

La resistenza agli insetticidi fosfororganici in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) e prima segnalazione della presenza delle esterasi A5-B5 in Italia

Carlo SEVERINI (a), Roberto ROMI (a), Renato ZAMBURLINI (b), Valeria DI PARDO (a),
Marino MARINUCCI (a) e Gaudenzio PIERDOMINICI (a)

(a) Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento per la Protezione delle Piante, Università degli Studi, Udine

Riassunto. - Dopo una breve descrizione delle problematiche riguardanti i fenomeni di resistenza agli insetticidi, con particolare riferimento alle zanzare, vengono riportati i risultati di uno studio sui livelli di sensibilità agli insetticidi fosfororganici condotto su due popolazioni di *Culex pipiens* L. provenienti dal Triveneto. Mediante elettroforesi su gel d'amido sono state individuate le esterasi non specifiche A1 e A4-B4 o A5-B5. Al fine di distinguere tra queste ultime due, è stata effettuata l'analisi dei polimorfismi della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP analysis) del locus esterasico B. Nel campione proveniente da Lignano è stato possibile identificare l'aplotipo A5-B5, che conferisce una forte resistenza ai fosfororganici e che viene segnalato per la prima volta al di fuori dell'isola di Cipro.

Parole chiave: esterasi, *Culex pipiens*, resistenza agli insetticidi, RFLP analisi.

Summary (*Insecticide resistance in Italian *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) field populations*). - After a short review on insecticide resistance in mosquitoes, the results of a study on organophosphate (OP) resistance, carried out on 2 *Culex pipiens* L. field populations from North-eastern Italy, are reported. The A1 and A4-B4 or A5-B5 esterases were detected in our sample by starch gel electrophoresis. In order to differentiate between A4-B4 and A5-B5 esterases, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis at the esterases B locus was performed: both A4-B4 and A5-B5 aplotypes were found in one of the studied populations. This is the first record of A5-B5 esterases in continental Europe.

Key words: esterases, *Culex pipiens*, insecticide resistance, RFLP analysis.

Introduzione

Gli insetti costituiscono una delle classi più importanti del regno animale, sia per numero di specie (sono circa 850 000 quelle finora descritte), sia per densità delle popolazioni. Solo una piccola parte di essi sono nocivi per l'uomo, sia direttamente come vettori di agenti patogeni, sia indirettamente come parassiti di coltivazioni e di animali domestici. Combattere gli insetti è dunque una necessità cui l'uomo si è dedicato fin dall'antichità, sebbene i mezzi più potenti, gli insetticidi organici di sintesi, siano diventati di uso comune solo dopo la seconda guerra mondiale. La comparsa dei primi casi di resistenza verso queste molecole ha però seguito molto rapidamente il loro impiego su vasta scala [1]. Nel 1973 la World Health Organization (WHO) riportava l'esistenza di 104 specie di artropodi resistenti ad insetticidi [1]; attualmente la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) ha censito in oltre 500 specie gli artropodi resistenti [2].

Tra gli insetti di interesse sanitario le zanzare (Diptera: Culicidae) ricoprono certamente il ruolo più importante come vettori di agenti patogeni responsabili di malattie quali la malaria, la filariosi, la febbre gialla e la dengue, che hanno una ricaduta enorme sulla sanità pubblica e sull'economia di molti paesi tropicali. Per questo motivo alcune specie di zanzare sono state utilizzate come modello per studi avanzati, tra cui quelli riguardanti le basi genetiche della resistenza [3].

In una popolazione di zanzare l'insorgere di fenomeni di resistenza si manifesta sul campo con la sopravvivenza di parte degli individui al trattamento insetticida; l'aumento della dose di insetticida ristabilisce inizialmente i livelli di mortalità, fino al momento in cui il prodotto può divenire completamente inefficace. La resistenza ad un certo prodotto insetticida si individua in laboratorio per mezzo di saggi tossicologici, che consistono nell'osservare la mortalità provocata da dosi crescenti di insetticida sulla specie bersaglio [4]. Ogni popolazione di zanzare viene così caratterizzata da una

curva dose/mortalità che può essere confrontata con quella di una popolazione sensibile di riferimento [5]. Questo paragone permette di esprimere il tasso di resistenza, parametro molto variabile all'interno delle varie popolazioni.

