

1-1-2000

Determination of Organophosphate Resistance-Dependent Over-produce Esterase Allel Type with Electrophoresis in the Malaria Vector Species *Anopheles sacharovi* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae)

ÜMİT LÜLEYAP

DAVUT ALPTEKİN

HALİL KASAP

MÜLKİYE KASAP

Follow this and additional works at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology>



Part of the [Biology Commons](#)

Recommended Citation

LÜLEYAP, ÜMİT; ALPTEKİN, DAVUT; KASAP, HALİL; and KASAP, MÜLKİYE (2000) "Determination of Organophosphate Resistance-Dependent Over-produce Esterase Allel Type with Electrophoresis in the Malaria Vector Species *Anopheles sacharovi* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae)," *Turkish Journal of Biology*. Vol. 24: No. 5, Article 4. Available at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol24/iss5/4>

This Article is brought to you for free and open access by TÜBİTAK Academic Journals. It has been accepted for inclusion in Turkish Journal of Biology by an authorized editor of TÜBİTAK Academic Journals. For more information, please contact academic.publications@tubitak.gov.tr.

Sıtma Vektörü *Anopheles sacharovi* ve *Culex pipiens* (Diptera:Culicidae) Türlerinde Organofosfat Direncine Bağlı Over-produce Esteraz Allel Tiplerinin Elektroforetik Yöntemle Belirlenmesi*

H. Ümit LÜLEYAP, Davut ALPTEKİN, Halil KASAP, Mülkiye KASAP
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 01330 Adana - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 03.09.1999

Özet : Bu çalışmada, Çukurova (Adana) bölgesinde sıtma vektörü *Anopheles sacharovi* ile *Culex pipiens* türlerine ait organofosfat direncine bağlı over-produce esteraz allel tiplerinin selüloz asetat elektroforezi ile belirlenmesi yapılmıştır. *An. sacharovi*'ye ait bazı arazi örneklerinde, A₂ ve A₅ allel bantları ile birlikte over-produce esteraz ile ilişkisi bilinmeyen ve tanımlanamayan bantlar saptanmıştır. *Culex pipiens* örneklerinde ise over produce esteraz allel tipinin A₂-B₂ formunda olduğu saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Rezistans, Organofosfat, Culicidae, Over-produce Esteraz, Elektroforez

Determination of Organophosphate Resistance-Dependent Over-produce Esterase Allel Type with Electrophoresis in the Malaria Vector Species *Anopheles sacharovi* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae)

Abstract : In this study, over-produce esterase allele types dependent on organophosphate resistance in mosquitoes were determined by cellulose acetate gel electrophoresis in the human malaria vector species *Anopheles sacharovi* and *Culex pipiens* in Çukurova (Adana). We found A₂ and A₅ allele bands with some unknown and unidentified gel bands in some *An. sacharovi* field samples, of which some bands seemed to match with over-produce esterase. We identified A₂-B₂ allele types for all the *Cx. pipiens* samples collected in this study.

Key Words: Resistance, Organophosphate, Culicidae, Over-produce Esterase, Electrophoresis

*Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından Desteklenmiş (TF-98-22) olup araştırmanın bir kısmı Montpellier, Orstom LİN (FRANSA)'de yapılmıştır.

