monooxygenaser finnes i alle cellulære organismer, og disse enzymene har flere roller i metabolske prosesser, deriblant oksidering av giftstoffer (Siegfried og Scharf 2001). Flere studier har påvist oksidasebasert resistens i malariamygg (Tabell 2). Den nøyaktige genetiske basisen for P450-resistens er vanskelig å identifisere fordi det eksisterer mange P450-genfamilier, fordelt på flere kromosomer (Nikou et al. 2003). På tross av den genetiske kompleksiteten har enkelte studier klart å identifisere P450-gen ansvarlig for insektmiddelresistens. I *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), som har over 90 P450-gener totalt i genomet, har Daborn et al. (2002) identifisert ett P450-gen (CYP6g1) assosiert med DDT-resistens. Dette genet er funnet i 20 DDT-resistente populasjoner med svært ulik geografisk opprinnelse (Daborn et al. 2002). I malariamyggen *An. gambiae* er det identifisert over 100 P450-gener totalt (Ranson et al. 2002), men kun ett P450-gen (ZYP6Z1) kan i dag kobles til insektmiddelresistens (PY-resistens) (Nikou et al. 2003).

Tabell 2. Noen tilfeller av avgiftningsresistens identifisert i viktige malariavektorer.

Avgiftningsmekanisme	Art	Insektmiddelgruppe	Kilde
Esteraser	<i>An. albimanus</i>	Pyretroid	Brogdon og Barber 1990 ¹
	<i>An. arabiensis</i>	Organofosfat	Hemingway 1983 ²
	<i>An. gambiae</i>	Pyretroid	Vulule et al. 1999 ¹
	<i>An. stephensi</i>	Organofosfat	Hemingway 1982 ²
P450-monooxygenaser	<i>An. albimanus</i>	DDT, pyretroid	Brogdon et al. 1999a
	<i>An. funestus</i>	Pyretroid	Brooke et al. 2001
	<i>An. gambiae</i>	Pyretroid	Vulule et al. 1999
GST	<i>An. gambiae</i>	DDT	Prapanthadara et al. 1995 ^{1,2} , Ranson et al. 2001
	<i>An. subpictus</i>	Organofosfat	Hemingway et al. 1991

¹kvantitativ resistens ²kvalitativ resistens

Glutathion S-transferaser (GST) er multifunksjonelle enzymer med en sentral rolle i avgiftningsmekanismer i mange dyr (Sun et al. 2001). Forhøyet GST-aktivitet kan gi resistens mot DDT, organofosfater og pyretroider (Ortelli et al. 2003). Til nå er kun GST-basert DDT- og OP-resistens identifisert hos *Anopheles*-mygg (Hemingway et al. 2004) (Tabell 2), men nye data fra *An. stephensi* i India antyder at en GST-mekanisme også kan være involvert i

pyretroidresistens (Ganesh et al. 2003). De fleste studier som har påvist GST-basert insektmiddelresistens er korrelative studier av GST-aktivitet og insektmiddeltolleranse. De faktiske mekanismene bak GST-basert resistens, det vil si hvilke gener som koder for insektmiddelresistens, er lite kjent (Ranson et al. 2001; Enayati et al. 2005). De få detaljerte studiene som til nå er gjort på GST-basert resistens tyder på at kvantitative endringer i GST-aktiviteten, forårsaket av genamplifikasjon eller økning i transkripsjonsrate, er av størst betydning for GST-basert insektmiddelresistens (Grant og Hammock 1992; Ranson et al. 2001).

2.2.3 Resistens mot ikke-konvensjonelle insektmidler

Det finnes også flere ikke-konvensjonelle insektmidler. Noen slike insektmidler tar utgangspunkt i insektenes egne veksthormoner, der den toksiske effekten er forårsaket av hormonforstyrrelser. Det er utviklet resistens mot hormonbaserte midler i flere skadeinsekt i landbruket (Palumbo et al. 2001; Reuveny og Cohen 2004), men så vidt jeg vet har ingen studier rapportert om resistens mot slike insektmidler i malariamygg. En annen viktig ikke-konvensjonell insektmiddelgruppe er basert på de toksiske virkningene av bakteriene *Bacillus thuringiensis* sspp (Bt). Utvikling av resistens mot ulike Bt-midler er observert både i felt og i laboratorier for flere myggarter, deriblant *Anopheles*-mygg (Su og Mulla 2004; Wirth et al. 2004; Zhang et al. 2004). Bt-resistens i malariamyggepopulasjoner er et lite problem i et globalt perspektiv. Jeg vil derfor ikke gå nærmere inn på resistensproblematikken eller resistensmekanismene for ikke-konvensjonelle insektmidler i denne oppgaven.

2.2.4 Kryssresistens og multipler resistens

Insekt kan utvikle resistens mot flere insektmidler samtidig, enten ved kryssresistens eller multipler resistens. Kryssresistens defineres som resistens mot flere insektmidler basert på en og samme resistensmekanisme. Dette er vanlig mellom insektmidler i samme insektmiddelgruppe, for eksempel mellom forskjellige pyretroider (Ramasubramanian og Regupathy 2004; Liu et al. 2004) eller forskjellige organofosfater (Hsu et al. 2004). I tillegg kan det oppstå kryssresistens mellom insektmidler fra ulike insektmiddelgrupper. For det første gir target site-basert resistens kryssresistens mellom insektmidler fra ulike insektmiddelgrupper med like virkningssteder (Soderlund og Knipple 2003; Weil et al. 2003). For det andre kan også avgiftningsresistens gi kryssresistens mellom insektmidler med ulikt

virkningssted (Brogdon og Barber 1990; Bisset et al. 1997, 1998; Rodriguez et al. 2002) Både target site resistens og avgiftningsresistens har forårsaket kryssresistens i malariavektorer (Tabell 3).

Multipelresistens er resistens der et individ har flere ulike resistensmekanismer mot ett eller flere insektmiddel. En slik type resistens kan oppstå i insektpopulasjoner som har blitt utsatt for seleksjonstrykk fra flere insektmiddel over lang tid (Johansen og Nordhus 2004). Et av de klassiske eksemplene på multipel resistens er *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) som på enkelte lokaliteter er resistent mot alle kjemiske insektmiddelgrupper (Gullan og Cranston 2000). Evolusjon av multiresistente malariamyggpopulasjoner har også forekommet (Davidson 1963).

Tabell 3. Kryssresistens identifisert i noen malariamyggpopulasjoner

Art	Resistensmekanisme	Kryssresistens	Kilde
<i>An. albimanus</i>	Esteraser	OP-PY	Brogdon og Barber 1990
	P450-oksidaser	DDT-PY	Brogdon et al. 1999a
	AChE	OP-CB	Hemingway og Georgiou 1983
<i>An. gambiae</i>	kdr	DDT-PY	Ranson et al. 2000
	AChE	OP-CB	Weill et al. 2003

2.3 Resistensevolusjon og resistensdynamikk

Evolusjon kan defineres som en forandring i en populasjons genetiske sammensetning over tid (Halliburton 2004). Drivkraften bak evolusjonen er de fire evolusjonskreftene: seleksjon, mutasjon, genflyt og genetisk drift. Evolusjon av en insektmiddelresistent populasjon finner sted når en eller flere av evolusjonskreftene medfører økning i frekvensen av ett eller flere resistensgen i populasjonen. Insektpopulasjoner i naturen lever med abiotiske og biotiske miljøparametere i kontinuerlig endring. Evolusjon av insektmiddelresistens er av den grunn ikke en lineær, retningsbestemt og forutsigbar prosess, men en dynamisk prosess som kan skifte ”retning” og ”hastighet” ettersom miljøparametrene i økosystemet forandres. For å forstå resistensdynamikk i insektpopulasjoner må man forstå hvordan de biologiske, fysiske og kjemiske faktorene i økosystemet påvirker evolusjonskreftene, og dermed frekvensen til resistensgen(er) i populasjonene.

Seleksjon, mutasjon, genflyt og genetisk drift virker med ulik intensitet på resistensevolusjon i insektpopulasjoner med forskjellig habitat og biologi. I tillegg er intensiteten av seleksjonskreftene avhengig av insektmiddelet som brukes, sprøytefrekvensen og konsentrasjonen av giften det sprøytes med. Dynamikken i resistensutviklingen i insektpopulasjoner er derfor komplisert, og vil variere mellom insektpopulasjoner.

2.3.1 Insektmiddelresistens i naturlige populasjoner

En naturlig populasjon defineres her som en populasjon som ikke har vært utsatt for seleksjonspress fra insektmidler. For at en insektpopulasjon skal kunne utvikle resistens for insektmidler, må den naturlige populasjonen inneholde minst ett resistensallel (R-allel). Et R-allel er en utgave av et gen som gir insekt høyere toleranse for insektmiddel i forhold til insekt med en "vanlig", ikke-resistent utgave av genet (S-allel). Resistensallel er del av den naturlige alleliske variasjonen i populasjoner og kan oppstå til enhver tid ved mutasjon, eller kan tilføres en populasjon ved genflyt fra andre populasjoner. Hvor ofte R-allel oppstår, og hvilken frekvens R-allelene har i naturlige populasjoner, legger grunnlaget for hvor raskt en insektpopulasjon kan utvikle resistens mot insektmidler når en populasjon utsettes for seleksjonspress fra insektmidler.

Det er gjort mange forsøk på å estimere mutasjonsraten for nye R-allel, men dette er ingen enkel oppgave. For det første er estimatene usikre på grunn av metodiske vanskeligheter ved beregning av mutasjonsrater (Halliburton 2004). I insekt er mutasjonsraten for ulike mutasjoner estimert til å være alt fra $1,2 \times 10^{-4}$ til 5×10^{-18} lokus⁻¹ generasjon⁻¹ (Roush og Daly 1990; Halliburton 2004). For *D. melanogaster* er mutasjonsrate per basepar per replikasjon estimert til $3,4 \times 10^{-10}$, som tilsvarer 0,14 mutasjoner per genom per generasjon (Drake et al. 1998). For det andre kan mange ulike mutasjoner føre til insektmiddelresistens og man er derfor nødt til å estimere mutasjonsraten for hver resistensmutasjon med ulik genetisk basis. I tillegg til variasjonene i mutasjonsfrekvens mellom ulike resistensmutasjoner, er det også variasjoner i mutasjonsfrekvens for én type resistensmutasjon. AChE-resistens er en vanlig resistensmekanisme i mygg utsatt for seleksjon fra OP- eller CB-insektmidler, men man har ikke funnet denne resistensmekanismen i *Ae. aegypti*. Dette kan forklares ved at den genetiske koden til AChE-genet i *Ae. aegypti* skiller seg litt ut fra AChE-genet i andre mygg. Denne genetiske forskjellen minimerer sannsynligheten for en AChE-mutasjon i *Ae. aegypti* (Weill et al. 2004). Nye data viser at insektmiddelresistens også kan være forårsaket av transposable

elementer (Gahan 2001; Daborn 2002). Transposable elementer er mobile DNA-elementer som kan sette seg inn i et kromosom, og raten til slike mutasjoner kan være høyere enn for mange andre typer mutasjoner (French-Constant et al. 2004). På grunn av variasjonene i mutasjonsrater mellom ulike resistensmutasjoner og de metodiske usikkerhetene ved estimeringen av mutasjonsrater, har mutasjonsrateestimat meget begrenset praktisk anvendbarhet i modelleringer og beregninger av resistensutvikling.

Etter et R-allel har oppstått i en populasjon, vil frekvensen av allelet øke, synke eller holde seg stabil. Det nyoppståtte R-allelet vil som oftest gå tapt etter få generasjoner (Halliburton 2004). Tap av et nyoppstått R-allel fra populasjoner kan skyldes at insekt med R-allelet har dårligere overlevelse enn insektene uten R-allelet (seleksjon), men det kan også skyldes tilfeldigheter (i.e. genetisk drift) (Kimura 1962). Det er for eksempel ikke sikkert at et insekt med et nyoppstått resistensgen finner en make å pare med, og dersom insektet får paret, er det heller ikke sikkert at eggene/larvene overlever. Tørke, flom og predasjon kan gjøre at eggene som bærer R-allel aldri utvikles til imago.

Antar vi at naturlig seleksjon ikke påvirker resistensallelet (nøytralt allel), er sannsynligheten for at et R-allel skal fikses i en populasjon $\Pr(\text{fix})=p_0$, der p_0 er frekvensen av R-allelet i første generasjonen allelet eksisterer (Kimura 1962). For nyoppståtte resistensmutasjoner, vil derfor sannsynligheten for tap fra populasjonen være:

$$(1) \text{ Sannsynlighet for tap av nøytralt allel} = 1 - p_0 = 1 - \left(\frac{1}{2N} \right), \text{ der } N \text{ er populasjonsstørrelsen}$$

Myggpopulasjoner består av mange individ. Sannsynligheten for tap av et nyoppstått resistensallel fra en naturlig populasjon er derfor svært stor ut ifra likning 1. Denne konklusjonen bygger blant annet på to viktige antagelser. For det første må vi anta at den nye resistensmutasjonen ikke påvirker bærerens overlevelse eller reproduksjon i insektmiddelfrie miljø (Se kapittel om pleiotrofiske effekter og fitnesskostnader for diskusjon). For det andre må vi anta at mutasjonen kun oppstår i ett gen i ett individ. I virkeligheten vil nyoppståtte R-mutasjoner kunne ha innvirkning på overlevelsen og/eller reproduksjonen til insekt (Guillemaud et al. 1998; Lenormand et al. 1999). Sannsynligheten for at et nytt R-allel går tapt fra populasjoner er trolig ofte høyere enn likning 1 tilsier.

Selv om nyoppståtte R-allel som oftest raskt går tapt fra en populasjon, vil en sjelden gang et nytt R-allel øke i frekvens og opprettholdes i populasjonen. Hvor stor andel av insektene i en naturlig populasjon som vil bære det nye R-allelet, er bestemt av tre faktorer: (1) immigrasjon av insekt med R-allel fra andre populasjoner, (2) resistente insekters levedyktighet/reproduksjon i forhold til ikke-resistente insekter og (3) resistensmutasjonsraten. Antar vi at genflyt og genetisk drift ikke påvirker frekvensen av R-allelet i en naturlig populasjon og at R-allelet har en skadelig effekt på insekt i usprøytete miljø, forventer vi at frekvensen av R-allelet vil stabilisere seg rundt en likevektsfrekvens. Likevekten mellom mutasjonskreftene og seleksjonskreftene vil da bestemme frekvensen av R-allelet i en naturlig populasjon. Mutasjoner skaper nye resistensallel og øker frekvensen av R-allel, mens seleksjonskreftene favoriserer ikke-resistente insekt og har en negativ innvirkning på frekvensen av R-allel. Mutasjon-seleksjonslikevekten for et skadelig allel kan beskrives med likningen:

$$(2) \text{ Frekvens av skadelig allel i en populasjon} = q = \frac{u}{hs}, \text{ der } h \neq 0$$

Likevektsfrekvensen (q) i en populasjon, er opprettholdt av forholdet mellom mutasjonsfrekvensen (u) og seleksjonen mot de heterozygote individene (SR) (Halliburton 2004). Seleksjonen mot SR -individer er produktet av seleksjonskoeffisienten (s) og dominansen (h). Dominansen beskriver den relative fenotypiske likheten mellom heterozygote og homozygote for et gitt allel, mens seleksjonskoeffisienten er et relativt mål på overlevelsessevnen til individer med R-allel i usprøytete miljø. Ut ifra likning 2 ser en at frekvensen av R-allel i en naturlig populasjon øker hvis R-mutasjonsfrekvensen øker og/eller hvis seleksjonspresset mot SR -individer (hs) senkes. Seleksjonspresset mot SR -individ senkes dersom dominansnivået senkes eller hvis R-allelets skadelige effekt på insektene i insektmiddelfrie miljø blir mindre.

Estimater med basis i mutasjon-seleksjonslikevekten antyder en naturlig R-allelfrekvens fra 10^{-2} til 10^{-13} (Roush og Daly 1990). Et essensielt spørsmål er om estimeringen av frekvensen av R-allel i naturlige populasjoner i det hele tatt er mulig med denne likevektslikningen, siden likningen forutsetter at resistente individer overlever og/eller reproduserer dårligere enn ikke-resistente insekt. Noen studier har klart å påvise slike forskjeller mellom resistente og ikke-resistente insekt, men det er høyst usikkert at dette er normen (Se kapittel om pleiotrofiske

effekter og fitnesskostnader). Hvis insektmiddelresistensen ikke påvirker overlevelse og/eller reproduksjon, kan den naturlige R-allelfrekvensen i en populasjon være høyere enn forventet ut ifra mutasjon-seleksjonslikevekten for et skadelig allel.