I fattori che determinano l'insorgere della resistenza ad un certo insetticida sono principalmente di tipo genetico. I meccanismi che intervengono nel determinare la resistenza sono essenzialmente tre [6]: 1) la ridotta penetrazione dell'insetticida attraverso la cuticola dell'insetto fino al sito bersaglio, dovuta a mutazione dei tessuti (chitina); 2) la ridotta sensibilità del sito bersaglio che non lega più la molecola di insetticida; 3) l'inattivazione e la metabolizzazione della molecola insetticida da parte di enzimi specifici. Questi ultimi due meccanismi, in particolare l'ultimo, sono responsabili dei fenomeni di resistenza nella gran parte degli insetti [6]. Una volta identificata la natura dei meccanismi che conferiscono la resistenza a un certo individuo, è importante conoscere l'evoluzione del fenomeno nell'intera popolazione di insetti. Molto schematicamente si può dire che in presenza di un insetticida gli individui portatori di un gene di resistenza hanno una maggiore probabilità di sopravvivere, e dunque si riproducono mediamente più dei portatori di geni sensibili. Se la pressione selettiva è continua, la loro proporzione aumenta di generazione in generazione, fino a che la popolazione sarà teoricamente composta da soli individui omozigoti per il gene della resistenza. La resistenza delle zanzare ai fosfororganici (gli insetticidi attualmente più impiegati nelle attività di controllo) è principalmente dovuta all'aumento della attività di una classe di enzimi, le esterasi non specifiche; fino ad oggi ne sono state identificate 10, codificate da due loci, A e B, strettamente associati tra di loro e così chiamati in relazione alla affinità per il substrato, rispettivamente α e β naftilacetato [7].

In particolare la zanzara *Culex pipiens* Linneo 1758, che nel nostro paese è la più comune delle zanzare sinantropiche, è stata oggetto in questi ultimi anni di numerosi studi riguardanti i meccanismi responsabili della resistenza agli insetticidi in popolazioni di diverse aree geografiche [8]. Anche in *C. pipiens* la sovrapproduzione di esterasi non specifiche è il meccanismo più comune di resistenza agli esteri fosforici. Da recenti studi è emerso che solo tre loci hanno sviluppato importanti alleli conferenti resistenza agli insetticidi [8-10]. I primi due loci (esterasi A e B) codificano per delle idrolasi detossificanti che risultano poi sovraprodotte nel genotipo resistente [11]. La sovrapproduzione di esterasi è il risultato sia di una amplificazione genica, meccanismo che consiste nell'aumento del numero di copie del gene codificante per l'enzima, raggruppate su uno stesso cromosoma [9, 12, 13], sia di una regolazione del gene implicato [14]. In alcune situazioni le esterasi A e B sono co-amplificate, cosa che spiega la stretta associazione

statistica di alcuni elettromorfi, come ad esempio nel caso dell'aplotipo A2-B2 [14]. Attraverso l'analisi elettroforetica su gel d'amido è stato possibile descrivere cinque diversi elettromorfi al locus dell'esterasi B e tre a quello dell'esterasi A [8-10]. Il terzo locus, Ace, codifica per una acetilcolinesterasi insensibile all'insetticida [15], ma sebbene numerosi alleli siano stati descritti all'interno di varie popolazioni di *C. pipiens* [16, 17], non si sa quanti alleli resistenti Ace si siano evoluti indipendentemente.

Alcune di queste esterasi, come ad esempio l'aplotipo A2-B2, sono state rinvenute in popolazioni di culicidi di quattro continenti [18, 19], mentre altre esterasi hanno una distribuzione più limitata, come l'aplotipo A5-B5 descritto prima di questo studio soltanto nell'isola di Cipro [9].

In Italia, precedenti ricerche condotte in diverse zone del territorio su popolazioni naturali di *C. pipiens* hanno evidenziato la presenza delle esterasi A1, A2-B2 e A4-B4 [20-24], sebbene A2-B2 sia probabilmente scomparsa, o comunque presente ad una frequenza bassissima, dalla zona dove era stata descritta per la prima volta [23].

Questo lavoro mostra i risultati di una ricerca effettuata su due popolazioni di *C. pipiens* in una ristretta zona del litorale veneto-friulano, tra Mestre (VE) e Lignano Sabbiadoro (UD) durante l'estate del 1995, dove già da alcuni anni una popolazione naturale di *C. pipiens* aveva mostrato un notevole grado di resistenza al temephos [25]. Per la prima volta viene segnalata la presenza di A5-B5 al di fuori dell'isola di Cipro.

