



## Slutrapport for projektet

# Insekticidresistens hos danske hovedlus

**Michael Kristensen, Anne-Marie Rasmussen, Mette Knorr og Jørgen B. Jespersen**

**Skadedyrlaboratoriet, Afdeling for Plantebeskyttelse og Skadedyr,  
Danmarks JordbrugsForskning**

**September 2005**

Forskningscenter Flakkebjerg  
Flakkebjerg, 4200 Slagelse  
Tlf.: 8999 3500  
Fax: 8999 3501  
EAN-nr.: 5798000877504

Skadedyrlaboratoriet  
Skovbrynet 14, 2800 Kgs. Lyngby  
Tlf.: 4587 8055/8999 3900  
Fax: 4593 1155  
EAN-nr.: 5798000877597  
www.dpil.dk

CVR-nr.: 57607556  
www.agrsci.dk  
E-mail:  
SSL.DJF@agrsci.dk

## Forord

Dette projekt er finansieret af Indenrigs- og Sundhedsministeriet på basis af en uopfordret ansøgning fra Statens Skadedyrlaboratorium. Ansøgningen blev udarbejdet som følge af, at vi var blevet opmærksomme på, at der i befolkningen var en bekymring omkring og en opfattelse af, at hovedlus var et stigende problem. Projektet "Hovedlus: epidemiologi og insekticidresistens." blev accepteret i foråret 2003, og forløb fra august 2003 til august 2005.

Fra Sundhedsstyrelsens hjemmeside:

**Lørdag 7. juni 2003**

### **Sundhedsministeren til kamp mod lus**

Nu skal luseplagen i danske skoler og daginstitutioner bekæmpes.

Derfor har indenrigs- og sundhedsminister Lars Løkke Rasmussen (V) besluttet at bruge 1,2 millioner kroner til et toårigt luse-forskningsprojekt. Projektet skal dykke ned og studere, hvorfor og i hvor høj grad hovedlus er modstandsdygtige over for de lægemidler, der bruges mod lus i dag.

I et svar på et spørgsmål fra formanden for Folketingets sundhedsudvalg, Birthe Skaarup (DF), skriver ministeren, at forskningsresultatet bagefter skal bruges i en landsdækkende strategi til behandling af lus.

- Hovedlus volder store problemer i Danmark, og problemet har været stigende i 90'erne, fastslår Lars Løkke Rasmussen.

Andre europæiske undersøgelser viser udbredt resistens hos lus, så derfor forholder det sig nok på samme måde i Danmark, mener ministeren.

Det er Statens Skadedyrlaboratorium, der skal finde tættekammen frem i luseforskningen, som gennemføres i samarbejde med Lægemiddelstyrelsen og Sundhedsstyrelsen. /DR-online

Statens Skadedyrlaboratorium er i den mellemliggende periode fusioneret med Danmarks JordbrugsForskning, hvor arbejdet er fortsat i forskergruppen "Skadedyrlaboratoriet", som er en del af Afdeling for Plantebeskyttelse og Skadedyr.

Denne rapport præsenterer hovedlinierne i hovedlus-projektets forløb og resultater af undersøgelsen. Resultater vil efterfølgende blive skrevet sammen til publikationer i internationale "peer review" tidsskrifter, hvilket allerede er sket i ét tilfælde (Kristensen 2005).

Der skal rettes en tak til sundhedsplejersker, skoler, SFO'er, børnehaver, efterskoler og forældre, som har hjulpet os eller stillet sig til rådighed for vores undersøgelse, og frem for alt takkes de mange børn rundt omkring i landet, som har ladet sig kæmme. Desuden takkes Snatchers Company A/S for at forsyne os med filtre og hovedlus i projektets indledende fase.

Kristian Hansen, Gitte Jensen og Claus Dahl samt luseprojektets øvrige medarbejdere takkes for en stor indsats, og øvrige kolleger ved Skadedyrlaboratoriet takkes for deres tålmodighed med os og interesse for projektet.