Det er gjort få empiriske studier på frekvensen av resistensallel i naturlige insektpopulasjoner, så det er vanskelig å sammenligne estimer basert på likning 2 med virkelige allelfrekvenser. En studie gjort på den naturlige frekvensen av AChE-resistensallel i en *Culex quinquefasciatus*-populasjon (Diptera: Culicidae), viste at frekvensen av resistensallelet var 0,01 (Yebakima et al. 2004). Dette er en like høy naturlig R-allelfrekvens som de aller høyeste estimatene basert på mutasjon-seleksjonslikevekten har gitt. En forklaring til den relativt høye R-allelfrekvensen kan være at genflyt fra andre populasjoner har påvirket den naturlige allelfrekvensen, noe som mutasjon-seleksjonslikevekten ser bort ifra.

2.3.2 Seleksjonstrykket

Naturlig seleksjon er definert som differensiell overlevelse av fenotyper mellom generasjoner (Halliburton 2004). Individene med best fitness, det vil si best evne til å overleve og reproducere i et gitt miljø, vil relativt sett overføre flere gener til neste generasjon i forhold til individer med lavere fitness. Insektmiddelresistente insekt kan derfor øke i frekvens i populasjoner under seleksjonspress fra insektmidler. Seleksjonstrykket fra insektmidler kan spenne fra nesten ubetydelig til meget høyt. Ved svært lavt seleksjonstrykk vil resistente insekt kun ha marginalt bedre overlevelse og reproduksjon enn ikke-resistente insekt. Ved svært høyt seleksjonstrykk kan resistente insekter være de eneste individene i populasjonen som overlever til reproduksjonsalder. Det er allikevel ingen automatikk i at høyt seleksjonstrykk fra insektmidler medfører økt frekvens av resistensgen(er) i en populasjon. Selv når en resistensmutasjon oppstår i en insektpopulasjon under seleksjonstrykk fra insektmidler, er sannsynligheten relativt høy for at R-allelet går tapt fra populasjonen på grunn av genetisk drift. Kimura (1962) kom frem til et generelt uttrykk for sannsynligheten for fiksering/tap av fordelaktige mutasjoner som følge av genetisk drift:

$$(3) \text{ Sannsynlighet for tap av et fordelaktig allel} = 1 - \text{Pr}(\text{fiksering}) \cong 1 - \left(\frac{1 - e^{-2s}}{1 - e^{-4Ns}} \right)$$

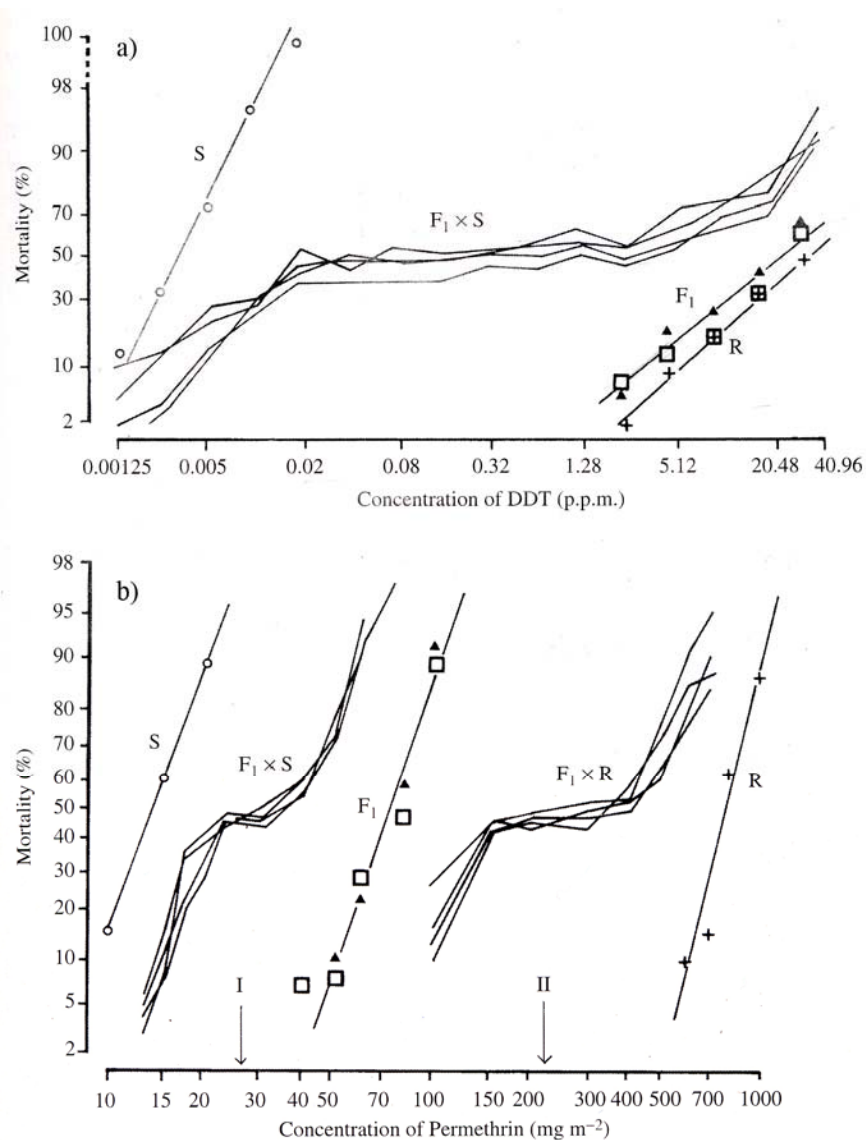
N er her populasjonsstørrelsen og s er seleksjonsfaktoren, definert som >0 for fordelaktige allel. I følge likningen 3 vil for eksempel et allel som gir bæreren 10 % bedre sjanse til å overleve og reproducere i forhold til andre insekt, allikevel ha ca. 80 % sannsynlighet for å gå tapt fra populasjonen ($N=10^4$). Desto større den relative fordelingen ved å bære et resistensallel er (i.e. seleksjonstrykket), jo større sannsynlighet er det for at det nye resistensallelet blir beholdt i populasjonen og øker i frekvens.

Flere faktorer er med på å bestemme hvor kraftig seleksjonen for insektmiddelresistens er, blant annet insektmiddelkonsentrasjonen (g/m^2) det sprøytes med, hvor ofte sprøytingen foregår og hvilket insektstadium som er eksponert for insektmiddelet. Myggens atferd er en annen faktor som kan ha innvirkning på seleksjonstrykket fra insektmidler. Summen av alle faktorene med innvirkning på seleksjonen for resistens definerer det totale seleksjonstrykket insektpopulasjoner opplever.

Dominansnivået

For å forstå hvordan konsentrasjonen av insektmiddelet det sprøytes med kan ha innvirkning på seleksjonen for insektmiddelresistens, må man se nærmere på dominansbegrepet. Hvis heterozygot (SR) er fenotypisk nærmere homozygot ikke-resistente (SS), beskrives resistensen som ressesiv. Hvis heterozygot (SR) er fenotypisk nærmere homozygot resistente (RR), kalles resistensen dominant. Det er store forskjeller i dominansnivået til R-allel i insekt, alt fra fullstendig ressesivitet til fullstendig dominans (Bourguet og Raymond 1998; Bourguet et al. 2000). Dominansnivået påvirker evolusjonen av resistente populasjoner fordi dominansnivået har innvirkning på andelen av S-allel som beholdes i en populasjon under seleksjonspress fra insektmidler. Et DDT-resistensallel i myggen *C. quinquefasciatus* er et eksempel på høy dominans (Fig. 1a). Selv ved høye insektmiddelkonsentrasjoner vil S-allelet bli opprettholdt i populasjonen i heterozygot (SR) individer. Høyt dominansnivå vil derfor sikre en relativt høy frekvens av S-allel, selv ved intensivt seleksjonstrykk. Høy S-frekvens øker sannsynligheten for at to tilfeldige individer parer og får ikke-resistent avkom. Opprettholdelse av S-allel forsinker derfor resistensevolusjonen i populasjonen. For ett tilfelle av PY-resistens i myggarten *Ae. aegypti* er situasjonen litt annerledes (Fig. 1b). For denne typen insektmiddelresistens er dominansnivået nær 0,5, det vil si at SR-fenotypen ligger mellom homozygot resistente og homozygot ikke-resistente i forhold til insektmiddeltoleransen. Ved høye insektmiddelkonsentrasjoner, i dette eksempelet konsentrasjoner mellom 700 og 1000 mg/m^2 , vil kun RR-individer overleve (Fig. 1b). Lav

dominans vil ved høye insektmiddelkonsentrasjoner føre til rask evolusjon av resistente populasjoner, uten at S-allel blir beholdt i populasjonen.



Figur 1. Insektmiddelresistens basert på et enkelt gen i mygg. a) DDT resistens i *Culex quinquefasciatus* der resistensallelet er nesten fullstendig dominant. b) Pyretroidresistens i *Aedes aegypti* der resistensallelet er delvis dominant (Fra Wood og Bishop 1981). S = ikke-resistent homozygot; R = resistent homozygot; F₁ = heterozygot; F₁ × S = tilbakekrysning mellom F₁ og S; F₁ × R = tilbakekrysning mellom F₁ og R

Dominansnivået kan også ha innvirkning på reversevolusjon, det vil si evolusjon tilbake til en insektmiddelfølsom populasjon. Hvis dominansnivået er høyt vil S-allelfrekvensen forbli høy selv under sterkt seleksjonspress. En populasjon med høy frekvens av S-allel vil relativt raskt kunne øke frekvensen av ikke-resistente individ (SS-individ) når seleksjonspresset fra insektmidler opphører. Dette forutsetter at R-allelet har negativ effekt på overlevelse og

reproduksjon i insektmiddelfrie miljø, noe som er tilfellet for enkelte R-allel (Se kapittel om pleiotrofiske effekter og fitnesskostnader for diskusjon).

Hyppighet av sprøyting

Det er ofte sesongmessige fluktuasjoner i populasjonstettheten til insekter. Dette fører til sesongmessige svingninger i bruk av insektmidler, og dermed også svingninger i seleksjonstrykket. Variasjoner i seleksjonstrykket kan føre til endringer i resistensnivået til insektpopulasjoner. Ett godt eksempel på dette har vi fra malariamygg i Vest-Afrika. I Burkina Faso observerte Diabate et al. (2002) en klar korrelasjon mellom resistensnivå for PY-resistente *An. gambiae*-populasjoner og intensiteten i bruken av PY-midler i bomullsplantasjer. I de tørreste månedene fra januar til juni hadde myggpopulasjonene ca. 100 % mortalitet etter eksponering for 1 % permethrin. Da regntiden startet, og bøndene økte insektmiddelbruken, sank mottageligheten for insektmiddelet drastisk i løpet av perioden juli-september. I september gav 1 % permethrin kun litt over 60 % mortalitet for de samme *An. gambiae*-populasjonene. En studie på jordbruksskadeinsektet *My. persicae* påviste også liknende fluktuasjoner i frekvensen av resistensallel. Kdr-allelfrekvensen økte igjennom vinteren og våren på grunn av at det ble sprøytet intensivt med pyretroidmiddel i denne perioden (Guillemaud et al. 2003).

Differensielt seleksjonstrykk mot ulike kjønn og insektstadier

Det er en essensiell forskjell mellom insektmiddelkontroll av skadedyr i jordbruket og kontroll av malariamygg. Insekt er skadedyr i kraft av at insektene har hele/deler av sin livssyklus på jordbruksplantene. Når det sprøytes mot skadeinsekt, vil seleksjonspresset fra insektmiddelet ofte være likt fordelt på kjønn. I motsetning, er mange malariakontrolltiltak, som for eksempel IRS eller ITNs, kun rettet mot voksne hunnmygg som oppsøker hus på leting etter et blodmåltid. Hannmygg som bruker plantesafter som næring og hunnmygg som biter vertene utendørs, vil dermed ha lav eksponering for insektmidlene. IRS og ITNs medfører derfor et differensielt seleksjonstrykk og dette bremser evolusjonen av resistente populasjoner fordi fordelene ved å ha et resistensgen ikke gjelder for hele populasjonen.

I tillegg til IRS og ITNs, baseres vektorkontroll flere steder på insektmidler rettet mot larvestadiet (Mulla et al. 2004; Zhang et al. 2004). Seleksjonstrykket fra insektmidlene er da høyt for begge kjønn. Dette øker sannsynligheten for at tilfeldige individ som parer får avkom med R-allel, i forhold til hvis kontrolltiltak kun er rettet mot voksne hunnmygg. Teoretisk sett

vil derfor høy insektmiddeleksponering på larvestadiet føre til raskere utvikling av resistente insektpopulasjoner, enn ved bruk av IRS og ITNs.

Seleksjonspress fra insektmidler mot ett myggstadium trenger ikke nødvendigvis å medføre økt frekvens av resistente individ i andre insektstadier. Enkelte resistensmekanismer er nemlig spesifikke for larve- eller imagostadiet. Kumar et al. (2004) konstatere 60 ganger økning i PY-toleranse for *An. stephensi*-larver etter kunstig seleksjon på larvestadiet med deltametrin i 40 generasjoner. Imago som ble klekt fra de resistente larvene viste derimot ingen økning i toleransen for deltametrin. Det er også observert imagospesifikk oxygenasebasert PY-resistens i *An. gambiae* (Nikou et al. 2003).

Anopheles-populasjoner kan også være eksponert for insektmidler som ikke primært er rettet mot vektorinsekt. Mange landbruksarealer, for eksempel fruktplantasjer, bomullsplantasjer og rismarker, inkorporerer habitat for både mygglarver og imago (Chareonviriyaphap et al. 1999; Diabate et al. 2002; Yawson et al. 2004). Insektmidler fra jordbruket utgjør derfor mange steder et seleksjonstrykk på *Anopheles*-populasjoner (Georghiou 1990). Seleksjonstrykket kan gjelde for voksne mygg når de forflytter seg rundt i de sprøytede områdene og/eller for larvestadiet på grunn av direkte kontaminasjon av larvehabitater eller avrenning til larvehabitater. Denne problemstillingen blir diskutert i mer detalj i andre del av oppgaven.

Atferd

Atferden til insektene kan påvirke resistensevolusjonen i begge retninger, både til raskere og tregere resistensutvikling. Hvis atferden til en insektart medfører spesielt høy grad av insektmiddeleksponering, vil relativt sett flere ikke-resistente individer dø, enn hvis atferden tilsier lavere grad av eksponering. Dette kan føre til hurtig utradering av ikke-resistente individer fra populasjonen, og dermed en rask resistensevolusjon. Hvis motsatte er tilfelle, og ikke-resistente mygg unngår eksponering for insektmidler, vil resistensevolusjonen gå tregere.

Malariamyggeatferden kan deles i klasser i forhold til hvor myggene søker etter vertsdyr og hvor myggene hviler etter blodmåltidet. Malariamygg klassifiseres som endofage eller eksofage i forhold til om myggene beveger seg inn i hus eller ikke, i søken etter blod (Service 2000). Etter blodmåltidet må myggen hvile og fordøye blodet. Endofile mygg prefererer innendørs hvilehabitat, mens eksofile mygg foretrekker å fordøye blodet utendørs (Service 2000). Der vektorkontroll baseres på IRS og/eller ITNs, vil myggpopulasjoner som har

endofag og endofil atferd eksponeres mer for insektmidler enn populasjoner av arter med mindre grad av endofag/endofil atferd.

Insektmidlene kan også ha innvirkning på myggens atferd fordi noen insektmidler har repellerende effekt på insekt. Slik repelleffekt er påvist for flere insektmidler på ulike myggarter (Sungvornyothin et al. 2001; Takken 2002; Kongmee et al. 2004; Pates og Curtis 2005). Enkelte studier har til og med rapportert om skifte i atferd for hele populasjoner. I Thailand har det blitt observert at *An. minimus*-populasjoner endret bitemønster etter en tid med insektmiddelsprøyting. Før DDT ble benyttet var *An. minimus*-populasjonene overveiende endofile og antropofile (i.e. prefererer å bite mennesker), men etter en tid med DDT-sprøyting av hus skiftet populasjonene til et overveiende zoofilt bitemønster (i.e. prefererer å bite dyr) (Nutsathapana et al. 1986). To studier fra Kenya har antydnet et skifte i bitetid assosiert med eksponering for pyretroidimpregnerte sengenett. Mathenge et al. (2001) observerte små, men statistisk signifikante forskjeller i bitetid mellom *An. gambiae*-populasjoner fra landsbyer med og uten ITNs. Det ble knyttet usikkerheter til hvorvidt de statistiske forskjellene i bitetid reflekterte en virkelig endring i bitetid. De signifikante endringene forfatterne fant i bitetid kan ha vært en konsekvens av små naturlige variasjoner i bitetid og at svært store prøvestørrelser gjorde de små forskjellene statistisk signifikante (Mathenge et al. 2001). Mbogo et al. (1996) observerte også et atferdsskifte mot tidligere biting for *An. gambiae* s. l. assosiert med bruk av PY-impregnerte sengenett, men også i dette studiet er det knyttet usikkerheter til resultatene. I dette studiet mistenkte forfatterne at variasjoner i sammensetningen av søskenarter mellom de ulike studieområdene kan ha forårsaket forandringene i bitetid (Mbogo et al. 1996).