Giriş

Ülke genelinde sıtma insidansının yüksek olduğu Çukurova'da zirai mücadele ve halk sağlığına zararlı, vektör türlerin kimyasal kontrolü amacıyla farklı gruplara özgü insektisitler çok yoğun olarak kullanılmış ve halen de kullanılmaya devam etmektedir (1,2,3,4,5). Örneğin 1995 yılı içinde sadece Adana ilinde zirai mücadelede kullanılan insektisit miktarının yaklaşık 1844 ton olduğu tahmin edilmektedir (6). Kullanılan farklı gruplardan insektisitlere karşı hedef türlerde bu kimyasallara karşı farklı direnç mekanizmalarıyla gelişen direnç problemini de beraberinde getirmektedir. Bu direnç tipleri; a) İnsektisit alımının azaltılması, b) Metabolik kapasiteden (Glutasyon S Transferaz, Genel Esteraz, Oksijenaz ve Spesifik Esterazlar gibi) kaynaklanan dirençlilik ve c) Hedef bölge direnci (Altered=Insensitive, AchE=Asetilkolin Esteraz ve kdr direnci=knock-down resistance) şeklinde olmaktadır. Buna göre direnç; birbirine bağlı ve/veya bağımsız genler tarafından kodlanan enzim, reseptör, ligand veya direnç oluşumunda etkili faktörlerin sadece birinin veya birkaçının katılımıyla meydana gelebilen karmaşık bir olaydır.

Organofosfat direncinde çok büyük rolü olan esterazların, *Culex* türlerinde 3 gen lokusu tarafından kontrol edildiği bulunmuştur (7,8). Bunlar; Esteraz A (Est-3), Esteraz B (Est-2) ve Esteraz C (AchE)'dir. Esteraz A ve B lokusuna ait genin ürünlerinin detoksifikasyonda rol alan karboksil esterazların (EC=3.1.1.1) ve dirençle ilgili allel olan over-produce esterazların senteziyle ilgili olduğu bildirilmiştir (9,10). *Culex* türlerinde yapılan çalışmalarda Esteraz A için 4 farklı elektromorf (A₁, A₂, A₄ ve A₅) allel (7,8,11), Esteraz B için ise 6 farklı elektromorf (B₁, B₂, B₄, B₅, B₆ ve B₇) allel saptanmıştır. Over-produce Esteraz A allelleri için genel bir görüş bulunmamakla birlikte B lokusundaki allellerin, bu lokustaki yapısal genlerin amplifikasyonundan ileri geldiği öne sürülmektedir (12,13). AchE enzimini kodlayan üçüncü lokus için, Dünyanın birçok farklı bölgesinde farklı organofosfat ve karbamat insektisitlere duyarsız (=insensitive) AchE allelinin varlığı bildirilmiş, ancak bu konuda birbirinden bağımsız kaç allelin fonksiyonel olduğu ise kesin olarak bilinmemektedir (14).

Çalışmamızda, *An. sacharovi* ve *Cx. pipiens* türlerinde organofosfat direncine karşı en etkili mekanizma olan over-produce esteraz enzimine ait allel tiplerinin selüloz asetat elektroforez yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Biyolojik materyal olarak arazi popülasyonuna ait 98 adet *An. sacharovi* ve 86 adet *Cx. pipiens* türü kan emmemiş dişi sivrisinek kullanılmıştır. Sadece *An. sacharovi* türüne ait arazi örneklerinin 56 tanesi %5'lik malathion ve %1'lik pirimiphos methyl'in letal dozlarına karşı hassasiyet testine maruz bırakılmış olup ölenler hassas, hayatta kalanlar ise dirençli olarak gruplandırılmıştır. Buna ilave olarak bu türlerin, Anabilim Dalımız insektaryumunda 1983 yılından beri standart koşullarda kolonizasyonu yapılan örnekleri kullanılmıştır (*An. sacharovi* için 48 adet *Cx. pipiens* için ise 41 adet). Ayrıca referans olarak Montpellier (FRANSA)'daki

Dünya Sağlık Örgütü Kolloborasyon ve Vektör Kontrol Merkezinden sağlanan *Cx. pipiens*'in over-produce esteraz allel tipleri için referans ırkları olan; B₁ alleli için TEMR (15), A₁ alleli için BARRIOL (16), A₅-B₅ alleli için CYPRUS (17) ve A₂-B₂ alleli için SELAX (18) örnekleri ile 24 adet organofosfata dirençli *Cx. pipiens*'in KOP strain'i kullanılmıştır.