## Indholdsfortegnelse

Forord.....	2
Sammendrag.....	4
Indledning.....	7
Litteraturoversigt over resistens mod lusemidler.....	8
Etablering af toksikologisk metode til måling af malathion- og permethrin- resistens hos hovedlus.....	9
Indsamling af hovedlus.....	12
Resistens hos danske hovedlus.....	15
Bestemmelse af permethrin-resistens ved molekylær metode.....	18
Diskussion og konklusion vedr. resistens hos danske hovedlus .....	20
Data og erfaringer med hovedlus fra indsamlingerne .....	21
Strategi til forebyggelse og behandling mod hovedlus.....	26
Referencer.....	28
Appendiks 1-6.....	30

## Sammendrag

Der har i de senere år været fokus på stigende problemer med behandlingen af hovedlus. På trods af åbenhed omkring lus, et højt informationsniveau og en målrettet indsats på mange skoler og institutioner bliver problemet ikke løst på en tilfredsstillende måde. Forældre, sundhedsplejersker, læger og apotekspersonale har længe efterlyst mere viden på området, så vejledning om og behandling af hovedlus bliver så effektiv som mulig. En forklaring på de vedvarende luseproblemer kan være, at hovedlusene er blevet resistente over for de insektmiddelholdige lægemidler, som bliver anvendt til behandling. Andre faktorer såsom forkert anvendelse af de forskellige typer eksisterende lusemidler (herunder kæmning), manglende behandling og utilstrækkelig viden om hovedlusenes smitteveje og overlevelse i omgivelserne kan også have betydning for problemets omfang.

Hovedlus er ikke under mistanke for at overføre sygdomme, men de kan forårsage stærk kløe og irritation af hovedbunden, og kradsede lusebid kan blive indfaldsvej for bakterier og føre til eksemmer. Frem for alt finder de fleste mennesker det helt uacceptabelt selv at have lus eller at have lus på familiemedlemmer og andre i den nære omgangskreds.

Der er ikke tidligere lavet omfattende undersøgelser af hovedlus i Danmark, men en bevilling fra Sundheds- og Indenrigsministeriet gjorde det muligt at gå i gang med et større projekt, der primært skulle belyse, om lusene har udviklet resistens mod aktivstofferne i de lægemidler, der er godkendt til behandling mod hovedlus. Det langsigtede formål med projektet er at forbedre mulighederne for forebyggelse og behandling af hovedlus i den danske befolkning.

Til gennemførelse af undersøgelsen er der - fordelt over hele landet - blevet indsamlet hovedlus på 28 folke- og privatskoler hvor i alt 78 forskellige klasser er blevet kæmmet. Herudover er der indsamlet hovedlus i fem SFO'er, i én børnehave og på syv efterskoler. Desuden er der på Skadedyrlaboratoriet foretaget 69 kæmninger på fremmødte personer. Det er vigtigt at være opmærksom på, at undersøgelsen ikke er gennemført ved tilfældig indsamling af hovedlus. Vi har bevidst ledt efter steder med problemer og mange hovedlus. I de fleste tilfælde har det været nødvendigt at indhente forældrenes tilladelse til, at deres børn måtte kæmmes, og forældrene har således haft mulighed for at påvirke resultatet af indsamlingen fordi de har været mere opmærksomme på, om deres børn havde lus. Indsamlingen af hovedlusene er foregået ved sugeskæmning. Ved hjælp af en lille kam på mundstykket af en støvsuger kæmmes hovedlusene ud af håret og opsamles i et specielt filter i støvsugerslangen. Fordelen ved metoden var, at den kunne anvendes i tørt hår, og at lusene blev opsamlet i filterbeholdere, hvorfra de så kunne sorteres ud til de forskellige typer tests.

Datamaterialet omfatter 1441 kæmninger, og ud af disse blev der i 208 tilfælde fundet hovedlus svarende til 14% af kæmningerne. I skoleklasserne var der blandt de kæmmede børn 8% med hovedlus, i SFO'erne var der 17%, mens der på efterskolerne var hovedlus på 32% af de kæmmede elever. I 64% af de undersøgte skoleklasser var der børn med hovedlus, men oftest var det kun et eller to af børnene, der havde hovedlus. I skolerne og SFO'erne var andelen af børn med hovedlus størst blandt piger, mens der på efterskolerne var forholdsmæssigt næsten lige mange piger og drenge med lus. På langt de fleste af de børn, som havde lus, blev der fundet under ti voksne hovedlus,

og kun ganske få børn havde mange hovedlus. Det er vigtig i denne sammenhæng at være opmærksom på, at selv tilstedeværelse af nogle få hovedlus betragtes som et problem. Det er ikke muligt på grundlag af denne og tidligere undersøgelser at sige, om problemet med hovedlus er større i dag, end det tidligere har været.