Materiali e metodi

I campioni delle due popolazioni di *C. pipiens* oggetto del presente studio sono stati raccolti durante l'estate del 1995. La popolazione di Lignano proviene da una vasca della stazione di depurazione delle acque, situata alla periferia della cittadina. La popolazione di Trivignano (VE) proviene da una canaletta che raccoglie acque bianche lungo la strada statale 245 per Mestre, immediatamente prima dell'ingresso nel centro abitato. I saggi di sensibilità agli insetticidi sono stati effettuati secondo la metodica standard proposta dalla WHO [5], impiegando oltre 1000 larve di fine 3° - inizio 4° stadio. Gruppi di 20 larve sono stati esposti per 24 ore a concentrazioni diverse di due insetticidi fosfororganici (temephos e chlorpyrifos). Per ogni concentrazione utilizzata sono state impiegate tre repliche. Come popolazione di riferimento è stato utilizzato il ceppo sensibile *C. pipiens* ISS, mantenuto in allevamento presso il Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Superiore di Sanità. La mortalità, calcolata dopo 24 ore, è stata corretta con la formula di Abbot, e la dose letale 50 (DL₅₀) è stata calcolata con un apposito programma per personal computer.

Tabella 1. - Sensibilità di due popolazioni di *Culex pipiens* del Triveneto ad insetticidi fosfororganici (1995)

Popolazione	Insetticida	DL ₅₀ (*)	Slope	χ^2	GdL	R/S
Lignano	Temephos	0,030	4,55	1,001	2	200
	Chlorpyrifos	0,029	2,46	0,676	2	67
Trivignano	Temephos	0,003	2,12	0,445	3	20
	Chlorpyrifos	0,005	2,17	2,062	5	12
ISS (**)	Temephos	0,00015	1,78	0,286	2	-
	Chlorpyrifos	0,00043	1,77	0,335	2	-

(*) Espressa in mg/litro.

(**) Ceppo sensibile di riferimento mantenuto in allevamento presso l'Istituto Superiore di Sanità.

GdL: grado di libertà.

R/S: rapporto resistenti (R)/ sensibili (S).

L'identificazione delle esterasi è stata effettuata mediante elettroforesi su gel d'amido di singole zanzare adulte [23] ottenute in laboratorio da larve raccolte sul campo nelle aree sopra descritte.

La ricerca dei genotipi portatori di acetilcolinesterasi (ACE) insensibile è stata effettuata per mezzo del test TEP [26].

L'identificazione dei geni che codificano per le esterasi è stata realizzata mediante RFLP (restriction fragment length polymorphism) su singole zanzare adulte [24]. Il DNA è stato estratto da singola zanzara secondo il metodo descritto da Raymond e Marquine [26] e digerito con l'enzima di restrizione EcoRI che produce differenti pattern di RFLP per gli alleli presenti al locus B [9]. L'elettroforesi su gel d'agarosio, il *Southern blotting*, la marcatura della sonda (1.3 Kb cDNA dell'esterasi B1) [27], l'ibridazione e l'autoradiografia sono stati realizzati come descritto in Raymond *et al.* [28].

Per i saggi biochimici e molecolari sono stati utilizzati i seguenti ceppi di riferimento di *C. pipiens*: Barriol (Est A1), SeLax (Est A2-B2), VIM (Est A4-B4) e Cyprus (Est A5-B5) [9, 26], forniti dal Laboratorio di Genetica ed Ambiente, Università di Montpellier, Francia.

Risultati e discussione

In Tab. 1 sono riportati i valori di sensibilità a due insetticidi fosfororganici da parte delle due popolazioni studiate. La popolazione di Lignano mostra una elevata resistenza al chlorpyrifos (200 volte rispetto al ceppo sensibile) ed al temephos (67 volte).

La popolazione di Trivignano mostra invece una ridotta sensibilità al temephos (20 volte rispetto al ceppo sensibile) ed al chlorpyrifos (12 volte). I valori relativi alla DL₅₀ del temephos per la popolazione di Lignano sono del tutto simili a quelli riportati nel 1989-90 per la stessa popolazione da Zamburlini e Bellantone [25]; questo suggerisce che i livelli di resistenza siano rimasti stabili nel corso degli ultimi 5-6 anni.

L'analisi attraverso elettroforesi su gel d'amido ha rilevato la presenza in entrambe le popolazioni di esterasi A4-B4 o A5-B5, (che hanno la stessa velocità di migrazione e pertanto risultano indistinguibili per mezzo di questa tecnica) e A1. Per quanto riguarda le frequenze di queste esterasi nelle due popolazioni studiate, A4-B4 o A5-B5 è presente rispettivamente con il 90,7% (39/43) nella popolazione di Lignano ed il 90,3% (28/31) in quella di Trivignano, mentre A1 è presente con il 16,3% (7/43) a Lignano ed il 16,1 (5/31) a Trivignano.