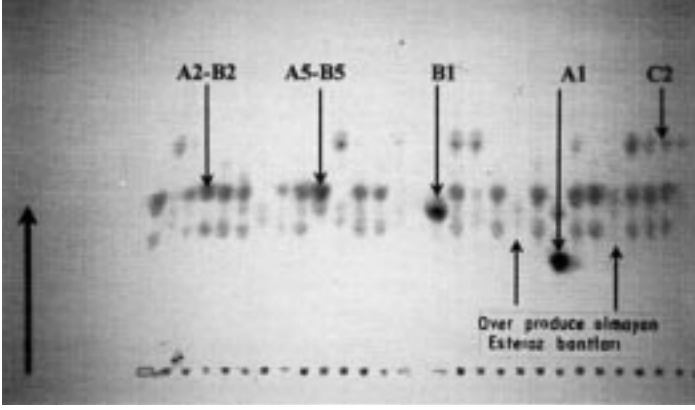
Yaptığımız ön araştırma ve denemelerde, selüloz asetat jel elektroforez sisteminin (HELENA sistem) çalışmamız için çok uygun olduğu belirlenerek, yöntemin Abderrazak ve arkadaşları (19) tarafından yapılan modifikasyonu kullanıldı. Tris-Maleikasıit-EDTA (TME tamponu pH=7.4, 0.1M) tamponunun 1:7 dilüsyonu 30 dakika süreyle asetat jelinin imbibisyonu (emdirilmesi) amacıyla kullanıldı. Elektrot tamponu olarak da dilüsyonsuz TME tamponundan eşit miktarlarda koyarak jelin konulduğu kısım ile tampon bölgesi arasındaki köprü filtre kağıtları ile sağlandı.

Her bir örnek 0.5 ml'lik ependorf tüp içine 10 mikrolitre LSE (sıvı enzim stabilizatörü) tamponu konularak homojenize edildi (Bu işlem esnasında açığa çıkan ısının, enzimin konformasyonel yapısını ve aktivitesini bozmaması için uygulamalar buzlu ortamda yapıldı). Homojenize edilen örneklerden 5'er mikrolitre alınarak aplikatör plağındaki kuyucuklara yerleştirildi. İmbibisyon süresinin sonunda selüloz asetat jelleri kurutularak örneklerin jelle aplikasyonu yapıldı. Güç kaynağı ise 200 Volt ve migrasyon süresi 23 dk olarak ayarlandı. Elektroforez işleminin sonunda 40 mg/ml'de olacak şekilde, asetonda hazırlanan stok esteraz substratları olan alfa ve beta naftilasetat substratlarının 500'er mikrolitrelik volümleri 10 ml fosfat tamponu (pH=6,5) içinde taze olarak hazırlandı. Jeller bununla 2 dk inkübe edildi ve hemen sonra 10 ml fosfat tamponu içinde hazırlanmış Fast Garnett GBC boyası (40 mg/ml) ile boyandı.

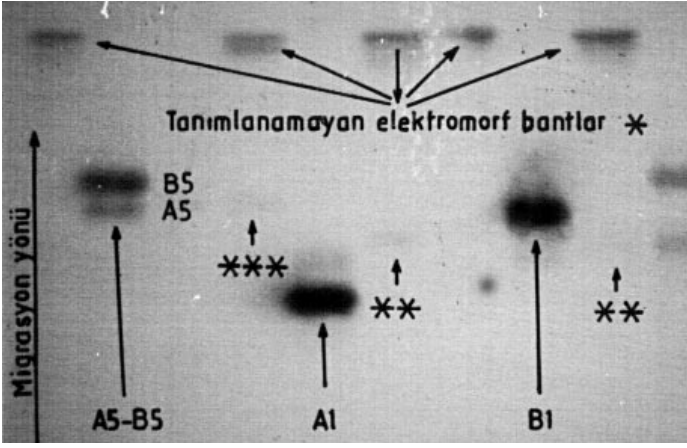
Bulgular

Over-produce esteraz enzimine ait; Fransa'dan sağlanan A₂-B₂, A₅-B₅, B₁, A₁ ve C₂ bantlarını veren referans sivrisinek ırkları, örneklerimizde rastlayabileceğimiz elektromorf allel bantlarının identifikasyonunu yapmak için kontrol olarak kullanıldı (Şekil 1).