Reppelleffekt kan få konsekvenser for både resistensevolusjon og malariakontroll. Hvis repelleffekten fører til at ikke-resistente mygg unngår sprøytete arealer, vil seleksjonen for insektmiddelresistens være svak. Ett studium fra Afrika støtter opp om en slik effekt. I en landsby med PY-impregnerte sengenett, observerte Corbel et al. (2004) ingen forskjeller i mortalitet mellom resistente og ikke-resistente genotyper i en *An. gambiae*-populasjon. Disse resultatene ble tolket som at repelleffekten medførte at ikke-resistente insekter i stor grad unngikk sengenettene. Resistente mygg hadde dermed ingen fordeler ovenfor ikke-resistente mygg og det ble derfor ikke selektert for insektmiddelresistens. I forhold til malariakontroll kan en repelleffekt være negativ, selv om den hindrer resistensseleksjon. Dersom mygg

unngår sprøytede arealer kan det føre til svikt i sykdomskontrollen fordi insektpopulasjonen ikke blir holdt lav nok til å begrense sykdomsoverføringen tilstrekkelig.

2.3.3 Genflyts konservative og kreative innvirkning på evolusjonen

Genflyt kan ha stor effekt på resistensevolusjon på to komplementære måter: (1) genflyt kan virke konservativt ved å begrense lokal tilpasning (2) genflyt kan virke som en kreativ evolusjonær prosess som sprer nye gener til populasjoner (Lenormand et al. 1998). I et åpent økosystem vil det ofte finnes populasjoner både med og uten seleksjonspress fra insektmiddel. Genflyt virker konservativt når prosessen fører til tilførsel av S-allel til populasjoner under seleksjonspress fra insektmiddel, og dermed bremser resistensutviklingen (Lenormand et al. 1999). Flere studier forklarer lavt resistensnivå i insektpopulasjoner som er under hardt seleksjonstrykk med høy genflyt fra usprøytede områder (Raymond og Marquine 1994; Torres-Vila et al. 2002). Denne effekten er spesielt sterk hvis seleksjonstrykket fra insektmiddel er heterogent, både i tid og rom (Torres-Vila et al. 2002). Andre studier har sammenlignet resistensutvikling i isolerte populasjoner (f.eks. drivhus) med mindre isolerte populasjoner. I mange tilfeller går resistensevolusjonen raskere, og populasjonene får et høyere resistensnivå i de isolerte populasjonene der genflyt ikke har en innvirkning (Roush og Daly 1990; Horowitz et al. 1999).

Genflyt bidrar også til at R-allel blir spredt til nye, ikke-resistente populasjoner. Genflyts betydning i spredningen av R-allel til nye populasjoner varierer mellom geografiske lokaliteter og arter, og bestemmes av insektenes spredningsevne, distanse mellom populasjonene og populasjonsstørrelse (Roush og McKenzie 1987). Et ekstremt eksempel på spredningspotensialet genflyt gir, finner vi i myggen *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). DNA-sekvenser assosiert med ett resistensgen i *C. pipiens* er fullstendig identiske, uavhengig av de resistente populasjonenes geografiske opprinnelse. Det kan derfor tyde på at denne resistensmutasjonen har oppstått kun én gang, og har deretter spredt seg til nye populasjoner over hele verden (French-Constant et al. 2004). Brogdon et al. (1988) sitt studium på *An. albimanus* fra Guatemala står i sterk kontrast til eksempelet med *C. pipiens*. Innen et område på få kvadratkilometer var det store variasjoner i resistensmekanismer mellom *An. albimanus*-populasjonene. Disse resultatene antyder at genflyt hadde minimal innvirkning på resistensevolusjonen og at insektmiddelresistensen hadde oppstått i flere myggpopulasjoner uavhengig av hverandre.

2.3.4 Pleiotrofiske effekter og fitnesskostnader

Pleiotrofiske allel er allel med innvirkning på flere egenskaper (Griffiths et al. 2002). Resistensallel har primært innvirkning på insektmiddelresistens, men kan også ha pleiotrofiske effekter på for eksempel levedyktighet, reproduksjonspotensial og atferdsmessige trekk. Pleiotrofiske effekter fra insektmiddelresistens kan derfor ha innvirkning på resistensdynamikken. Når en insektpopulasjon kontrolleres med insektmidler, vil egenskapene det selekteres for være mer eller mindre uavhengig av fertilitet, evnen til å finne en make eller evnen til å unngå predatorer. Andelen resistente individer i en populasjon vil kunne øke, til tross for at de resistente insektene for eksempel produserer færre egg eller har betydelig kortere levetid enn ikke-resistente insekt.

Forskjellen i fitness mellom et resistant insekt og et ikke-resistent insekt i et insektmiddelfritt miljø, representerer fitnesskostnaden til insektmiddelresistensen. Flere studier har indirekte påvist fitnesskostnader assosiert med insektmiddelresistens, ved å observere at resistensnivået i insektpopulasjoner synker dersom seleksjonspresset fra insektmidler fjernes (Mohan og Gujar 2002; Foster et al. 2002; Guillemaud et al. 2003; Janmaat og Myers 2003). Relativt få empiriske studier har derimot kunnet påvise en direkte sammenheng mellom fitnesskostnader og insektmiddelresistens hos insekter (Foster et al. 2003). Det finnes imidlertid noen studier hvor fitnesskostnader ved resistens er påvist. Nedsatt fekunditet og overlevelse er påvist i en OP-resistent *Choristoneura rosaceana*-populasjon (Lepidoptera: Tortricidae) og en Bt-resistent *Trichoplusia ni*-populasjon (Lepidoptera: Noctuidae) (Carrière et al. 1994; Janmaat og Myers 2003). For *My. persicae* og *Mu. domestica* er det vist at viktige atferdsmønstre forandres hos individ med kdr-mutasjon. Resistente *My. persicae* viste svekket respons for alarmferomon (Foster et al. 1999) og avvikende temperaturrespons (Foster et al. 1997). Dette kan påføre resistente individ betydelige fitnesskostnader ved at predasjonsmortalitet øker og ved at mortalitet øker i de kaldeste månedene (Foster et al. 1997; Foster et al. 1999). For *Mu. domestica* gav kdr-mutasjonen endringer i temperaturrespons som også sannsynligvis utgjør en betydelig fitnesskostnad i naturen (Foster et al. 2003).

Når det gjelder malariavektorer foreligger det to studier av Rowland (1991a, b) som antyder fitnesskostnader ved insektmiddelresistens i *An. gambiae*- og *An. stephensi*-populasjoner. Homozygot for γ HCH/dieldrin-resistens la lavest antall egg, hadde dårligst reaksjon på eggleggingsstimuli og viste redusert fluktnespons ved simulert predatortrussel (Rowland

1991a). I tillegg støtter data fra eksperimenter på paringskonkurranse opp om fitnesskostnader ved γ HCH/dieldrin-resistens (Rowland 1991b). To studier på en annen mygg, *C. pipiens*, har også påvist fitnesskostnader ved insektmiddelresistens. Et studium viste at ikke-resistente *C. pipiens* hanner hadde en fordel i paringskonkurranse i forhold til OP-resistente hanner (Berticat et al. 2002). Et annet studie av Berticat et al. (2004) observerte økt predasjonsrisiko for både OP-resistente (esterasebasert) og AChE-resistente *C. pipiens*-larver og -imago i predasjonseksperimenter med flere ulike naturlige predatorer.

Ulike resistensmutasjoner representerer forskjellige biokjemiske forandringer i insektene, og har derfor ulik effekt på resistente insekters fitness i miljø uten insektmidler (Guillemaud et al. 1998). For eksempel er esterasebasert resistens kjent for å gi generelt høye fitnesskostnader i forhold til andre avgiftningsmekanismer (Roush og Daly 1990). På grunn av at resistensmekanismer gir ulike fitnesskostnader, vil mekanismen(e) som ligger til grunn for populasjonens insektmiddelresistens påvirke hvordan frekvensen av R-allel endres i perioder uten seleksjonspress fra insektmidler. Hvor raskt og hvor mye R-allelfrekvensen synker avhenger av størrelsen til fitnesskostnadene, forutsatt at det finnes reproduserende ikke-resistente insekt i populasjonen (Janmaat og Myers 2003). Effekten av fitnessforskjeller på resistensdynamikken i naturen er vanskelig å vurdere ut ifra laboratorieforsøk, men ved å analysere endringer i R-allelfrekvens over tid i naturlige populasjoner kan man indirekte måle effekten av fitnesskostnadene (Lenormand et al. 1999). Nedgang i R-allelfrekvens i sesonger uten seleksjonspress fra insektmidler er observert for flere jordbrukspestpopulasjoner (Foster et al. 2002; Guillemaud et al. 2003) og for populasjoner av myggen *C. pipiens* (Lenormand et al. 1999). Dette tyder på at fitnesskostnader kan spille en viktig rolle i resistensdynamikken i naturen. Dessverre er ingen slike feltstudier blitt gjort på malariavektorer.

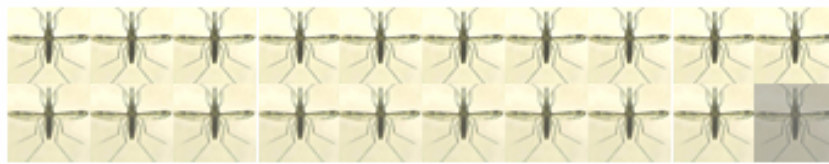
Selv om en reversevolusjon er vanlig i perioder uten seleksjonspress (f.eks. Foster et al. 2002), har flere studier påvist at noen resistente insektpopulasjoner opprettholder frekvensen av R-allel i insektmiddelfrie miljø. Dette kan skje på fire måter: (1) resistensmutasjonen gir økt fitness eller ingen fitnesskostnader (2) R-allelet er assosiert med en kromosominversjon (3) Det oppstår et modifikasjonsgen som demper fitnesskostnadene (4) Det opprinnelige R-allelet blir erstattet med et mindre kostbart R-allel. Eksempel på at insektmiddelresistens kan gi økt fitness har vi i populasjoner av *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Arnaud et al. (2002) og Arnaud og Haubruge (2002) forklarte den stabile opprettholdelsen av dieldrinresistens i *T. castaneum*-populasjoner med økt fertilitet hos insektmiddelresistente

hunner og økt reproduktiv suksess hos resistente hanner. To studier (Brooke et al. 2000, 2002) støtter opp om at kromosominversjoner var ansvarlig for opprettholdelsen av dieldrin- og DDT-resistens i *An. gambiae*-populasjoner. Bevaringen av dieldrinresistens i populasjonen skjedde tross for at denne resistensmekanismen er kjent for å gi fitnesskostnader for *An. gambiae* (Rowland 1991a, b). Opprettholdelse av et R-allel innenfor en inversjon i en populasjon kan forekomme fordi kromosominversjoner undertrykker rekombinasjon av gener innenfor inversjonen, dersom heterozygote for inversjonen har større fitness enn begge homozygotene (Halliburton 2004). Fra studier av *C. pipiens* har vi sterke indikasjoner på at resistensmekanismer med høy fitnesskostnad er beholdt i myggpopulasjoner, både ved at det oppstår modifikasjonsgener og erstatning av fitness-kostbare R-allel med mindre kostbare, nye R-allel (Guillemaud et al. 1998; Raymond et al. 2001).

2.3.5 Generasjonstiden og fertilitetens innvirkning på resistensdynamikk

Generasjonstid og fertilitet påvirker resistensdynamikken i insektpopulasjoner fordi disse faktorene har innvirkning på hvor raskt insektpopulasjoner kan øke R-allelfrekvensen. Sprøyting mot jordbruksskadeinsekt foregår ofte ved intensiv sprøyting i de periodene med størst fare for avlingsskade (Guillemaud et al. 2003). I periodene med intensiv sprøyting kan insektpopulasjoner med kort generasjonstid ha flere generasjoner under seleksjonspress fra insektmidler, i forhold til populasjoner med lengre generasjonstid (Fig. 2). Kortere generasjonstid vil derfor kunne føre til raskere økning i R-allelfrekvensen. Under konstant seleksjonspress fra insektmidler, for eksempel ved eksponering for IRS eller ITNs, vil insektenes generasjonstid spille liten rolle for resistensdynamikken på lenger sikt. Malariamygg med habitat i landbruksområder vil derimot kunne påvirkes av intensive sprøyteperioder, og generasjonstiden kan derfor spille en rolle i resistensdynamikken til *Anopheles*-populasjoner. Generasjonstidens innvirkning på resistensdynamikken vil virke motsatt i perioder uten seleksjon fra insektmidler, forutsatt at R-allel gir fitnesskostnader og at det finnes individer med S-allel i populasjonen. Kortere generasjonstid reduserer tiden det tar før frekvensen av resistente individer i populasjonen senkes.

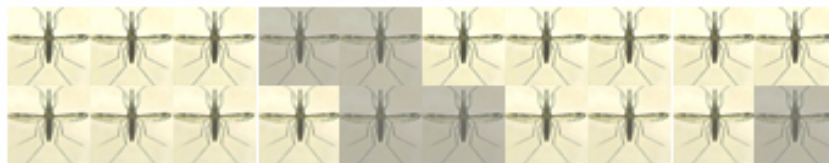
Fertiliteten spiller også en rolle i resistensdynamikken. Man kan tenke seg at en insektpopulasjon etter en periode med intensiv sprøyting, består av få, resistente insekt. Dersom denne insektarten har høy fertilitet vil de resistente individene relativt raskt bygge opp igjen en stor resistent populasjon.



Generasjon 1:
5 % av individene i
populasjonen er resistente
før sprøyting.



Sprøyting:
80 % virkning.



Generasjon 2:
25 % av individene er
resistente.



Sprøyting:
60 % virkning.



Generasjon 3:
60 % av individene er
resistente.



Sprøyting:
30 % virkning.



Generasjon 4:
90 % av individene er
resistente

Figur 2. Hypotetisk utvikling av en resistent myggpopulasjon. Lengre generasjonstid med identisk sprøyteregime vil medføre at en mindre del av populasjonen er resistent etter siste sprøyting. Lyse individ = ikke-resistente; mørke individ = resistente. Kortere generasjonstid gir raskere utvikling av resistens, gitt identisk seleksjonstrykk fra insektmidlene. (Etter Johansen 2002).

2.3.6 Genetisk drift og ”founder effekt”

Menneskepåvirket spredning kan i enkelte tilfeller være av stor betydning for evolusjon av insektmiddelresistente populasjoner. Globaliseringen av handel øker sjansen for at insektarter spres med transport. Individ fra insektmiddelresistente populasjoner kan følge med matvaretransport, plantehandel eller annen last, og på denne måten spre seg over enorme distanser (Forcioli et al. 2002).

Insekter spredt av menneskelig aktivitet representerer et tilfeldig utvalg av gener fra populasjonen de stammer fra. Hvis noen få insekt blir spredt med transport og klarer å etablere seg i et nytt habitat, kan det oppstå en ”founder effekt”. Founder effekt er et resultat av at en populasjons genetiske variasjon er basert på allel fra få individer (Futuyma 1998). I en situasjon der en nyoppstått populasjon hovedsaklig består av insektmiddelresistente individer som en følge av en founder effekt, vil bruk av insektmidler mot denne populasjonen raskt føre til en svært resistent populasjon.

Hvis en founder effekt i forhold til insektmiddelresistens oppstår i populasjoner av eksotiske insektarter eller drivhusarter, blir situasjonen spesielt komplisert. Det finnes da ikke andre populasjoner med ikke-resistente individ som kan immigrere, og tilføre S-allel til den nyoppståtte resistente insektpopulasjonen. Et eksempel på dette kan hentes fra norske drivhus. I 1997 ble multiresistente individer av *Bernisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) importert til Norge med planter. Deretter spredte den multiresistente *B. tabaci* seg til julestjernegartnerier over hele landet via plantesalg. Denne episoden førte til bekjempelsesproblemer og store økonomiske tap (Personlig meddelelse Nina Johansen, Planteforsk, Ås, Norge).

2.3.7 Oppsummering

De fire evolusjonskreftene, mutasjon, seleksjon, genflyt og genetisk drift, styrer evolusjonen av resistente insektpopulasjoner. Mutasjoner er spontane hendelser. Hvor ofte mutasjoner oppstår, mutasjonsratene, varierer mellom forskjellige resistensmutasjoner, men er upåvirket av endringene i miljøparametrene. Seleksjon, genflyt og genetisk drifts relative betydning på evolusjonen av resistente populasjoner påvirkes både av insektets biologi og miljøet insektpopulasjonene lever i, som er i konstant endring. Hvert eneste tilfelle av resistensutvikling i naturen vil derfor være unikt, og være avhengig av en mengde faktorer. På

grunn av at evolusjon av resistente insektpopulasjoner er produktet av komplekse samspill mellom biotiske og abiotiske faktorer, er det vanskelig å spå hvordan de dynamiske evolusjonsprosessene vil styre resistensutviklingen i en insektpopulasjon. Men på tross av kompleksiteten og variabiliteten i resistensevolusjonsprosessen, er det mulig å finne frem til generelle prinsipper som er gjeldene for utviklingen av alle resistente insektpopulasjoner (Tabell 3).