Inoltre la determinazione dei genotipi portanti ACE insensibile ha permesso di stabilire che nella popolazione di Lignano il 10% delle zanzare studiate (3/30) è portatore di una acetilcolinesterasi modificata mentre la popolazione di Trivignano mostra una frequenza del 28% (12/42). Mentre le frequenze delle esterasi identificate e dei genotipi ACE insensibile giustificano i livelli di ridotta sensibilità ai fosfororganici (in particolare al temephos) della popolazione di Trivignano, al contrario non sono sufficienti a spiegare la presenza degli elevati livelli di resistenza riscontrati nella popolazione di Lignano.

L'impiego della tecnica RFLP ha permesso quindi di identificare la presenza di A5-B5 nella popolazione di Lignano (20 esemplari su 39 totali esaminati, pari al 51,2%) oltre ad A4-B4 (4/39, pari al 10,2%), mentre ha confermato l'esistenza del solo aplotipo A4-B4 nella popolazione di Trivignano (11/20, pari al 55%). La possibilità di discriminare a livello molecolare tra i due aplotipi riveste una notevole importanza in quanto solo A5-B5 conferisce elevati livelli di resistenza agli organofosfati [9] come quelli riscontrati nella popolazione di Lignano.

L'individuazione dell'aplotipo A5-B5 a Lignano Sabbadoro indica che queste esterasi hanno cominciato a diffondersi nell'area mediterranea sicuramente attraverso migrazione passiva delle zanzare che la possiedono, sfruttando i trasporti internazionali di carichi commerciali. A questo proposito ben documentata è la situazione dell'esterasi amplificata B2: le sequenze di

DNA comprendenti il gene codificante e le regioni limitrofe, ricavate da popolazioni di *C. pipiens* di Asia, Africa e Nord America, sono state paragonate tra loro (analisi delle mappe di restrizione) e trovate identiche [18]. Si è potuto così affermare che l'amplificazione di questo gene si è prodotta una sola volta e che la sua distribuzione geografica attuale è dovuta ad una rapida migrazione su larga scala delle zanzare portatrici [3]. La recente apparizione dell'aplotipo A5-B5 in Italia nella zona di Lignano offre quindi una nuova opportunità di documentare e studiare sia i processi coinvolti in queste "invasioni genetiche", sia i meccanismi che regolano la diffusione dei geni responsabili della resistenza agli insetticidi in *C. pipiens*. Ci auguriamo che queste conoscenze permettano in futuro di mettere a punto nuove tecniche per in controllo dei Culicidi, ed in particolare di *C. pipiens*.

Ricevuto il 26 giugno 1996.

Accettato il 5 novembre 1996.