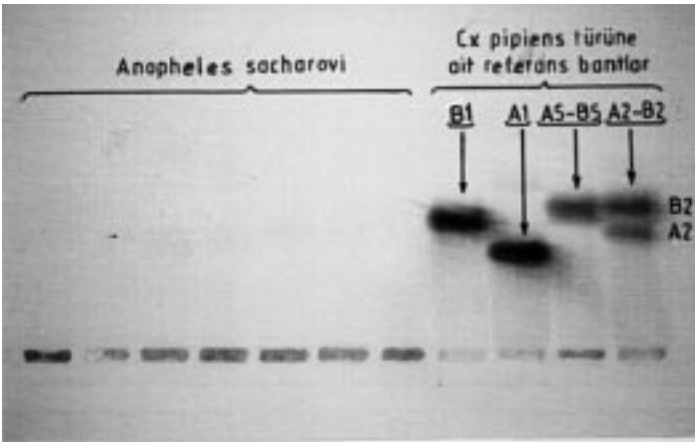
Hassasiyet testlerine maruz bırakılmamış arazi ve koloniye ait *An. sacharovi* örneklerinin çoğunda, organofosfat direncine bağlı over-produce A ve B esteraz allellere rastlanamamıştır. Beş arazi örneğinde (Şekil 2'de * ile işaretli bantların ait olduğu 1,4,6,7, 9 no'lu örneklerde) sadece Asetilkolin Esteraz (Est-C) lokusuna ait allel tipi belirlenemeyen elektromorf bantlar, iki örnekte (6 ve 9 no'lu örneklerde Şekil 2'de ** ile işaretli bantlar), buna ilaveten A₂ alleli ile aynı elektromorf karakterde olan ince bir bant ve sadece bir örnekte (4 no'lu örnekte) tanımlanamayan bant ile birlikte A₅ alleli ile aynı elektromorf karakterde olan ince bantlar (Şekil 2'de ***ile işaretli bant) saptanmıştır. Malathion %5 ve Pirimiphos methyl'in %1'lik letal dozlarına karşı hassasiyet testi yapılan *An. sacharovi* örneklerinin hassas ve dirençli olan bireylerinin tümünde ve koloniye ait hiçbir örnekte over-produce esteraz ile ilgili elektromorf allel bantlar gözlenememiştir (Şekil 3).



Şekil 1. *Cx. pipiens*'e ait A₂-B₂, A₅-B₅, B₁, A₁ ve C₂ over-produce esteraz allellerinin selüloz asetat jel elektroforezindeki görünüşleri (Dr. Fabrice CHANDRA PhD, FRANSA /Montpellier-Orstom-LIN).

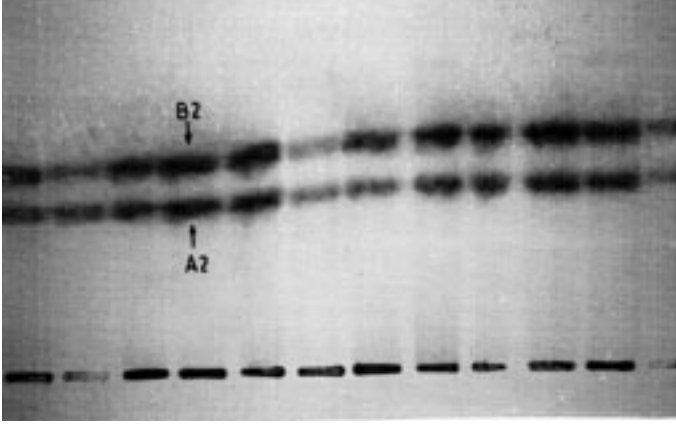


Şekil 2. Over-produce esteraz için *An. sacharovi*'de saptanan bantlar. * 1,4,6,7 ve 9 nolu örneklerde saptanan tanımlanamayan elektromorf bantlar. ** 6 ve 9 nolu örneklerde A₂ ile aynı elektromorf karakterde saptanan bantlar. *** 4 nolu örnekte A₅ ile aynı elektromorf karakterde saptanan bant.