Tabell 3. Faktorer med innvirkning på resistensdynamikken i en insektpopulasjon kan deles inn i fire hovedgrupper: genetiske-, biologiske-, økologiske- og insektmiddelfaktorer.

Hovedgrupper	Faktorer	Effekt
Genetiske	Dominansnivå	Høy dominans gir rask utvikling av en resistent populasjon, men opprettholder også S-allel i populasjonen.
	Fitnesskostnader	Kan motvirke utviklingen av resistens i fravær av seleksjonspress fra insektmidler.
	Naturlig R-allelfrekvens	Høy frekvens av et R-allel gir raskere utvikling av resistente populasjoner dersom seleksjonstrykk fra insektmidler oppstår.
	Mutasjonsrater	Mutasjonsrater varierer mellom resistensmekanismer og mellom arter. Høye mutasjonsrater for en resistensmutasjon øker sannsynligheten for at en populasjon utvikler resistens.
Biologiske	Generasjonstid	Kort generasjonstid kan føre til rask evolusjon av resistente populasjoner.
	Fertilitet	Høy fertilitet gir muligheter for rask oppblomstring av resistente populasjoner.
	Atferd	Insektets atferd kan ha innvirkning på eksponeringen for et insektmiddel. Atferd som fører til økt eksponering, fører til raskere evolusjon av resistente populasjoner.
Økologiske	Naturlige populasjoner	Populasjoner uten seleksjonspress fra insektmidler kan bidra til å forsinke resistensutviklingen, ved at S-allel tilføres ved genflyt til populasjoner under seleksjonstrykk fra insektmidler.
	Naturlige fiender	Naturlige fiender kan være med på å dempe resistensutviklingen ved en motseleksjon mot resistente individer, gitt at resistente insekt er enklere bytter enn ikke-resistente insekt.
Insektmiddel	Konsentrasjonen	Insektmiddelkonsentrasjon er med på å bestemme hvilke fenotyper det selekteres for. Dominansnivået vil påvirke frekvensen av de ulike genotypene i populasjonen.
	Sprøytehyppighet	Hyppigheten av sprøytingen kan gi variasjoner i resistensnivå.
	Differensielt seleksjonstrykk	Insektmiddelbruk rettet mot begge kjønn øker sannsynligheten for evolusjon av resistente populasjoner i forhold til IRS eller ITNs.
	Reppelleffekt	Reppelleffekt kan virke dempende på resistensevolusjon.

3. Indikasjon på seleksjon for insektmiddelresistente *Anopheles*-populasjoner (Diptera: Culicidae) i et område med sitrusplantasjer i Nord-Thailand

3.1 Sammendrag

Tre thailandske malariavektorer, *An. minimus* A., *An. maculatus* s. s. og *An. sawadwongporni*, ble evaluert for resistens mot insektmidlene methyl parathion og cypermethrin, som benyttes i sitrusplantasjer. Mygg fra to populasjoner ble samlet inn for hver art. Populasjonene representerte mygg fra jordbruksområder med høyt og lavt seleksjonspress fra jordbruksinsektmidler, hhv sitrusplantasjer (HØY) og selvbergingslandbruk (LAV). CDC-bottle bioassay metoden ble brukt til resistenstesting. *An. maculatus* og *An. sawadwongporni* fra både LAV- og HØY-lokaliteten viste redusert følsomhet for methyl parathion. For å teste forskjeller i responsen til methyl parathion mellom HØY- og LAV-populasjonene ble lethal time ratios (LTR) for LT_{50} og LT_{90} estimert. Probitanalyse tilpasset innbyrdes forbundne data ble brukt til å estimere LT_{50} - og LT_{90} -verdiene. LTR-estimatene gav signifikante forskjeller mellom *An. maculatus* HØY- og LAV-populasjonene. Både CDC-bottle bioassay og LTR-estimatene støttet opp om at populasjonene av *An. maculatus* og *An. sawadwongporni* fra HØY-lokaliteten er mer resistente for methyl parathion enn populasjonene fra LAV-lokaliteten. Dette kan være en indikasjon på at bruken av insektmidler i sitrusplantasjene utgjør en fare for resistensutvikling i *Anopheles*-populasjoner.

3.2 Introduksjon

Listen over insekt og midd resistente mot ett eller flere insektmiddel inneholder mer enn 500 arter (Mota-Sanchez et al. 2002). Skadedyr på kulturplanter utgjør ca. 60 % av resistenstilfellene, mens insekt med medisinsk eller veterinær betydning utgjør de resterende 40 % av resistente artropoder (WHO 1992). I et globalt perspektiv er *Anopheles*-mygg, vektorene av malaria, den viktigste gruppen insekt-sykdomsvektorer. Per februar 2005 inkluderte databasen over pesticidresistente artropoder ved Center for Integrated Plant Studies, Michigan State University, 63 arter malariamygge som har utviklet resistens for ett eller flere insektmidler (Center for Integrated Plant Studies 2005). Vektorkontroll basert på bruk av insektmidler er en viktig del av malariakontrollen i malariaendemiske områder (WHO 2005) og insektmiddelresistens er derfor en seriøs trussel mot malariakontroll (Greenwood og Mutabingwa 2002; Hemingway et al. 2002).

I Thailand startet kontrollen av malariamygge med insektmidler i 1949, og frem til 1995 var myggkontrollen hovedsakelig basert på DDT (Chareonviriyaphap et al. 1999). I tillegg ble det brukt store mengder DDT i landbruket frem til 1983 (Chareonviriyaphap et al. 1999). Flere myggarter (Diptera: Culicidae) med medisinsk betydning i Thailand, blant annet *C. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* og *An. annularis* utviklet resistens mot DDT (Prapanthadara et al. 2000; Somboon et al. 2003). I dag brukes syntetiske pyretroidmidler i malariakontroll, både til IRS og ITNs (Chareonviriyaphap et al. 1999). Enkelte *Aedes*-arter har vist betydelig reduksjon i følsomhet for vektorkontrollmiddelet permethrin (Somboon et al. 2003), men ingen data støtter opp om lignende resistensevolusjon for pyretroider i thailandske *Anopheles*-populasjoner.

Evolusjon av insektmiddelresistens hos malariamygge settes oftest i sammenheng med seleksjonstrykk fra insektmidler brukt i vektorkontroll, men det har også vært en pågående diskusjon om hvilken rolle insektmidler fra jordbruket har i evolusjonen av resistente malariamyggepopulasjoner (Lines 1988). Flere eldre studier har påvist at insektmidler fra jordbruket kan ha en stor effekt på resistensseleksjon hos malariavektorer (Georghiou et al. 1971; Chapin og Wasserstrom 1981; Hemingway 1983; Brogdon et al. 1988), og nylig ble det påvist en korrelasjon mellom bruken av pyretroider i jordbruket og resistensnivå i *An. gambiae*-populasjoner i Vest-Afrika (Diabate et al. 2002). Dersom bøndene benytter andre insektmidler enn de som benyttes til vektorkontroll, utgjør jordbruksinsektmidler nødvendigvis ingen trussel i forhold til evolusjon av resistente *Anopheles*-populasjoner og svikt i malariakontrollen. Problemet er at mange insektmidler har identiske virkningssteder i insektene (Se kap. 2.2). I tillegg kan det også utvikles kryssresistens mellom insektmidler med ulike virkningssteder basert på avgiftningsmekanismer (Brogdon og Barber 1990; Bisset et al. 1997, 1998; Rodriguez et al. 2002). Jordbruksinsektmidler kan derfor potensielt selekttere for resistensmekanismer som også gir resistens mot vektorkontrollmidlene, selv om ulike insektmidler benyttes i jordbrukssektoren og vektorkontrollen.

Insektmiddelbruk rettet mot skadedyr i jordbruket i Thailand, vil kunne utgjøre et seleksjonstrykk på *Anopheles*-populasjoner fordi mange landbruksareal i Thailand inkorporerer malariavektorerers egg-, larve- og hvilehabitat (Chareonviriyaphap et al. 1999). Det har i de siste tiårene skjedd endringer i Thailands landbruksstruktur. Subsidierte småskalaproduksjonseenheter forvandles til høyprofittlandbruk (Rerkasem og Rerkasem 1995).

Samtidig blir områder med ris-, cassava-, kaffe- og pepperdyrking gjort om til frukthager (Jungbluth 1996). Parallelt med disse endringer i landbruket har også insektmiddelbruken endret seg. Importen av aktive ingredienser til Thailand for fabrikasjon av insektmiddel, er firedoblet fra 1982 til 2002 (IPM DANIDA 2003). Seleksjonstrykket fra jordbruksinsektmidler mot *Anopheles*-populasjoner i Thailand, har derfor også trolig økt de siste 20 årene, i takt med omstruktureringen av jordbruket.

Bruken av insektmidler i ulike jordbrukssektorer i Thailand varierer fra meget lavt i småskala landbruk, til ekstremt høyt i sitrusplantasjer (Thapinta og Hudak 2003). I en studie av landskapsstrukturens innvirkning på malariamyggutbredelse, fant Overgaard et al. (2003) en negativ korrelasjon mellom fruktplantasjeareal og tetthet av *Anopheles*-mygg i malariaendemiske områder i Nord-Thailand. Dette korresponderer med klasse 6 i klassifiseringen til Georghiou (1990) av indikasjoner på resistensseleksjonspress fra jordbruksinsektmidler. Ifølge Georghiou (1990) kan indikasjoner på resistensseleksjon fra jordbruksinsektmidler kategoriseres i seks klasser: (1) Resistens utvikles før insektmidler fra vektorkontroll blir brukt (2) Det er høyere resistens i jordbruksområder enn i andre områder (korrelasjon i rom) (3) Vektorresistens korresponderer til perioder med jordbrukssprøyting (korrelasjon i tid) (4) Korrelasjon mellom intensitet av insektmiddelbruk på avlinger og graden av resistens i vektorpopulasjoner (5) Samsvar mellom vektorens kryssresistensspektrum og insektmiddel som brukes i jordbruket (6) Temporært lavere myggtetthet etter sprøyting med jordbruksinsektmidler.

Dette studiet hadde som mål å teste om bruken av insektmidler i sitrusplantasjer selekterer for insektmiddelresistens i *Anopheles*-populasjoner i Nord-Thailand. Hypotesen var at seleksjonen for insektmiddelresistens er sterk for malariavektorer i jordbruksøkosystem med sitrusplantasjer. Hvis dette var tilfellet ville: (1) *Anopheles*-populasjoner fra sitrusplantasjeområder ha lav følsomhet for de jordbruksinsektmidlene som ble brukt mot sitrusskadeinsekt og/eller (2) områder med sitrusplantasjer ha lavere *Anopheles*-tetthet enn jordbruksøkosystem med mindre intensiv bruk av insektmidler. Punkt (2) er allerede observert for *Anopheles*-populasjoner i studieområdet (Overgaard et al. 2003). I denne studien undersøkes tilstedeværelse av resistensseleksjon i områder med sitrusplantasjer ved å forsøke å demonstrere korrelasjon i rom, i henhold til klasse 2 i Georghiou's klassifisering. Dette ble gjort ved å sammenligne insektmiddelfølsomheten til populasjoner av malariavektorer fra to

forskjellige jordbruksøkosystem, ett jordbruksøkosystem dominert av sitrusplantasjer og ett jordbruksøkosystem dominert av selvbergingsjordbruk med meget lavt insektmiddelbruk.

3.3 Material og metode

3.3.1 Områdebeskrivelse

Studiet ble gjort i Chiang Mai provinsen, Chiang Dao distriktet (Lat N 19° 44', Long E 98° 54'), 2-3 km fra grensen til Myanmar (Fig. 3). Innsamling av mygg foregikk på to lokaliteter, begge landbrukslandskap ved foten av en større fjellkjede. Primær og sekundærskog dominerte vegetasjonen rundt begge jordbruksområdene. Innsamlingslokalitetene ble valgt på bakgrunn av bruken av insektmidler i jordbruket. Muang Na (HØY) representerte et jordbruksøkosystem med intensivt bruk av insektmidler, mens Huay Kiang (LAV) representerte et jordbruksøkosystem med meget begrenset insektmiddelbruk. LAV-lokaliteten var dessuten en del av et kongelig jordbruksprosjekt der begrensning av insektmiddelbruk er et prioritert satsningsområde. Innsamlingsområdene er >7 km fra hverandre, og atskilt av fjell. Muang Na består av flere små landsbyer med rundt 600 husstander totalt. Jordbruksmarker med ris, mais, sesam, grønnsaker og sitrusplantasjer preger landskapet rundt bebyggelsen. Huay Kiang er en liten landsby bestående av 28 husstander. Her dyrker de noe ris, mais, sesam og grønnsaker, men all jordbruk er selvbergingsjordbruk.



Figur 3. Kart over Thailand og lokaliteten til studieområdet i Chiang Mai provinsen, Chiang Dao distriktet.

3.3.2 Myggene

Artene som ble brukt i studiet var *An. minimus* underart A, *An. maculatus* sensu strictu Theobald og *An. sawadwongporni*. Myggene ble artsbestemt etter Rattanaarithikul og Panthusiri (1994) ved hjelp av en Olympus GSWH10x22 lupe. Disse artene ble benyttet på grunn av at de er de viktigste malariavektorene i studieområdet. *An. minimus* er antropofil og er en betydningsfull malariavektor i Thailand (Somboon et al. 1994; WHO 2003b). *An. maculatus* og *An. sawadwongporni* er primært zoofile og er derfor mindre viktige sykdomsvektorer (Somboon et al. 1994; WHO 2003b). Atferdsstudier tyder på at *An. minimus* og *An. maculatus* hovedsaklig er eksofile og eksofage (Torres et al. 1997; Chareonviriyaphap et al. 2003a; WHO 2003b; Trung et al. 2005). Alle artenes larvehabitater finnes i tilknytning til kantvegetasjon i rennende vann (Clements 1999; Overgaard et al. 2002), men *An. maculatus* og *An. sawadwongporni* kan også legge egg i stillestående dammer, myr og rismarker (Reid 1968; WHO 2003b).

3.3.3 Mygginnsamling

Innsamlings- og laboratoriemetodene som er beskrevet her er standardmetoder brukt av thailandske vektorkontrollmyndigheter (Offices of Vector-Borne Disease Control, Ministry of Public Health). Metodene er derfor etisk klarerte ifølge thailandsk standard, og risikoen for få malaria er minimal. I tilfelle personer som samlet inn mygg eller laboratoriumspersonalet skulle få malaria, tilbyr overnevnte myndigheter tilgang til rask behandling og pleie. Innsamling av mygg ble gjort to ganger, 28. mai-2. juni og 20-24. juni 2004, både ved ”human bait metode” og fra bøffel. Human bait innsamling ble gjort ved at to personer på hver innsamlingslokalitet satt med hud eksponert og fanget mygg som landet på benene. Myggen ble oppbevart over natten i plastkopper, og hadde tilgang på bomull fuktet med 10 % sukkerløsning. Dagen etter myggen ble fanget ble alle *Anopheles*-mygg skilt ut, og bestemt til art eller gruppe. Alle *An. minimus*, *An. maculatus* og *An. sawadwongporni* ble enten overført til 30x30x30 cm myggbur eller til nettingdekte plastkopper med innsiden kledd med papir. Myggen ble oppbevart på feltstasjonen mellom en og fire dager, avhengig av hvilken dag de ble fanget.

Det ble også samlet mygg fra bøffel på begge innsamlingslokalitetene. Fordelen med bøffelinnsamling er at det er mer effektivt enn human bait. Årsaken til at begge metodene ble

benyttet er at bøffelinnsamling ikke alltid er effektiv for *An. minimus*, som er mer antropofil enn *An. maculatus* og *An. sawadwongporni* (Somboon et al. 1994; WHO 2003b). Bøffelinnsamlingen ble gjort ved at et 20x2,5m hvitt nett ble strukket rundt en innhegning med bøfler. To til tre ganger per natt ble *Anopheles*-mygg som hvilte på nettet fanget med aspirator. Mygg samlet inn fra bøffelinnehegning ble oppbevart og identifisert på samme måte som mygg samlet inn med human bait metoden.