BIBLIOGRAFIA

- BROWN, A.W.A. & PAL, R. 1973. *Resistance des arthropodes aux insecticides*. World Health Organization, Geneva. (WHO Monograph, 38).
- GEORGHIOU, G.P. & LAGUNES-TEJEDA, A. 1991. *The occurrence of resistance to pesticides in arthropods*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Riverside, USA.
- POIRIÈ, M. & PASTEUR, N. 1991. La resistance des insectes aux insecticides. *La Recherche* 22: 874-882.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1976. *Criteria and meaning of tests for determining the susceptibility or resistance of insects to insecticide*. WHO, Geneva. (WHO/VBC/76.2).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1981. *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. WHO, Geneva. (WHO/VBC/81.807).
- Pest resistance to pesticides*. 1983. G.P. Georgiou & T. Saito (Eds). Plenum Press, New York and London.
- PASTEUR, N., ISEKI, A. & GEORGHIOU, G.P. 1981. Genetic and biochemical studies on the highly active esterases A' and B associated with organophosphate resistance in the *Culex pipiens* complex. *Biochem. Genet.* 19: 909-919.
- PASTEUR, N. & RAYMOND, M. 1996. Insecticide resistance genes in mosquitoes. Their mutations, migration and selection in field populations. *J. Hered.* 87: 444-449.
- POIRIÈ, M., RAYMOND, M. & PASTEUR, N. 1992. Identification of two distinct amplifications of the esterase B locus in *Culex pipiens* (L.): mosquitoes from Mediterranean countries. *Biochem. Genet.* 30:13-26.
- GEORGHIOU, G.P. 1992. World distribution of esterases involved in organophosphate insecticide resistance in *Culex* mosquitoes, and methods for detection. In: *Insecticides: mechanism of action and resistance*. D. Otto & B. Weber (Eds). Intercept, Andover. p. 407-408.
- MOUCHÈS, C., PASTEUR, N., BERGÉ, J.B., HYRIEN, O., RAYMOND, M., ROBERT DE SAINT VINCENT, B., DE SILVESTRI, M. & GEORGHIOU, G.P. 1986. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science* 233: 778-780.
- MOUCHÈS, C., MAGNIN, M., BERGER, J.B., DESILVESTRI, M., BEYSSAT V., PASTEUR N. & GEORGHIOU, G.P. 1987. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes, and their presence in other insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2113-2116.
- VAUGHAN, A., RODRIGUEZ, M. & HEMINGWAY, J. 1995. The independent gene amplification of electrophoretically indistinguishable B esterases from the insecticide-resistant mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem. J.* 305: 651-658.
- ROOKER, S., GUILLEMAUD, T., BERGÉ, J., PASTEUR, N. & RAYMOND, M. 1996. Coamplification of A and B esterase genes as a single unit in the mosquito *Culex pipiens*. *Heredity* 77: 555-561.
- FOURNIER, D., BRIDE, J.M., HOFFMANN, F. & KARCH, F. 1992. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. *J. Biol. Chem.* 267: 14270-14274.
- BISSET, J.A., RODRIGUEZ, M.M., HEMINGWAY, J., DIAZ, C., SMALL, G.J. & ORTIZ, E. 1991. Malathion and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba: efficacy of pirimiphos-methyl in the presence of at least three resistance mechanisms. *Med. Vet. Entomol.* 5: 223-228.
- BOURGUET, D., CAPELA, R. & RAYMOND, M. 1996. An insensitive acetylcholinesterase in *Culex pipiens* L. mosquitoes from Portugal. *J. Econ. Entomol.* 89(5): 1060-1066.
- RAYMOND, M., CALLAGHAN, A., FORT, P. & PASTEUR, N. 1991. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* 350: 151-153.
- RIVET, Y., MARQUINE, M. & RAYMOND, M. 1993. French mosquito populations now invaded by insecticide resistant A2-B2 esterase. *Biol. J. Linn. Soc.* 49: 249-255.
- VILLANI, F., ROMI, R., CUOCI, L. & MAJORI, G. 1986. Indagini sulla resistenza agli esteri fosforici in popolazioni italiane di *Culex pipiens*. *Ann. Ist. Super. Sanità* 22: 285-288.
- BONNING, B. C., HEMINGWAY, J., ROMI, R. & MAJORI, G. 1991. Interaction of insecticide resistance in field population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Italy in response to changing insecticide selection pressure. *Bull. Entomol. Res.* 81: 5-10.
- MARCHI, A. & ADDIS, G. 1990. Resistenza agli insetticidi organofosfati in popolazioni sarde di *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Parassitologia* 32: 177-178.
- SEVERINI, C., ROMI, R., MARINUCCI, M. & RAYMOND, M. 1993. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from Italy. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9: 164-168.
- SEVERINI, C., MARINUCCI, M. & RAYMOND, M. 1994. Insecticide resistance genes in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Italy: esterase B locus at the DNA level. *J. Med. Entomol.* 31: 496-499.

25. ZAMBURLINI, R. & BELLANTONE, P. 1993. Resistenza agli insetticidi fosfororganici Temephos e Malathion in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) nel litorale adriatico friulano. *Parassitologia* 35: 11-15.
26. RAYMOND, M. & MARQUINE, M. 1994. Evolution of insecticide resistance in *Culex pipiens* populations: the Corsican paradox. *J. Evol. Biol.* 7: 315-337.
27. MOUCHÉS, C., PAUPLIN, Y., ARGAWAL, M., LEMIEUX, L., HERZOG, M., ABADON, M., BEYSSAT-ARNAOUTI, V., HYRIEN, O., ROBERT DE SAINT VINCENT, B., GEORGHIU, G.P. & PASTEUR, N. 1990. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2574-2578.
28. RAYMOND, M., BEYSSAT-ARNAOUTHY, V., SIVASUBRAMANIAN, N., MOUCHÉS, C., GEORGHIU, G.P. & PASTEUR, N. 1989. Diversity of the amplification of various esterases B responsible for organophosphate resistance in *Culex* mosquitoes. *Biochem. Genet.* 27: 417-423.