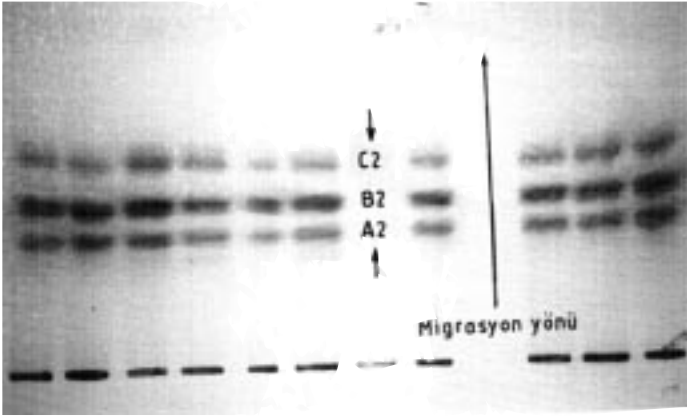


Şekil 3. *An. sacharovi* ve *Cx. pipiens*'de Over-produce Esteraz allellerinin belirlenmesi için yapılan selüloz asetat jel elektroforezi.

Bölgemize ait *Cx. pipiens* örneklerinin büyük bir çoğunluğunda, over-produce esteraz allel tipi olarak A₂-B₂ formunun bulunduğunu (Şekil 4) ve Fransa'dan sağladığımız *Cx. pipiens* türünün KOP strain'ine ait örneklerinde ise A₂-B₂-C₂ formunun bulunduğu saptanmıştır (Şekil 5).



Şekil 4. Adana bölgesine ait *Cx. pipiens* örneklerinde A₂-B₂ formundaki esteraz allel tiplerinin selüloz asetat jel elektroforezindeki görünümü.



Şekil 5. Montpellier orstom/LIN FRANSA'dan sağlanan *Cx. pipiens* türü sivrisineklerin organofosfata dirençli KOP strain'ine ait örneklerinde saptadığımız, A₂-B₂-C₂ formundaki esteraz allel tipinin selüloz asetat jel elektroforezindeki görünümü.

Tartışma ve Sonuç

Dünya genelinde Anofel türleri ile yapılan benzer çalışmalarda, Organofosfat direncine bağlı ender sayıda Over-produce Esteraz alleleline rastlanmıştır (20). Bu nedenle bölgemizde sıtma vektörü olan *An. sacharovi* türünde de over-produce esteraz alleleline rastlanmaması sürpriz değildir. Burada "over-produce", direnç genlerinin ekspresyonu'nun fazla olduğu anlamında kullanılmaktadır (18). Çünkü ekspresyon; ilgili genin kopya sayısı, penetransı ve bunların kontrolü sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle *An. sacharovi* türünde over-produce

esteraz allellerine rastlamamış olmamız bu genin olmadığı veya yeterli kopyasının genomda bulunmadığı veya penetransının yeterli olmadığı anlamına gelebileceği gibi bu direnç tipine alternatif farklı metabolik yolların (karboksilesteraz, fosfotriesteraz, asetilkolinesteraz, glutasyon bağımlı transferazlar ve karışık fonksiyonlu oksidazların) etkisinden veya seleksiyonundan dolayı ilgili genin ekspresyonu baskılanmış olarak da yorumlanabilir. Ancak bu konuda kesin bir şeyler söyleyebilmek için *Culex* türlerinde over-produce esteraz için yapılan allel spesifik oligonükleotid (ASO) ve benzeri moleküler uygulamaların *An. sacharovi*'de de uygulanmasından sonra mümkün olabileceğini düşünmekteyiz (21,22,23).