3.3.4 Oppformering til F1-generasjon

Etter endt innsamling ble myggene tatt med tilbake til Malaria Center i Chiang Mai. Myggene ble oppbevart i stabil temperatur (20°C) og luftfuktighet (80 % RH). En til tre dager etter endt innsamling, ble mygg som var samlet fra bøfler plassert i eggleggingskopper (7 mygg per kopp). Et 3-5 cm tykt lag bomull fuktet med vann dekket bunnen av eggleggingskoppene. Bomullen var dekket med filterpapir som myggene la eggene på. Mygg samlet inn fra mennesker var ikke blodfylte, og måtte bli føret med blod for å kunne legge egg. Føringen foregikk ved at myggen ble plassert i nettingdekkede plastkopper og føret med blod fra underarmen til en person. Blodförete mygg ble overført til eggleggingskopper 3-4 dager etter blodmåltidet. Egg ble skylt ut av eggleggingskoppen med vann, og over i et vannfylt plastkarr (35x20x5cm). Larver ble føret med oppmalt hundemat en gang per dag. Pupper ble overført med en plastikkpipette til en keramikk skål som ble satt i et insektsnett (30x30x30 cm) i et klimakontrollert rom (20°C, 80 % RH). F1-generasjon imago hadde tilgang på 10 % sukkerløsning fra og med klekking og frem til resistentestene.

3.3.5 CDC bottle-bioassay metode

Resistentesting av mygg ble gjort med Center of Disease Control (CDC) bottle-bioassay metoden som er basert på tid-mortalitetsanalyser (Brogdon og McAllister 1998b). Det ble testet for resistens mot methyl parathion (organofosfat) og cypermethrin (pyretroid), to vanlige insektmidler brukt i sitrusplantasjer i Nord-Thailand (Personlig meddelelse Hans Overgaard, International Water Management Institute (IMWI), Bangkok, Thailand). Insektmidlene ble valgt på bakgrunn av en spørreundersøkelse om thailandske bønders insektmiddelbruk (Overgaard 2004, upubliserte data). F1-mygg fra mai-innsamlingen ble testet for cypermethrinresistens, mens mygg fra juni-innsamlingen ble brukt til testene med methyl parathion. CDC bottle-bioassay ble benyttet fordi metoden er praktisk hvis man skal

gjøre resistenstester med insektmidler som ikke finnes på WHO-standardiserte insektmiddelimpregnerte papir.

En diagnostisk dose for hvert insektmiddel ble etablert på en ikke-resistent myggpopulasjon. Den diagnostiske dosen ble deretter brukt til å teste F1-generasjonen av mygg fra felt. Diagnostisk dose defineres som den laveste konsentrasjonen av et insektmiddel som på kortest tid gir 100 % mortalitet på ikke-resistente myggpopulasjoner. Tiden det tar for å oppnå 100 % mortalitet ved eksponering til diagnostisk dose kalles resistensterskel. CDC bottle-bioassay metoden antar at mygg som overlever denne resistensterskelen innehar egenskaper som gjør dem "resistente" for insektmidlene. Resistensbioassay gir grunnlag for sammenligninger av insektpopulasjoners følsomhet for insektmidler, men kan ikke si oss noe om hvorvidt forskjeller i insektmiddelfølsomhet er genetisk betinget. Siden ingen ikke-resistente laboratoriepopulasjoner av *An. maculatus* og *An. sawadwongporni* eksisterte, ble en ikke-resistent *An. minimus* Hang Dong stamme (F15-F70) brukt til å etablere diagnostisk dose. I følge Brogdon og McAllister (1998b) kan en diagnostisk dose brukes på myggarter fra samme slekt, men det er observert naturlige variasjoner i følsomhet for insektmidler (Chandre et al. 1999), så små forskjeller i mortalitet ved resistensterskelen må tolkes med varsomhet.

Insektmiddelstamløsninger ble brukt til impregnering av bioassay-flaskene. Stamløsningene ble laget slik at 10 µl stamløsning gav ønsket insektmiddelkonsentrasjon per flaske. Wheatonflasker (250 ml) ble brukt til etablering av diagnostisk dose og til resistenstestene. Impregneringen ble gjort ved at 10 µl stamløsning og 1 ml aceton ble tilsatt hver flaske. Flaskene ble vendt og rullet i 10 minutter med korken på. Korken ble så tatt av og flaskene rullet, til all aceton hadde fordampet. Impregnerte wheatonflasker stod 8-12 timer til tørking i et mørkt skap før de ble brukt. Toksisiteten av pyretroider er negativt korrelert med temperatur (Hodjati og Curtis 1999), og alle testene ble derfor gjort i et klimakontrollert rom (22-28° C) for å sikre pålitelige resultat.

Ikke-blodførete, en til syv dager gamle F1-hunnmygg ble brukt i bioassaytestene fordi toleransen for insektmidler er kjent for å kunne variere med alder og fysiologisk status (Lines og Nassor 1991). Myggene fikk ikke blod, kun 10 % sukkerløsning, i tidsrommet mellom klekking og resistenstestene. Fem wheatonflasker ble brukt til hver test, fire wheatonflasker impregnert med diskriminerende dose av et insektmiddel og en kontrollflaske impregnert med aceton. Myggene (15-25 per wheatonflaske) ble overført med aspirator til de

insektmiddelimpregnerte wheatonflaskene. Hvert tiende minutt ble enten antall ”døde” eller levende mygg talt opp. Myggene ble definert som døde hvis de ikke kunne fly da flaskene forsiktig ble vendt på, eller hvis de ikke kunne sitte oppreist da de landet etter flukt. Antall mygg i hver flaske ble registrert og mortalitet (i %) per 10 minutt ble regnet ut.

3.3.6 Statistikk

Hvis CDC bioassay indikerte toleranseforskjeller mellom HØY- og LAV-populasjonene, ble lethal time ratio (LTR) estimert for LT_{50} og LT_{90} for å bestemme om responsen til insektmidlene var statistisk forskjellig. LT_{50} og LT_{90} er estimerer på tiden det tok før 50 % og 90 % av myggpopulasjonen var død. Dersom et LTR-konfidensintervall ikke inneholder 1, er populasjonenes respons til insektmiddelet signifikant forskjellig (Robertson og Preisler 1992). Mange studier benytter kun vurdering av overlappende/ikke-overlappende LT-konfidensintervall for å bestemme om insektmiddelresponsen er forskjellig mellom populasjoner. Dette er en upresis metode fordi det eksakte signifikansnivået ved sammenligning av LT-konfidensintervall fra to populasjoner er ukjent (Robertson og Preisler 1992). Probitanalyse ble benyttet i estimeringen av LT-verdiene med tilhørende 95 % konfidensintervall og regresjonslinjenes parametere. Vanlig probitanalyse kunne ikke benyttes til estimering av LT-verdier og regresjonslinjens parametere, fordi CDC bottle-bioassay metoden er basert på flere observasjoner av de samme insektene ved én insektmiddelkonsentrasjon (Throne et al. 1995). En probitanalyse tilpasset innbyrdes forbundne data ble derfor brukt. Datatransformasjon som gav lavest χ^2 -goodnes of fit-verdi ble benyttet i LT- og LTR-estimeringer. En heterogenitetsfaktor ble anvendt i estimeringen av regresjonslinjens parametere dersom χ^2 -goodnes of fit-testen indikerte at regresjonslinjen beskrev dataene med et signifikansnivå $< p=0,05$. Probitanalysen og estimeringen av LTR ble gjort i Mathematica (Wolfram, Champaign, IL) med programmene PROBIT© og RELPOT©, utviklet av Dr. James Throne (tilgjengelig fra <http://bru.gmpc.ksu.edu/sci/throne/>).

3.4 Resultat

Totalt ble 70 *An. minimus*, 287 *An. maculatus* og 234 *An. sawadwongporni* fanget, fordelt på de to innsamlingslokalitetene. Innsamlingene gav få *An. minimus* både i mai og juni (Tabell

4). *An. maculatus* og *An. sawadwongporni* fangstene var generelt høyere enn *An. minimus*, men på LAV-lokaliteten i mai ble det kun fanget 12 *An. sawadwongporni*.

Tabell 4. Totalt antall mygg innsamlet ved human bait og bøffel i mai og juni i Muang Na (HØY) og Huay Kiang (LAV).

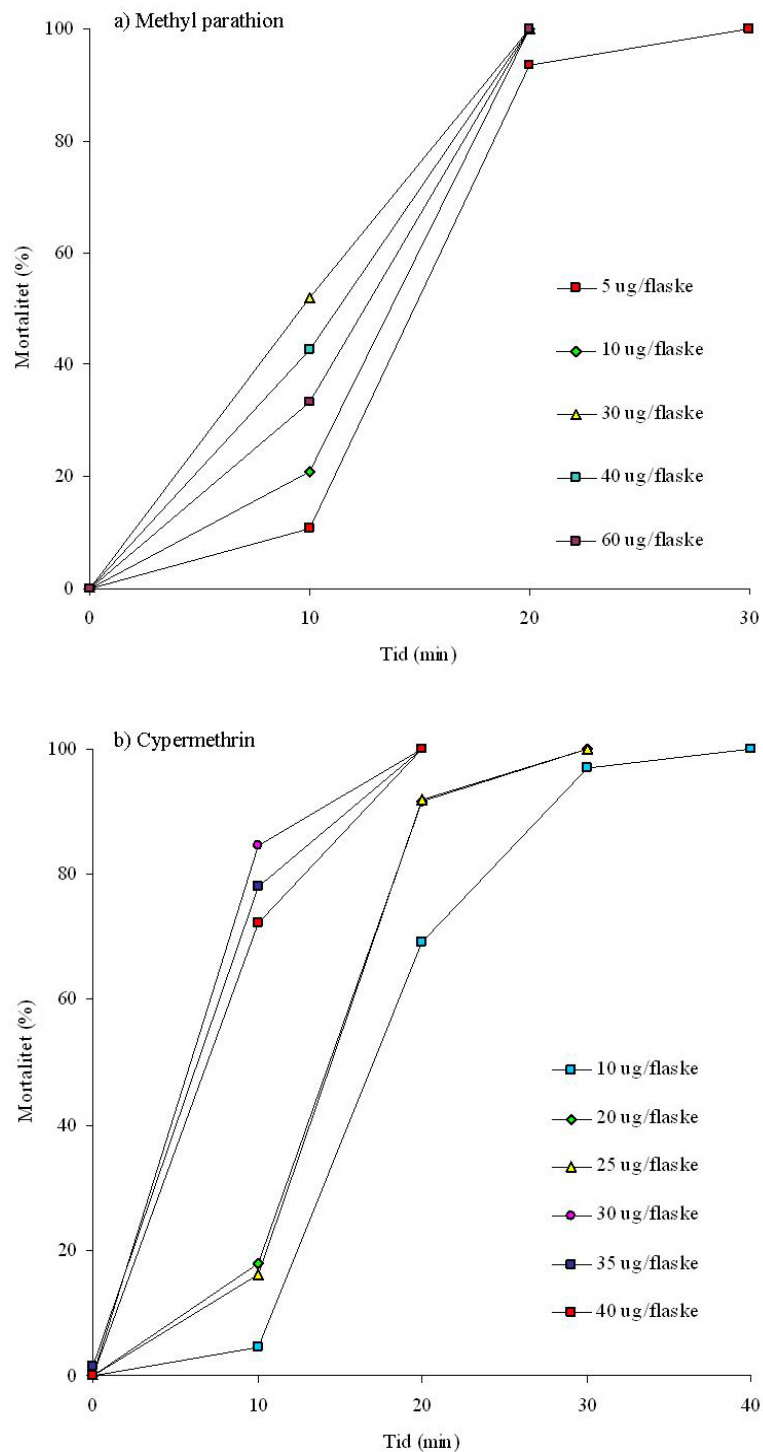
Arter	HØY	LAV
	Totalt antall mygg	Totalt antall mygg
<i>An. minimus</i>	26	3
Mai <i>An. maculatus</i>	92	41
<i>An. sawadwongporni</i>	57	12
<i>An. minimus</i>	25	16
Juni <i>An. maculatus</i>	64	90
<i>An. sawadwongporni</i>	55	110

Diskriminerende doser ble bestemt til 30 µg for cypermethrin (100 % mortalitet etter 20 minutter) og 10 µg for methyl parathion (100 % mortalitet etter 20 minutter) (Figur 4). For cypermethrin bestod stamløsningen av 85,7 µl cypermethrin (35 % aktiv ingrediens) og 9914,3 µl aceton. Methyl parathion-stamløsningen bestod av 20 µl methyl parathion (50 % aktiv ingrediens) og 9800 µl aceton.

Det var utilstrekkelig antall F1-individer av *An. minimus* fra LAV til å utføre bioassay. CDC-bioassay testene gav ingen indikasjon på forskjeller i følsomhet for cypermethrin (Tabell 5). Testene med methyl parathion viste ingen tegn på redusert følsomhet hos *An. minimus* fra HØY. For *An. sawadwongporni* og *An. maculatus* fra HØY- og LAV-lokaliteten var mortaliteten redusert etter 20 minutter (Tabell 5). HØY-populasjonene var mer tolerante ovenfor methyl parathion enn LAV-populasjonene for både *An. maculatus* og *An. sawadwongporni*. Kun én F1-mygg (<1 %) fra *An. sawadwongporni* LAV-populasjonen overlevde 20 minutter, mens 6 % (14 mygg) av HØY-populasjonen var levende etter 20 minutter. Testene på *An. maculatus* gav de største forskjellene i respons til methyl parathion. Etter 20 minutter var 26 % av HØY-populasjonen og 8 % av LAV-populasjonen levende.

Kun data fra methyl parathion-testene på *An. maculatus* gav tilstrekkelig datapunkter for probitanalyse. Log-probit transformasjon gav lavest χ^2 -verdi for både *An. maculatus* HØY- ($\chi^2=6,99$, Df=2) og LAV-populasjonen ($\chi^2=3,60$, Df=1). χ^2 -goodness of fit-testen var kun signifikant ved $p<0,075$ for HØY-populasjonen, og en heterogenitetsfaktor på 2,33 ble brukt i probitanalysen. LT₅₀ og LT₉₀ var høyere for *An. maculatus* fra HØY- enn fra LAV-

lokaliteten, og det var signifikante forskjeller ($P < 0,05$) i respons til methyl parathion mellom populasjonene (LTR-konfidensintervallene inneholdt ikke 1) (Tabell 6).



Figur 4. Etablering av diagnostisk dose for methyl parathion og cypermethrin. a) Diagnostisk dose ble bestemt til 10 µg/flaske for methyl parathion. b) Diagnostisk dose ble bestemt til 30 µg/flaske for cypermethrin for en ikke-resistent *An. minimus* LAB populasjon.

Tabell 5. Resultater fra CDC bioassay tester av *An. minimus*, *An. maculatus* og *An. sawadwongporni*. Følsomhet for methyl parathion og cypermethrin ble testet på F1-hunnindivider fra Muang Na (HØY) og Huay Kiang (LAV).

Insektmiddel	Art	HØY		LAV	
		Mortalitet	n	Mortalitet	n
Methyl parathion	<i>An. maculatus</i>	74 %	214	92 %	244
	<i>An. sawadwongporni</i>	94 %	237	99 %	244
	<i>An. minimus</i>	100 %	78	-	-
Cypermethrin	<i>An. maculatus</i>	99 %	171	100 %	166
	<i>An. sawadwongporni</i>	100 %	166	100 %	154
	<i>An. minimus</i>	100 %	56	-	-

Tabell 6. Resultater fra probitanalyser og LTR-estimering av *An. maculatus* HØY- og LAV-populasjonenes respons til methyl parathion. LT₅₀ og LT₉₀ med 95 % konfidensintervall ble estimert ved probitanalyse. LTR med 95 % konfidensintervall ble estimert for LT₅₀ og LT₉₀.

Andel døde	HØY		LAV		LTR	95 % K.I.
	LT-verdi	95 % K.I.	LT-verdi	95 % K.I.		
50 %	14,38	11,16 - 18,09	13,13	12,54 - 13,76	1,096	1,007 - 1,193
90 %	25,47	19,97 - 39,13	19,30	18,18 - 20,70	1,321	1,180 - 1,478

3.5 Diskusjon

An. maculatus og *An. sawadwongporni* hadde redusert mortalitet ved resistensterskelen for både HØY- og LAV-populasjonene. *An. sawadwongporni* LAV-populasjonen hadde kun en marginal reduksjon i mortalitet ved resistensterskelen (<1 %), så denne populasjonen regner jeg som fullstendig følsom for methyl parathion. Både *An. maculatus*-HØY og *An. sawadwongporni*-HØY hadde lavere følsomhet for methyl parathion enn de respektive populasjonene fra LAV-lokaliteten. I tillegg viste LTR-estimatene at *An. maculatus* HØY- og LAV-populasjonene hadde signifikant forskjellig respons til methyl parathion ved LT₅₀ og LT₉₀ (P<0,05). Resultatene fra både CDC bottle-bioassay og de statistiske analysene av data støtter opp om hypotesen at malariamyggepopulasjoner er under sterkt seleksjonstrykk fra insektmidler i områder med sitrusplantasjer.

Ingen har tidligere rapportert om organofosfatresistens i *Anopheles*-populasjoner i Thailand. Det har vært identifisert resistens for flere organofosfater i andre vektormygg, for eksempel *Ae. aegypti* (Chareonviriyaphap et al. 1999) og *C. quinquefasciatus* (Somboon et al. 2003). Disse tilfellene av OP-resistens har vært for organofosfatmidler brukt i vektorkontroll.

Vektorkontrolltiltak (IRS og ITNs) har vært identiske på HØY- og LAV-lokaliteten, og kun bestått av pyretroider. Dette studiet og studiet av Somboon et al. (2003) tyder på at det ikke eksisterer pyretroidresistens i *Anopheles*-populasjoner i dette området. Kryssresistens mellom vektorkontrollmidler og organofosfatmidler forklarer trolig derfor ikke myggpopulasjonenes reduserte følsomhet for metyl parathion. Så vidt jeg vet er det tidligere kun identifisert resistens for metyl parathion i *Anopheles*-mygg i India. Der har populasjoner av *An. stephensi* utviklet resistens mot metyl parathion basert på en avgiftningsmekanisme (Gangadhar og Shetty 1996). Resistens mot organofosfater kan skyldes flere typer enzybaserte avgiftningsmekanismer (Hemingway 1982, 1983; Hemingway et al. 1991), men kan også være et resultat av AChE-resistens som gir resistens mot både organofosfater og karbamater (Hemingway et al. 2004). Den observerte reduksjonen i følsomhet for metyl parathion kan derfor også være et resultat av seleksjonstrykk fra karbamater som brukes i jordbruket.

Selv om den reduserte følsomheten for metyl parathion var størst i HØY-populasjonene, var det også noe redusert mortalitet i LAV-populasjonene. *An. sawadwongporni* LAV-populasjonen definerer jeg som fullstendig mottagelig for metyl parathion, for kun ett individ overlevde resistensterskelen. *An. maculatus* LAV-populasjonen derimot hadde 8 % overlevelse ved resistensterskelen, og dette kan ikke overses. Det kan være flere årsaker til at F1-individ fra både *An. maculatus* HØY- og LAV-populasjonen viste redusert mortalitet. En forklaring kan være at det eksisterer, eller har eksistert, et seleksjonstrykk fra organofosfatmidler eller karbamatmidler på begge lokalitetene. Denne forklaringen er lite sannsynlig siden LAV-lokaliteten har meget begrenset bruk av jordbruksinsektmidler. Samtidig har det heller ikke blitt brukt organofosfatmidler til vektorkontroll på noen av lokalitetene. På grunn av vanskeligheter med å få oversikt over insektmiddelbruken i jordbruket, kan man dessverre ikke fullstendig utelukke seleksjonspres fra jordbruksinsektmidler som mulig forklaring på LAV-populasjonens reduserte mortalitet (Personlig meddelelse Hans Overgaard, IWMI, Bangkok, Thailand).

Genflyt fra andre populasjoner under seleksjonstrykk fra organofosfater eller karbamater kan være en forklaring på hvorfor *An. maculatus* fra LAV viste noe redusert følsomhet for metyl parathion. Distansen fra LAV lokaliteten til de nærmeste jordbruksarealene der insektmidler ble brukt intensivt var >7 km. I tillegg skilte en fjellkjede LAV-lokaliteten fra de nærmeste jordbruksområdene. Dessverre er ingen data publisert på gjennomsnitts- eller maksimum

fluktdistanse for *An. maculatus*, så det er vanskelig å anslå sannsynligheten for genflyt fra andre resistente populasjoner. Flere eksperiment på fluktdistanser er derimot gjort på andre *Anopheles*-arter. I en studie på *An. gambiae* ble det estimert ut fra eksperimentelle data at kun 6 % av hunnmyggene fløy mer enn 3,2 km, og gjennomsnittlig fluktdistanse var 1,58 km (Clements 1999). Andre *Anopheles*-arter har hatt en gjennomsnittlig fluktdistanse på mellom 0,12 og 1,84 km og maksimum gjenfangst distanse mellom 1,8 og 5 km (Reisen og Aslamkhan 1979; Weathersbee og Meisch 1990; Bryan et al. 1991). Antar man at *An. maculatus* har sammenlignbar flygeatferd med andre *Anopheles*-arter, er det lite sannsynlig at genflyt fra andre resistente populasjoner har hatt innvirkning på LAV-lokalitetens følsomhet for methyl parathion.

Den mest trolige forklaringen på den reduserte insektmiddelfølsomheten observert i *An. maculatus* LAV-populasjonen, er interspesifikke forskjeller i evnen til å motstå toksiske effekter. Ved å bruke diagnostisk dose basert på *An. minimus* når man tester andre arter, risikerer man at små variasjoner i mortalitet ved resistensterskelen er forårsaket av naturlige forskjeller i insektmiddelfølsomhet mellom arter. Størrelsen på myggartene er en faktor som kan påvirke toleransen for insektmidler (WHO 1975). *An. maculatus* er noe større enn *An. minimus* og størrelsesforskjellen kan derfor være en mulig forklaring på redusert mortalitet i *An. maculatus* LAV-populasjonen. Det er lite sannsynlig at den reduserte mortaliteten i *An. maculatus* HØY-populasjonen kun skyldes interspesifikke forskjeller i insektmiddeltoleranse. For det første er andelen overlevende betraktelig høyere i HØY populasjonen (26 %) enn i LAV-populasjonen (8 %). For det andre gav LTR-estimeringen signifikante forskjeller i responsen til methyl parathion mellom HØY- og LAV-populasjonene.

Et spørsmål som må stilles er hvorfor ikke *An. minimus* populasjonen på HØY-lokaliteten viste tegn på redusert methyl parathion følsomhet når begge de andre artene gjorde det. En forklaring er muligens at fangstene av *An. minimus* var svært lave (<30) ved begge innsamlingene. Dersom frekvensen av resistente individ i populasjoner og fangstene er lave, er det liten sannsynlighet for at F1-populasjonen har resistente individer. Lave myggfangster kan derfor ha maskert resistens for insektmiddelresistens i myggpopulasjonene. En annen forklaring på hvorfor *An. minimus* ikke viste tegn på methyl parathion-resistens, kan være forskjeller i larvehabitat. *An. minimus* krever sakteflytende bekker med kantvegetasjon (Overgaard et al. 2002), mens *An. maculatus* og *An. sawadwongporni* er kjent for å også kunne benytte seg av mer stillestående vannkilder til larvehabitat (Reid 1968; WHO 2003b).

Mygglarver i stillestående vannkilder inne i sitrusplantasjene vil være mer utsatt for insektmiddeleksponering i forhold til larver som lever i bekker i utkanten av sitrusplantasjene. Inne i sitrusplantasjene fantes flere vannmagasin og mindre pytter som kan ha vært anvendt til larvehabitat av *An. maculatus* og *An. sawadwongporni*. Det er derfor ikke usannsynlig at disse artene kan derfor ha opplevd et høyere seleksjonspress enn *An. minimus*. En tredje årsak kan være forskjeller i imagoatferd. *An. minimus* er kjent for å være den mest antropofile av de tre artene undersøkt i studien (Somboon et al. 1994; WHO 2003b). Det kan av den grunn tenkes at *An. minimus* oppsøkte områder med mennesker og dermed unngikk kontakt med sprøytede områder i større grad enn *An. maculatus* og *An. sawadwongporni*.

Resultatene fra bioassay-testene med cypermethrin viste ingen tegn til resistensseleksjon. Bortsett fra ett *An. maculatus* F1-individ fra HØY som overlevde 20 minutter, gav alle testene 100 % mortalitet ved resistensterskelen. Dette stemmer overens med resultater fra et annet studie. Somboon et al. (2003) fant ingen tegn til resistens mot permethrin, et pyretroid brukt til vektorkontroll, i *An. minimus*-populasjoner fra samme område. Pyretroidresistens i *An. minimus* er ikke godt påvist i naturlige populasjoner i Thailand. Enkelte rapporter fra vektorkontrollmyndighetene har meldt om indikasjoner på evolusjon av pyretroidresistens (Chareonviriyaphap et al. 1999), men disse enkelttilfellene har aldri blitt bekreftet av mer detaljerte studier (Somboon et al. 2003). Det eneste sikre tilfellet av pyretroidresistens i malariavektorer i Thailand, var etter laboratorieseleksjon av en ikke-resistent *An. minimus*-populasjon (Chareonviriyaphap et al. 2002). Denne laboratoriepopulasjonen utviklet oxygenasebasert resistens for deltamethrin (Chareonviriyaphap et al. 2003b; Rognoparut et al. 2003). Ingen data på pyretroidresistens i Thailand er publisert for *An. maculatus* eller *An. sawadwongporni*.

Dette er det første studiet på thailandske malariavektorer som undersøker følsomheten for ett jordbrukspyretroid. Integrert i Thailands vektorkontroll ligger regelmessig overvåkning av resistensutvikling, men resistens mot jordbruksinsektmidler blir ikke overvåket. Både avgiftningsresistens og target site resistens kan gi resistens mot pyretroider (Ranson et al. 2000; Ranson et al. 2001). Avgiftningsresistens kan være spesifikk for enkelte pyretroidmiddel (Chandre et al. 1999). Cypermethrinresistente *Anopheles*-populasjoner kan derfor oppstå uten at dette påvirker malariavektorenes mottagelighet for permethrin og deltamethrin, som brukes i vektorkontroll. Overvåkning av resistensutvikling for insektmiddel som brukes i vektorkontrollen, vil derfor ikke gi en fullstendig oversikt over

resistenstrusselen. Hvis pyretroider fra jordbruket utgjør et seleksjonspress på myggpopulasjonene, kan resistensmekanismer som også gir resistens til vektorkontrollmidlene oppstå. En av de største farene i forhold til svikt i malariakontrollen er evolusjon av kdr-basert resistens, fordi kdr-basert resistens gir resistens til et bredt spekter av pyretroider (Hemingway et al. 2004).

For at en populasjon skal kunne bli resistent mot et insektmiddel må populasjonens genpool inneholde genetisk basis for insektmiddelresistens (i.e. resistensallel) i tillegg til at miljøet må selektere for resistente individer. Fraværet av cypermethrinresistens på HØY-lokaliteten skyldes derfor enten lavt seleksjonstrykk, eller mangel på resistensalleler i populasjonene. HØY-populasjonene var fra et område hvor det er dyrket sitrusfrukt, og brukt store mengder insektmidler i ca. 10 år. Til sammenligning gav 10 år med høyt seleksjonspress en økning i resistensallelfrekvens fra $< 0,01$ til $> 50\%$ i en *C. quinquefasciatus*-populasjon (Yebakima et al. 2004). Det er derfor nærliggende å tro at fraværet av cypermethrinresistens er et resultat av en lavt seleksjonstrykk, og ikke mangel på genetisk grunnlag for resistensevolusjon.

Seleksjonstrykket fra cypermethrin kan ha vært lavt som en følge av at bøndene ikke benyttet cypermethrin i stor grad. Valget av insektmidler vi testet for resistens mot ble gjort på grunnlag av en spørreundersøkelse (Overgaard 2004, upubliserte data). Det viste seg å være meget vanskelig å hente inn god informasjon om insektmiddelbruken i området. Bøndene som deltok i spørreundersøkelsen gav lite detaljinformasjon om sitt insektmiddelbruk og hadde generelt dårlig kunnskap om hvilke insektmidler de benyttet seg av. En årsak til dette er at ulovlig og ekstrem bruk av insektmidler har ført til store helseproblemer blant fattige jordbruksarbeidere flere steder i Thailand (Kunstadter et al. 2001). Dette har fått mye negativ presseomtale og mange bønder er derfor skeptiske til å fortelle hvor mye hva slags insektmiddel de bruker. Et annet problem med kartlegging av insektmiddelbruk var at bøndene kjøpte billige insektmidler på svartebørsen. Innpakningene til svartebørsinsektmiddel hadde ingen- eller mangelfull merking. Det er derfor store usikkerheter rundt hvor mye cypermethrin som ble brukt i området i perioden før mygginnsamlingene ble gjort.

Flere faktorer kan hindre seleksjon for insektmiddelresistens, selv hvis cypermethrin ble brukt intensivt i sitrusplantasjene. Én slik faktor er den repellerende effekten til mange insektmidler, som kan føre til at ikke-resistente insekt unngår sprøytede flater. Pyretroider er kjent for å virke repellerende på mygg (Sungvornyothin et al. 2001; Corbel et al. 2004), og det effektive

seleksjonspresset på myggpopulasjonene kan dermed ha vært lavt, selv hvis bøndene i området brukte cypermethrin. Corbel et al. (2004) observerte en slik reppelleffekt i en *An. gambiae* populasjon med kdr-basert resistens. Homozygote ikke-resistente insekt hadde lavere mortalitet i miljø der populasjonen var eksponert for permethrinimpregnerte sengenett, enn heterozygote resistente insekt. Dette ble forklart ved at ikke-resistente individer i høy grad unngikk sengenettene, og det ble derfor ikke selektert for kdr-resistens i populasjonen.

En annen mulig forklaring på at mygg populasjonene fra HØY-lokaliteten ikke viste tegn på resistens mot cypermethrin, kan være at det selekteres for larvespesifikke resistensmekanismer (Kumar et al. 2004). Sitrusplantasjene på HØY-lokaliteten ligger i umiddelbar nærhet til flere sakteflytende bekker og små dammer som egner seg til larvehabitat for *Anopheles*-myggene. Avrenning fra jordbruksarealene til larvehabitatene kan ha ført til at seleksjonen for cypermethrinresistens på larvestadiet var sterk. I dette studiet ble dessverre ikke larvestadiet testet for resistens mot insektmidlene.

Data fra både Overgaard et al. (2003) og dette studiet støtter opp om at *Anopheles*-populasjoner opplever et sterkt seleksjonstrykk fra insektmidler i områder med sitrusplantasjer dominerer. Dette kan få konsekvenser for sykdomskontrollen. Organofosfater brukes ikke i dagens malariamyggek kontroll i Nord-Thailand, men høyt seleksjonstrykk fra organofosfater fra jordbruket kan allikevel true malariamyggek kontroll. Evolusjon av organofosfat-pyretroid kryssresistens er nemlig observert for *Anopheles*- (Brogdon og Barber 1990), *Aedes*- (Rodriguez et al. 2002) og *Culex*-mygg (Bisset et al 1997, 1998). Seleksjonspress fra jordbrukspyretroidet cypermethrin virker ikke som det utgjør en fare for malariamyggek kontroll i studieområdet. Det tilsynelatende fraværet av pyretroidresistens i Nord-Thailand er gledelig fra et vektorkontrollperspektiv, men bør ikke tas for gitt. I løpet av det siste tiåret har man sett evolusjon av pyretroidresistente *Anopheles*-populasjoner i flere andre land (Martinez-Torres et al. 1998; Brogdon et al. 1999b; Hargreaves et al. 2000; Lüleyp et al. 2002; Enayati et al. 2003). Hvis det totale seleksjonspresset fra vektorkontrollmidler og jordbruksinsektmidler er høyt over tid, kan det være et spørsmål om tid før det også oppstår pyretroidresistente *Anopheles*-populasjoner i Nord-Thailand.

For å bekrefte om den reduserte følsomheten for methyl parathion i *An. sawadwongporni* og *An. maculatus* er fysisk resistens, må det gjøres videre biokjemiske studier av enzymaktiviteten i myggene og biokjemiske tester for AChE-resistens.