Arazi popülasyonuna ait olup da hassasiyet testine maruz bırakılmış *An. sacharovi* örnekleriyle yaptığımız denemelerde, over-produce ile ilgili allel bantlarına rastlamamış olmamız, daha önce belirtildiği gibi (7) testten sonra örneklerdeki esteraz enzimlerinin insektisitle bağlanmış olması nedeni ile olabilir. Nitekim hassasiyet testi yapılmamış arazi örneklerinin bazılarında (1,4,6,7 ve 9 no'lu örneklerde) saptanan, elektromorf bantların (* ile işaretli bantların) over-produce esteraz ile ilişkili olduğu belirlenememiş olmakla birlikte insektisit muamelesinin genelde esteraz enzimlerini blokladığı şeklindeki şüphemizi de doğrulamaktadır. Ayrıca, *An. sacharovi*'ye ait bazı arazi örneklerinde saptadığımız tanımlanamamış bantların, over-produce esteraz ile ilişkili olabileceği konusu henüz kesinlik kazanmamıştır. Çünkü, bu tür için elimizde herhangi bir organofosfat insektisine karşı seleksiyon sonucu elde edilmiş genotipi bilinen hassas ve dirençli referans suşu bulunmamaktadır. Bu nedenle hassasiyet test sonucuna dayalı hassas ve dirençli tanımlamalarının ilgili geni heterozigot olarak taşıyan bireylerin popülasyondaki dağılımına bağlı olarak bazen dirençli bazen de hassas gibi davranmasından kaynaklanan bazı sakıncaları bulunmaktadır. Ayrıca iki örnekte (6 ve 9 nolu örneklerde) A_2 ile ve bir örnekte (4 no'lu) ise A_5 ile aynı elektromorf karakterde bantlar elde edilmesi bunların tanımlanamayan bantlarla birlikte co-amplifikasyonunu düşündürmekle birlikte daha kesinlik kazanması için, seleksiyonu yapılmış referans örneklerle yapılacak popülasyon genetiği çalışmalarının allel tip tayiniyle birlikte daha fazla bilgi vereceğini düşünmekteyiz.