Litteratur

- Andreasen, M. H. og French-Constant, R. H. 2002. In situ hybridization to the Rdl locus on polytene chromosome 3L of *Anopheles stephensi*. Medical and Veterinary Entomology. 16 (4): 452-455.
- Arnaud, L. og Haubruge, E. 2002. Insecticide resistance enhances male reproductive success in a beetle. Evolution. 56 (12): 2435-2444.
- Arnaud, L., Brostaux, Y., Assie, L. K., Gaspar, C. og Haubruge, E. 2002. Increased fecundity of malathion-specific resistant beetles in absence of insecticide pressure. Heredity. 89 (6): 425-429.
- Ayad, H. og Georgiou, G. P. 1979. Resistance pattern of *Anopheles albimanus* Wied. following selection by parathion. Mosquito News. 39: 121-125.
- Bass, C., Schroeder, I., Turberg, A., Field, L. M. og Williamson, M. S. 2004. Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of the cat flea, *Ctenocephalides felis*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 34 (12): 1305-1313.
- Beales, P. F. og Gilles, H. M. 2002. Rationale and technique of malaria control. S 107-190. I: Warrel, D. og Gilles, H. M. (Red). Essential malariology, 4th edition. Arnold, London, UK. 348 s.
- Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M. og Chevillon, C. 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. Genetical Research. 79 (1): 41-47.
- Berticat, C., Duron, O., Heyse, D. og Raymond, M. 2004. Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*. Genetical Research. 83 (3): 189-196.
- Bisset, J., Rodriguez, M., Soca, A., Pasteur, N. og Raymond, M. 1997. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides in the southern house mosquito (Diptera: Culicidae) from Cuba. Journal of Medical Entomology. 34 (2): 244-246.
- Bisset, J., Rodriguez, M. og Soca, A. 1998. Cross-resistance to malathion in Cuban *Culex quinquefasciatus* induced by larval selection with deltamethrin. Medical and Veterinary Entomology. 12 (1): 109-112.
- Bloomquist, J. R. 2001. GABA and glutamate receptors as biochemical sites for insecticide action. S 17-41. I: Ishaaya, I. (Red). Biochemical sites of insecticide action and resistance. Springer, Berlin, Germany. 343 s.
- Bourguet, D. og Raymond, M. 1998. The molecular basis of dominance relationships: the case of some recent adaptive genes. Journal of Evolutionary Biology. 11: 103-122.
- Bourguet, D., Genissel, A. og Raymond, M. 2000. Insecticide resistance and dominance levels. Journal of Economical Entomology. 93 (6): 1588-1595.
- Brogdon, W. G., Beach, R. F., Stewart, J. M. og Castanza, L. 1988. Microplate assay analysis of the distribution of organophosphate and carbamate resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. Bulletin of the World Health Organization. 66 (3): 339-346.
- Brogdon, W. G. og Barber, A. M. 1990. Fenitrothion-deltamethrin cross-resistance conferred by esterases in Guatemalan *Anopheles albimanus*. Pesticide Biochemical Physiology. 3: 130-139.
- Brogdon, W. G. og McAllister, J. C. 1998a. Insecticide resistance and vector control. Emerging Infectious Diseases. 4 (4). Tilgjengelig fra: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no4/brogdon.htm>

- Brogdon, W. G. og McAllister, J. 1998b. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of American Mosquito Control Association*. 14 (2): 159-164.
- Brogdon, W. G., McAllister, J. C., Corwin, A. M. og Cordon-Rosales, C. 1999a. Oxidase-based DDT-pyrethroid cross-resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pesticide biochemistry and physiology*. 64: 101-111.
- Brogdon, W. G., McAllister, J. C., Corwin, A. M. og Cordon-Rosales, C. 1999b. Independent selection of multiple mechanisms for pyrethroid resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*. 92 (2): 298-302.
- Brooke, B. D., Hunt, R. H. og Coetzee, M. 2000. Resistance to dieldrin plus fipronil assort with chromosome inversion 2La in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*. 14 (2): 190-194.
- Brooke, B. D., Kloke, G., Hunt, R. H., Koekemoer, L. L., Temu, E. A., Taylor, M. E., Small, G., Hemingway, J. og Coetzee, M. 2001. Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*. 91: 265-272.
- Brooke, B. D., Hunt, R. H., Chandre, F., Carnevale, P. og Coetzee, M. 2002. Stable chromosomal inversion polymorphisms and insecticide resistance in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera : Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 39 (4): 568-573.
- Bryan, J. H., Foley, D. H., Geary, M. og Carven, C. T. J. 1991. *Anopheles annulipes* Walker (Diptera: Culicidae) at Griffith, New South Wales. 3. Dispersal of two sibling species. *Journal of Australian Entomological Society*. 30: 119-121.
- Campbell, P. M., Newcomb, R. D., Russell, R. J. og Oakeshott, J. G. 1998. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28 (3): 139-150.
- Center for Integrated Plant Studies. 2005. Tilgjengelig fra: <http://www.cips.msu.edu/resistance>
- Carrière, Y., Deland, J. P., Roff, D. A. og Vincent, C. 1994. Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. *Proceedings: Biological Science*. 258: 35-40.
- Chandre, F., Darrier, F., Manga, L., Akogbeto, M., Faye, O., Mouchet, J. og Guillet, P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bulletin of the World Health Organization*. 77 (3): 230-234.
- Chapin, G. og Wasserstrom, R. 1981. Agricultural production and malaria resurgence in Central America and India. *Nature*. 293: 181-185.
- Chareonviriyaphap, T., Aum-aung, B. og Ratanatham, S. 1999. Current insecticide resistance patterns in mosquito vectors in Thailand. *Southeast Asian Journal of Medicine and Public Health*. 30 (1): 184-194.
- Chareonviriyaphap, T., Rongnoparut, P. og Juntarumporn, P. 2002. Selection for pyrethroid resistance in a colony of *Anopheles minimus* species A, a malaria vector in Thailand. *Journal of Vector Ecology*. 27 (2): 222-229.
- Chareonviriyaphap, T., Prabaripai, A., Bangs, M. J. og Aum-Aung, B. 2003a. Seasonal abundance and blood feeding activity of *Anopheles minimus* Theobald (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Journal of Medical Entomology*. 40 (6): 876-881.

- Chareonviriyaphap, T., Rongnoparut, P., Chantarumporn, P. og Bangs, M. J. 2003b. Biochemical detection of pyrethroid resistance mechanisms in *Anopheles minimus* in Thailand. *Journal of Vector Ecology*. 28 (1): 108-116.
- Clements, A. N. 1999. The biology of mosquitoes. Vol. 2: Sensory reception and behaviour. CABI Publishing, New York, USA. 740 s.
- Coetzee, M., Horne, D. W. K., Brooke, B. D. og Hunt, R. H. 1999. DDT, dieldrin and pyrethroid insecticide resistance in African malaria vector mosquitoes: an historical review and implications for future malaria control in southern Africa. *South African Journal of Science*. 95: 215-218.
- Corbel, V., Chandre, F., Brengues, C., Akogbeto, M., Lardeux, F., Hougard, J. M. og Guillet, P. 2004. Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. *Malaria Journal*. 3 (22).
- Tilgjengelig fra: <http://www.malariajournal.com/content/3/1/22>
- Daborn, P. J., Yen, J. L., Bogwitz, M. R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tiet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., Feyereisen, R., Wilson T. G. og ffrench-Constant, R. H. 2002. A singel P450 allele associated with insecticide resistance in global populations of *Drosophila*. *Science*. 297: 2253-2256.
- Davidson, G. 1963. DDT resistance and dieldrin resistance in *Anopheles albimanus*. *Bulletin of the World Health Organization*. 28: 25-33.
- Diabate, A., Baldet, T., Chandre, F., Akogbeto, M., Guiguemde, T. R., Darriet, F., Brengues, C., Guillet, P., Hemingway, J., Small, G. J. og Hougard, J. M. 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s. l. in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 67 (6): 617-622.
- Diabate, A., Brengues, C., Baldet, T., Dabire, K. R., Hougard, J. M., Akogbeto, M., Kengne, P., Simard, F., Guillet, P., Hemingway, J. og Chandre, F. 2004. The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Tropical Medicine & International Health*. 9 (12): 1267-1273.
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D. og Crow, J. F. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*. 148 (4): 1667-1686.
- Enayati, A. A., Vatandoost, H., Ladonni, H., Townson, H. og Hemingway, J. 2003. Molecular evidence for a kdr-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector mosquito *An. Stephensi*. *Medical and Veterinary Entomology*. 16: 214-217.
- Enayati, A. A., Ranson, H. og Hemingway, J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*. 14 (1): 3-8.
- ffrench-Constant, R. H., Anthony, N., Aronstein, K., Rocheleau, T. og Stilwell, G. 2000. Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. *Annual Review of Entomology*. 48: 449-466.
- ffrench-Constant, R. H., Daborn, P. J. og Le Goff, G. 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Genetics*. 20 (3): 163-170.
- Field, L. M. og Blackman, R. L. 2003. Insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer): chromosome location and epigenetic effects on esterase gene expression in clonal lineages. *Biological Journal of the Linnean Society*. 79 (1): 107-113.

- Forcioli, D., Frey, B. og Frey, J. F. 2002. High nucleotide diversity in the para-like voltage-sensitive sodium channel gene sequence in the western flower thrips (Thysanoptera : Thripidae). *Journal of Economic Entomology*. 95 (4): 838-848.
- Foster, S. P., Harrington, R., Devonshire, A. L., Denholm, I., Clark, S. J. og Muggleston, M. A. 1997. Evidence for a possible fitness trade-off between insecticide resistance and the low temperature movement that is essential for survival of UK populations of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*. 87: 573-579.
- Foster, S. P., Woodcock, C. M., Williamson, M. S., Devonshire, A. L., Denholm, I. og Thompson, R. 1999. Reduced alarm response by peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), with knock-down resistance to insecticides (kdr) may impose a fitness cost through increased vulnerability to natural enemies. *Bulletin of Entomological Research*. 89: 133-138.
- Foster, S. P., Harrington, R., Dewar, A. M., Denholm, I. og Devonshire, A. L. 2002. Temporal and spatial dynamics of insecticide resistance in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science*. 58 (9): 895-907.
- Foster, S. P., Young, S., Williamson, M. S., Duce, I., Denholm, I. og Devine, G. J. 2003. Analogous pleiotrophic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. *Heredity*. 91: 98-106.
- Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology*, 3rd ed. Sinauer Associates. Massachusetts, USA. 763 s.
- Gahan, L. J., Gould, F. og Heckel, D. G. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*. 293: 857-860.
- Ganesh, K. N., Urmila, J. og Vijayan, V. A. 2003. Pyrethroid susceptibility & enzyme activity in two malaria vectors, *Anopheles stephensi* (Liston) & *A. culicifacies* (Giles) from Mysore, India. *Indian Journal of Medical Research*. 117: 30-38.
- Gangadhar, R. D. E. og Shetty, N. J. 1996. Proteins and esterase isozymes during developmental stages of organophosphate resistant strains in *Anopheles stephensi* Liston. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 114C (1): 51-55.
- Georgiou, G. P. 1990. The effect of agrochemicals on vector populations. S 183-202. I: Roush, R. T. og Tabashnik, B. E. (Red). *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman and Hall, New York, USA. 303 s.
- Georgiou, G. P., Ariaratnam, V. og Breeland, S. G. 1971. *Anopheles albimanus*: Development of carbamate and organophosphorus resistance in nature. *Bulletin of the World Health Organization*. 46: 551-554.
- Gilles, H. M. 2002. Historical outline. S 1-7. I: Warrel, D. og Gilles, H. M. (Red). *Essential malariology*, 4th edition. Arnold, London, UK. 348 s.
- Grant, D. F. og Hammock, B. D. 1992. Genetic and molecular evidence for a trans acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Molecular & General Genetics*. 234 (2): 169-176.
- Greenwood, B. og Mutabingwa, T. 2002. Malaria in 2002. *Nature*. 415: 670-672.
- Griffiths, A. J. F., Gelbart, W. M., Lewontin, R. C. og Miller, J. H. 2002. *Moderen genetic analysis: intergrating genes and genomes*, 2nd edition. Freeman, New York, USA. 736 s.
- Gullan, P. J. og Cranston, P. S. 2000. *An outline of entomology*, 2nd edition. Blackwell Science. Malden, USA. 470 s.

- Guillemaud, T., Lenormand, T., Bourguet, D., Chevillion, C., Pasteur, N. og Raymond, M. 1998. Evolution of resistance in *Culex pipiens*: allele replacement and changing environment. *Evolution*. 52 (2): 443-453.
- Guillemaud, T., Brun, A., Anthony, N., Sauge, M. H., Boll, R., Delorme, R., Fournier, D., Lapchin, L. og Vanlerberghe-Masutti, F. 2003. Incidence of insecticide resistance alleles in sexually-reproducing populations of the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Hemiptera : Aphididae) from southern France. *Bulletin of Entomological Research*. 93 (4): 289-297.
- Halliburton, R. 2004. Introduction to population genetics. International edition. Pearson Prentice Hall, New Jersey, USA. 650 s.
- Hargreaves, K., Koekemoer, L. L., Brooke, B. D., Hunt, R. H., Mthembu, J. og Coetzee, M. 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology*. 14: 181-189.
- Hargreaves, K., Hunt, R. H., Brooke, B. D., Mthembu, J., Weeto, M. M., Awolola, T. S. og Coetzee, M. 2003. *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* resistance to DDT in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology*. 17: 417-422.
- Hemingway, J. 1982. The biochemical nature of malathion resistance in *Anopheles stephensi* from Pakistan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 17: 149-155.
- Hemingway, J. 1983. Biochemical studies on malathion resistance in *Anopheles arabiensis* from Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 77: 477-480.
- Hemingway, J. og Georgiou, G. P. 1983. Studies on the acetylcholinesterase of *Anopheles albimanus* resistant and susceptible to organophosphate and carbamate insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 19: 167-171.
- Hemingway, J. Jayawardena, K. G. I. og Herath, P. R. J. 1986. Pesticide resistance mechanisms produced by field selection pressures on *Anopheles nigerrimus* and *A. culicifacies* in Sri Lanka. *Bulletin of the World Health Organization*. 64 (5): 753-758.
- Hemingway, J., Miyamoto, J. og Herath, P. R. J. 1991. A possible novel link between organophosphorus and DDT insecticide resistance genes in *Anopheles*: supporting evidence from fenitrothion metabolism studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 39: 49-56.
- Hemingway, J. og Ranson, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*. 45: 371-391.
- Hemingway, J., Field, L. og Vontas, J. 2002. An overview of insecticide resistance. *Science*. 298: 96-97.
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L. og Ranson, H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34: 653-665.
- Hodjati, M. H. og Curtis, C. F. 1999. Effects of permethrin at different temperatures on pyrethroid-resistant and susceptible strains of *Anopheles*. *Medical and Veterinary Entomology*. 13: 415-422.
- Horowitz, A. R., Mendelson, Z., Cahill, M., Denholm, I. og Ishaaya, I. 1999. Managing resistance to the insect growth regulator, pyriproxyfen, in *Bemisia tabaci*. *Pesticide Science*. 55 (3): 272-276.
- Hsu, J. C., Feng, H. T. og Wu, W. J. 2004. Resistance and synergistic effects of insecticides in *Bactrocera dorsalis* (Diptera : Tephritidae) in Taiwan. *Journal of Economic Entomology*. 97 (5): 1682-1688.
- IPM DANIDA 2003. Did you take your poison today? IPM DANIDA report.
- Tilgengeligt fra: <http://www.ipmthailand.org>

- Janmaat, A. F. og Myers, J. 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. Proceedings of the Royal Society of London. 270: 2263-2270.
- Johansen, N. S. 2002. Overview of resistance. Proceedings Vietnamese-Norwegian Workshop, Ås (Norway). 25th-26th September 2001. Grønn Forskning. 13: 81-87.
- Johansen, N. S. og Nordhus, E. 2004. Resistens mot insektmidler. Plantemøtet Østlandet 2004. Grønn Kunnskap. 8 (2): 358-367.
- Jungbluth, F. 1996. Crop protection policy in Thailand: Economic and political factors influencing pesticide use. Pesticide Policy Project publication No. 5. Hannover University, Germany.
- Kimura, M. 1962. On the probability of fixation of mutant genes in a population. Genetics. 47: 713-719.
- Kongmee, M., Prabaripai, A., Akrotanakul, P., Bangs, M. J. og Chareonviriyaphap, T. 2004. Behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to deltamethrin and possible implications for disease control. Journal of Medical Entomology. 41 (6): 1055-1063.
- Kumar, S., Thomas, A., Sahgal, A., Verma, A., Samuel, T. og Pillai, M. K. K. 2004. Variations in the insecticide-resistance spectrum of *Anopheles stephensi* after selection with deltamethrin or a deltamethrin-piperonyl-butoxide combination. Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 98 (8): 861-871.
- Kunstadter, P., Prapamontol, T., Sirirojn, B., Sontirat, A., Tansuhaj, A. og Khamboonruang, C. 2001 Pesticide exposures among Hmong Farmers in Thailand. International Journal of Occupational and Environmental Health. 7: 313-325.
- Lenormand, T., Guillemaud, T., Bourguet, D. og Raymond, M. 1998. Evaluating gene flow using selected markers: a case study. Genetics. 149: 1383-1392.
- Lenormand, T., Bourguet, D., Guillemaud, T. og Raymond, M. 1999. Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. Nature. 400: 861-864.
- Lines, J. D. 1988. Do agricultural insecticides select for insecticide resistance in mosquitoes? A look at the evidence. Parasitology Today. 4 (7): 17-20.
- Lines, J. D. og Nassor, N. S. 1991. DDT resistance in *Anopheles gambiae* declines with mosquito age. Medical and Veterinary Entomology. 5: 261-265.
- Liu, H. Q., Cupp, E. W., Micher, K. M., Guo, A. G. og Liu, N. N. 2004. Insecticide resistance and cross-resistance in Alabama and Florida strains of *Culex quinquefasciatus*. Journal of Medical Entomology. 41 (3): 408-413.
- Lüleyap, H. Ü., Alptekin, D., Kasap, H. og Kasap, M. 2002. Detection of knockdown resistance mutations in *Anopheles sacharovi* (Diptera: Culicidae) and genetic distance with *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) using cDNA sequencing of the voltage-gated sodium channel. Journal of Medical Entomology. 39 (6): 870-874.
- Martinez-Torres, D., Chandre, D., Williamson, M. S., Darriet, F., Bergé, J. B., Devonshire, A. L., Guillet, P., Pasteur, N. og Pauron, D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s. s.. Insect Molecular Biology. 7 (2): 179-184.

- Martinez-Torres, D., Foster, S. P., Field, L. M., Devonshire, A. L. og Williamson, M. S. 1999. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology*. 8 (3): 339-346.
- Mathenge, E. M., Giminig, J. E., Kolczak, M., Ombok, M., Irungu, L. W. og Hawley, W. A. 2001. Effect of Permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (diptera: Culicidae) in Western Kenya. *Journal of Medical Entomology*. 38 (4): 531-536.
- Mbogo, C. N. M., Baya, N. M., Ofulla, A. V. O., Githure, J. I. og Snow, R. W. 1996. The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. *Medical and Veterinary Entomology*. 10 (3): 251-259.
- Minakawa, N., Sonye, G., Mogi, M. og Yan, G. 2004. Habitat characteristics of *Anopheles gambiae* s.s. larvae in a Kenyan highland. *Medical and Veterinary Entomology*. 18 (3): 301-305.
- Mohan, M. og Gujar, G. T. Geographical variation in larval susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* spore-crystal mixtures and purified crystal proteins and associated resistance development in India. *Bulletin of Entomological Research*. 92 (6): 489-498.
- Mota-Sanchez, D., Bills, P. S. og Whalon, M. E. 2002. Arthropod resistance to pesticides: Status and overview. S 241-272. I: Wheeler, W. B. (Red). *Pesticides in agriculture and the environment*. Marcel Dekker Inc., New York, USA. 360 s.
- Mulla, M. S., Thavara, U., Tawatsin, A. og Chomposri, J. 2004. Procedures for the evaluation of field efficacy of slow-release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water-storage containers. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 20 (1): 64-73.
- N'Guessan, R., Darriet, F., Guillet, P., Carnevale, P., Traore-Lamizana, M., Corbel, V., Koffi, A. A. og Chandre, F. 2003. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Medical and Veterinarian Entomology*. 17: 19-25.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Elbert, A., Jeschke, P. og Tietjen, K. 2001. Acetylcholine receptors as sites for developing neonicotinoid insecticides. S 77-105. I: Ishaaya, I. (Red). *Biochemical sites of insecticide action and resistance*. Springer, Berlin, Germany. 343 s.
- Nikou, D., Ranson, H. og Hemingway, J. 2003. An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene*. 318: 91-102.
- Nutsathapana, S., Sawasdiwongphorn P., Chitprarop. U. og Cullen, J. R. 1986. The behaviour of *Anopheles minimus* Theobald (Diptera: Culicidae) subjected to differing levels of DDT selection pressure in northern Thailand. *Bulletin of Entomological Research*. 76: 303-312.
- Ortelli, F., Rossiter, L. C., Vontas, J., Ranson, H. og Hemingway, J. 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal*. 373: 957-963.
- Overgaard, H. J., Tsuda, Y., Suwonkerd, W. og Takagi, M. 2002. Characteristics of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) larval habitats in northern Thailand. *Environmental Entomology*. 31 (1): 134-141.
- Overgaard, H. J., Ekbohm, B., Suwonkerd, W. og Takagi, M. 2003. Effect of landscape structure on anopheline mosquito density and diversity in northern Thailand: Implications for malaria transmission and control. *Landscape Ecology*. 18: 605-619.

- Palumbo, J. C., Horowitz, A. R. og Prabhaker, N. 2001. Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*. 20 (9): 739-765.
- Pates, H. og Curtis, C. 2005. Mosquito behavior and vector control. *Annual Review of Entomology*. 50: 53-70.
- Paton, M. G., Karunaratne, S. H. P. P., Giakoumaki, E., Roberts, N. og Hemingway, J. 2000. Quantitative analysis of gene amplification in insecticide-resistant *Culex* mosquitoes. *Biochemical Journal*. 346: 17-24.
- Prapanthadara, L., Hemingway, J. og Ketterman, A. J. 1995. DDT-resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from Zanzibar, Tanzania, based on increased DDT-dehydrochlorinase activity of glutathione s-transferases. *Bulletin of Entomological Research*. 82 (2): 267-274.
- Prapanthadara, L., Koottathep, S., Promtet, N., Suwonkerd, W., Ketterman, A. J. og Somboon, P. 2000. Correlation of glutathione s-transferase and DDT dehydrochlorinase activities with DDT susceptibility in *Anopheles* and *Culex* mosquitoes from northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical medicine and Public Health*. 31: 111-118.
- Ramasubramanian, T. og Regupathy, A. 2004. Pattern of cross-resistance in pyrethroid-selected populations of *Helicoverpa armigera* Hubner (Lep., Noctuidae) from India. *Journal of Applied Entomology*. 128 (9/10): 583-587.
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J. M., Wang, X., Hemingway, J. og Collins, F. H. 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology*. 9 (5): 491-497.
- Ranson, H., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X. L., Roth, C. W., Collins, F. H. og Hemingway, J. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal*. 359: 295-304.
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V., Unger, M. F., Collins, F. H. og Feyereisen, R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*. 298 (5591): 179-181.
- Ranson, H., Paton, M. G., Jensen, B., McCarroll, L., Vaughan, A., Hogan, J. R., Hemingway, J. og Collins, F. H. 2004. Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*. 13 (4): 379-386.
- Rattanarithikul, R. og Panthusiri, P. 1994. Illustrated keys to the medically important mosquitos of Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 25. Supplement 1.
- Raymond, M. og Marquine, M. 1994. Evolution of insecticide resistance in *Culex pipiens* populations: The Corsican paradox. *Journal of Evolutionary Biology*. 7: 315-337.
- Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N. og Chevillon, C. 2001. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica*. 112: 287-296.
- Reid, J. A. 1968. Anopheline mosquitoes of Malaya and Borneo. *Studies from the Institute of Medical Research Federated Malay States*. 31: 1-520.
- Reisen, W. K. og Aslamkhan, M. 1979. A release-recapture experiment with the malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston, with observations on dispersal, survivorship, population size gonothrophic rhythm and mating behaviour. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 73: 251-269.

- Rerkasem, K. og Rerkasem, B. 1995. Montane mainland South-East Asia: agroecosystems in transition. *Global Environmental Change*. 5 (4): 313-322.
- Reuveny, H og Cohen, E. 2004. Resistance of the codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lep., Tortricidae) to pesticides in Israel. *Journal of Economic Entomology*. 128 (9/10): 645-651.
- Roberts, D. R., Laughlin, L. L., Hsueh, P. og Legters, L. J. 1997. DDT, global strategies, and a malaria control crisis in South America. *Emerging Infectious Diseases*. 3 (3): 295-302.
- Robertson, J. L. og Preisler, H. K. 1992. Pesticide bioassay with arthropods. CRC press, Florida, USA. 127 s.
- Rodriguez, M. M., Bisset, J., Ruiz, M. og Soca, A. 2002. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorous insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *Journal of Medical Entomology*. 39 (6): 882-888.
- Rongnoparut, P., Boonsuepsakul, S., Chareonviriyaphap, T. og Thanomsing, N. 2003. Cloning of cytochrome P450, CYP6P5, and CYP6AA2 from *Anopheles minimus* resistant to deltamethrin. *Journal of Vector Ecology*. 28 (2): 150-158.
- Rooker, S., Guillemaud, T., Berge, J., Pasteur, N. og Raymond, M. 1996. Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity*. 77: 555-561.
- Roush, R. T. og Daly, J. C. 1990. The role of population genetics in resistance research and management. S 97-152. I: Roush, R. T. og Tabashnik, B. E. (Red). *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman and Hall, New York, USA. 303 s.
- Roush, T. R. og McKenzie, J. A. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annual Review of Entomology*. 32: 316-380.
- Rowland, M. 1991a. Behaviour and fitness of γ HCH/dieldrin resistant and susceptible female *Anopheles gambiae* and *An. stephensi* mosquitoes in the absence of insecticide. *Medical and Veterinary Entomology*. 5 (2): 193-206.
- Rowland, M. 1991b. Activity and mating competitiveness of gamma-HCH dieldrin resistant and susceptible male and virgin female *Anopheles gambiae* and *An. stephensi* mosquitos, with assessment of an insecticide rotation strategy. *Medical and Veterinary Entomology*. 5 (2): 207-222.
- Russel, R. J., Claudianos, C., Campbell, P. M., Horne, I., Sutherland, T. D. og Oakeshott, J. G. 2004. Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 79: 84-93.
- Service, M. W. 2000. *Medical entomology for students*, 2nd edition. Cambridge university press, Cambridge, UK. 283 s.
- Service, M. W. og Townson, H. 2002. The *Anopheles* vector. S. 59-84. I: Warrel, D. og Gilles, H. M. (Red). *Essential malariology*, 4th edition. Arnold, London, UK. 348 s.
- Sigfried, B. D. og Scharf, M. E. 2001. Mechanisms of organophosphate resistance in insects. S 269-291. I: Ishaaya, I. (Red). *Biochemical sites of insecticide action and resistance*. Springer, Berlin, Germany. 343 s.
- Sinden, R. E. og Gilles, H. M. 2002. The malaria parasites. S 8-34. I: Warrel, D. og Gilles, H. M. (Red). *Essential malariology*, 4th edition. Arnold, London, UK. 348 s.

- Small, G. J. og Hemingway, J. 2000. Molecular characterization of the amplified carboxylesterase gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*. 9 (6): 647-653.
- Somboon, P., Suwonkerd, W. og Lines, J. D. 1994. Susceptibility of Thai zoophilic anophelines and suspected malaria vectors to local strains of human malaria parasites. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 25 (4): 766-770.
- Somboon, P. Prapanthadara, L. og Suwonkerd, W. 2003. Insecticide susceptibility tests of *Anopheles minimus* s. l., *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand. *Southeast Asian Journal of Medicine and Public Health*. 34 (1): 87-93.
- Sonderlund, D. M. og Bloomquist, J. R. 1990. Molecular mechanisms of insecticide resistance. S 58-96. I: Roush, R. T. og Tabashnik, B. E. (Red). *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman and Hall, New York, USA. 303 s.
- Sonderlund, D. M. og Knipfle, D. C. 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 33 (6): 563-577.
- Spielman, A og D'Antonio, M. 2001. *Mosquito; a natural history of our most persistent and deadly foe*. Faber and Faber, London, UK. 256 s.
- Su, T. Y. og Mulla, M. S. 2004. Documentation of high-level *Bacillus sphaericus* 2362 resistance in field populations of *Culex quinquefasciatus* breeding in polluted water in Thailand. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 20 (4): 405-411.
- Sun, C.-N., Huang, H.-Y., Hu, N.-T. og Chung, W.-Y. 2001. Glutathione S-transferases and insect resistance to insecticides. S 239-254. I: Ishaaya, I. (Red). *Biochemical sites of insecticide action and resistance*. Springer, Berlin, Germany. 343 s.
- Sungvornyothin, S., Chareonviviyaphap, T., Prabaripai, A., Thirakhupt, V., Ratanatham, S. og Bangs, M. J. 2001. Effects of nutritional and physiological status on behaviour avoidance of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) to DDT, deltamethrin and lambda-cyhalothrin. *Journal of Vector Ecology*. 26 (2): 202-215.
- Takken, W. 2002. Do insecticide-treated bednets have an effect on malaria vectors? *Tropical Medicine & International Health*. 7 (12): 1022-1030.
- Thapinta, A. og Hudak, P. F. 2003. Use of geographical information systems for assessing groundwater pollution potential by pesticides in Central Thailand. *Environmental International*. 29: 87-93.
- Thompson, M., Shotkoski, F. og French-Constant, R. 1993. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* – Conservation of the gene and resistance-associated mutation with *Drosophila*. *Federation of European Biochemical Societies*. 325 (3): 187-190.
- Throne, J. E., Weaver, D. K., Chew, V. og Baker, J. E. 1995. Probit analysis of correlated data: Multiple observations over time and at one concentration. *Journal of Economical Entomology*. 88 (5): 1510-1512.
- Tomlin, C. D. S. 1997. *The pesticide manual*. British crop protection council, Farnham, UK.
- Torres, E. P., Salazar, N. P., Belizario, V. Y. og Saul, A. 1997. Vector abundance and behaviour in an area of low malaria endemicity in Bataan, the Philippines. *Acta Tropica*. 63 (4): 209-220.

- Torres-Vila, L. M., Rodriguez-Molina, M. C., Lacasa-Plasencia, A. og Bielza-Lino, P. 2002. Insecticide resistance of *Helicoverpa armigera* to endosulfan, carbamates and organophosphates: the Spanish case. *Crop Protection*. 21 (10): 1003-1013.
- Trung, H. D., Van Bortel, W., Sochantha, T., Keokenchanh, K., Briët, O. J. T. og Coosemans, M. 2005. Behavioural heterogeneity of *Anopheles* species in ecologically different localities in Southeast Asia: a challenge for vector control. *Tropical Medicine and International health*. 10 (3): 251-262.
- Vaughan, A., Rodriguez, M. og Hemingway, J. 1995. The independent gene amplification of electrophoretically indistinguishable B-esterases from the insecticide-resistant mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochemical Journal*. 305: 651-658.
- Vulule, J. M., Beach, R. F., Atieli, F. K., Mount, D. L., Roberts, J. M. og Mwangi, R. W. 1996. Long-term use of permethrin-impregnated nets does not increase *Anopheles gambiae* permethrin tolerance. *Medical and Veterinary Entomology*. 10: 71-79.
- Vulule, J. M., Beach, R. F., Atieli, F. K., McAllister, J. C., Brogdon, W. G., Roberts, J. M., Mwangi, R. W. og Hawley, W. A. 1999. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Medical and Veterinary Entomology*. 13: 239-244.
- Weathersbee, A. A. og Meisch, M. V. 1990. Dispersal of *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae) in Arkansas ricelands. *Environmental Entomology*. 19: 961-965.
- Weill, M., Berticat, M., Raymond, M. og Chevillon, C. 2000. Quantitative polymerase chain reaction to estimate the number of amplified esterase genes in insecticide-resistant mosquitoes. *Analytical Biochemistry*. 285: 267-270.
- Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Philips, A., Fort, P. og Raymond, M. 2003. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*. 423: 136-137.
- Weill, M., Berthomieu, A., Berticat, C., Lutfalla, G., Negre, V., Pasteur, N., Phillips, A., Leonetti, J-P., Fort, P. og Raymond, M. 2004. Insecticide resistance: a silent base prediction. *Current Biology*. 14 (14): 552-553.
- WHO. 1975. Manual on practical entomology in malaria. Part II: Method and techniques. Geneva, Switzerland. 191 s.
- WHO. 1992. Vector Resistance to Pesticides. Fifteenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Geneva, Switzerland. 67 s.
- WHO. 1993. A global strategy to control malaria. Geneva, Switzerland. 30 s.
- WHO. 2000a. WHO expert committee on malaria. 20th report. WHO Technical Report Series 892. 71 s.
- WHO. 2000b. Roll Back Malaria: framework for monitoring progress & evaluating outcomes and impact. (WHO/CDS/RBM/2000.25). 28 s.
- WHO. 2003a. Communicable Diseases. Information resources. 9. (WHO/CDS/IRC/2003.2). 22 s.
- WHO. 2003b. Insecticide-treated mosquito nets interventions. A manual for national control programme managers. (WHO/CDS/RBM/2002.45). 130 s.
- WHO. 2005. Malaria control today. Current WHO recommendations. Working document. Geneva, Switzerland. 75 s.
- Williamson, M. S., Martinez-Torres, D., Hick, C. A., Castells, N. og Devonshire, A. L. 1996. Analysis of sodium channel gene sequences in pyrethroid-resistant houseflies - Progress toward a molecular diagnostic for

- knockdown resistance (kdr). Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance ACS Symposium Series. 645: 52-61.
- Wirth, M. C., Delécluse, A. og Walton, W. E. 2004. Laboratory selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* or a component toxin, Cry11B, in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. 41 (3):435-441.
- Wood, R. J. og Bishop, J. A. 1981. Insecticide resistance: Populations and evolution. S 53-96. I: Bishop, J. A. og Cook, L. M. (Red.). Genetic consequences of man made change. Academic Press, London, UK. 409 s.
- Yawson, A. E., McCall, P. J., Wilson, M. D. og Donnelly, M. J. 2004. Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. Medical and Veterinary Entomology. 18 (4): 372-377.
- Yebakima, A., Marquie, M., Rosine, J., Yp-Tcha, M.-M. og Pasteur, N. 2004. Evolution of resistance under insecticide selection pressure in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) from Marinique. Journal of Medical Entomology. 41 (4): 718-725.
- Zhang, H. Y., Yang, C. J., Huang, J.Y. og Lu, L. 2004. Susceptibility of field populations of *Anopheles sinensis* (Diptera : Culicidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. Biocontrol Science and Technology. 14 (3): 321-325.
- Zlotkin, E. 2001. Insecticides affecting voltage-gated ion channels. S 43-76. I: Ishaaya, I. (Red). Biochemical sites of insecticide action and resistance. Springer, Berlin, Germany. 343 s.