Tüm Akdeniz ülkelerindeki *Cx. pipiens* popülasyonlarında yaygın olarak A_2 - B_2 allellerine rastlanmaktadır. Bu durumu açıklayan iki görüş vardır. Birincisi; önce allel gen amplifikasyonu meydana gelmiş, daha sonra da organofosfat direnci aracılığıyla allelin çok geniş bir alana yayıldığı biçimindedir. İkincisi ise öncelikle amplifiye olmamış allellerin göç ettiği daha sonra bunların birbirinden bağımsız olarak organofosfat kullanılan çok değişik bölgelere yayılmış olmasıdır (10,21,22). *Cx. pipiens* türünde çalışmamızda bulduğumuz allel formunun, A_2 - B_2 yapısında olması iki senaryo ile açıklanmaya çalışılan görüşler ile de uyum içindedir (17,21). Ancak, bu görüşlerden hangisinin bulgularımıza daha uygun olduğunun saptanması için, esteraz allelleri için allel tipi benzerlik gösteren farklı coğrafyadaki ülkelere ait aynı türlerdeki akrabalığın saptanması/saptanamaması amacıyla tüm genoma ve over-produce esteraz lokuslarına yönelik RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) tekniğine dayalı moleküler çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Gökberk C. Increase in incidence of malaria cases in Adana region Turkey on the resistance of vector *An. sacharovi* to insecticides. Riv Malariol, 38:197-211, 1959.
2. Ramsdale CD. Insecticide resistance in the Anopheles of Turkey. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 69:226-235, 1975.
3. Ramsdale CD, Herath PRJ and Davidson G. Recent developments of insecticide resistance in some Turkish Anophelines. J Trop Med Hyg, 83:11-19, 1980.
4. Kasap M. İnsektisitler ve vektör kontrolünde kullanılmaları. VI. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özel Sayı, 13(2):209-226, 1989.
5. Kasap H, Kasap M, Akbaba M, Alptekin D, Demirhan O, Lüleyap Ü and Pazarbaşı A. Residual efficacy of Pirimiphos methyl (Actellic) on *Anopheles sacharovi* in Çukurova Turkey. J Am Mosq Cont Assoc, 8(1):47-51, 1992.
6. Lüleyap Ü. Çukurova Bölgesindeki Sivrisineklerde Gelişen Fizyolojik İnsektisit Direncinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1996.
7. Pasteur N, Iseki A and Georghiou GP. Genetic and Biochemical studies of the highly active esterases A and B associated with organophosphate resistance in Mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. Biochem Genet, 19:909-919, 1981.
8. Georghiou GP. In insecticides: Mechanism of action and resistance. Andover, 407-408, 1992.
9. Fournier D, Bride JM, Mouches C, Raymond M, Magnin M, Berge JM, Pasteur N and Gerghiou GP. Biochemical characterisation of the esterases A1 and B1 associated with organophosphate resistance in the *Cx. Pipiens* complex. Pestic Biochem Physiol, 27:211-217, 1987.
10. Mouches C, Magnin M, Berge JB, De Silvestri M, Beysaat V, Pasteur N and Georghiou GP. Over production of detoxifying esterases in organophosphate resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. Proc Natl Acad Sc, USA, 84:2113-2116, 1987.
11. Xu J, Qu F and Liu W. Diversity of amplified esterase B genes responsible for organophosphate resistance in *Culex quinquefasciatus* from China. J Med Coll PLA, 9:20-23, 1994.
12. Raymond M, Beysaat-Arnaouty V, Mouches C, Georghiou GP and Pasteur N. Diversity of the amplification of various esterases B responsible for organophosphate resistance in *Culex* mosquitoes. Biochem Genet, 27:417-423, 1989.
13. Mouches C, Pasteur N, Berge-Jean B, Hynien O, Raymond M and Georghiou GP. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* Mosquitoes. Science, 233:778-780, 1986.
14. Bisset JA, Rodriguez MM, Hemingway J, Diaz C, Small GJ and Ortiz E. Malathion and Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba. Med Vet Entomol, 5:223-228, 1991.
15. Georghiou GP, Pasteur N and Hawley MK. Linkage relationship between organophosphate resistance and highly active esterase B in *Culex quinquefasciatus* from California. J Econ Entomol, 23:301-305, 1980.
16. Chevillon C, Pasteur N, Marquine M, Heyse D and Raymond M. Population structure and dynamics of selected genes in the mosquito *Culex pipiens*. Evolution, 49:997-1007, 1995.
17. Poirre M, Raymond M and Pasteur N. Identification of two distinct amplifications of the esterase B locus in *Culex pipiens* mosquitoes Mediterranean countries. Biochem Genet, 30:13-21, 1992.

18. Wirth MC, Marquine M, Georghiou GP and Pasteur N. Esterases A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) role in organophosphate resistance and linkage. J Med Entomol, 27:202-206, 1990.
19. Abderrazak SB, Guerrini F, Mathieu-Daude F, Truc P, Neubauer K, Lewicka K, Barnabe C and Tibayrenc M. Isoenzyme electrophoresis for parasite characterisation. Methods in Molecular Biology Humana-Totowa, 21:361-382, 1993.
20. Georghiou GP and Pasteur N. Electrophoretic Esterase patterns in insecticide resistant and susceptible Mosquitoes. J Econ Entomol, 71(2):201-205, 1978.
21. Raymond M, Callaghan A, Fort P and Pasteur N. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in Mosquitoes. Nature, 350:151-153, 1991.
22. Raymond M, Qiao CL and Callaghan A. Esterase polymorphism in insecticide susceptible populations of the mosquito *Culex pipiens*. Genet Res, 67:19-26, 1995.
23. Qiao GL and Raymond M. The esterase B1 haplotype is amplified in insecticide resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex from the Americas and China. Heredity, 74:339-345, 1995.