Til måling permethrin- og malathion-resistens hos hovedlus er der i projektet blevet udviklet en simpel og hurtig dråbetest-metode. Metoden går ud på at hovedlus indsamlet ved kæmning påsættes en dråbe gift, og antallet af døde hovedlus tælles efter fire timer. Den mængde gift, som anvendes (den diskriminerende dosis), er tilpasset, så lus, der er levende efter fire timer, kan identificeres som resistente. Der er ligeledes blevet udviklet en shampoo-test, hvor hovedlus anbragt på afklippet hår testes for resistens med kommercielle lusemidler. Yderligere er der udviklet en DNA-test, som identificerer en mutation, der forårsager permethrin-resistens.

I den landsdækkende undersøgelse blev resistens over for permethrin undersøgt i 29 prøver (én prøve er lus fra én skole, én SFO m.m.) og i 29 prøver for malathion. I 72% af prøverne kunne ingen hovedlus dræbes med den diskriminerende permethrin-dosis, som identificerer resistens. Kun på en enkelt skole blev mere end halvdelen af hovedlusene dræbt. DNA-test metoden til undersøgelse af permethrin-resistens viste, at kun 2,7% af 449 undersøgte hovedlus var fuldt følsomme. Genfrekvensen af den resistente version af Natrium-kanal protein-genet, som binder pyrethroid-insekticider var 95%. I 35% af prøverne kunne ingen hovedlus dræbes med den diskriminerende malathion-dosis. Kun i 15% af prøverne blev mere end halvdelen af hovedlusene dræbt.

Konklusionen på resistensundersøgelserne er, at resistens over for permethrin og malathion er udbredt i Danmark, og at begge insektgifte har en nedsat effektivitet over for hovedlus. Derfor vil lusemidler med permethrin - ved korrekt anvendelse - generelt kun være i stand til at dræbe en begrænset del af hovedlusene. Dette sår tvivl om den kliniske effekt af lusemidlet Nix<sup>®</sup>, som er en shampoo med 1% permethrin. Også lusemidler med malathion vil - ved korrekt anvendelse - generelt kun være i stand til at dræbe en del af hovedlusene. Dette sår tvivl om den kliniske effekt af lusemidlerne Prioderm<sup>®</sup> shampoo og Prioderm<sup>®</sup> kutanopløsning, som er henholdsvis en shampoo med 1% malathion og en opløsning med 0,5% malathion.

På denne baggrund anbefales det, at anvendelsen og/eller registreringen af lusemidler med permethrin (samt andre pyrethroider) og malathion skal revurderes. Hvis lusemidler med pyrethroider eller malathion fortsat anvendes, skal den enkelte bruger være opmærksom på, at der er en stor sandsynlighed for nedsat eller manglende klinisk effekt af midlerne, og effektiviteten af behandlingen skal derfor kontrolleres omhyggeligt.

Det anbefales, at en national strategi til behandling og forebyggelse af hovedlus omfatter følgende elementer: Kæmning bør, som situationen ser ud nu, anbefales som den vigtigste metode til behandling mod hovedlus. Metoden anvendes allerede af en del forældre - enten som eneste behandling eller som supplement til lusemidler - og er i princippet en sikker, billig og uskadelig metode til at fjerne lus med. Når kæmning i praksis ikke altid er effektiv, kan det skyldes, at metoden kræver både grundighed og en vedholdende indsats. Så samtidig med, at metoden anbefales/fremhæves som behandling, bør der udarbejdes et let tilgængeligt informationsmateriale om kæmning.

De lusemidler, som forbrugerne har adgang til, er dels de godkendte lægemidler, som indeholder permethrin eller malathion, dels en række alternative planteoliebaserede lusemidler m.fl., hvortil der ikke stilles godkendelseskrav om dokumentation for effektivitet men kun forlanges en CE-mærkning som medicinsk udstyr. Effektiviteten af de CE-mærkede lusemidler med planteolier og andre midler bør derfor vurderes, for at anbefalingerne til brugerne kan forbedres. Under alle omstændigheder er det vigtigt at gøre det klart for forbrugere/forældre, at behandling med et lusemiddel - uanset type - ikke nødvendigvis løser problemet. Brugere skal som situationen ser ud nu altid kontrollere, om behandlingen har haft den ønskede effekt, og vurdere, om der er behov for ekstra eller anden behandling. For at gennemføre en effektiv behandling er det også afgørende, at lusemidlerne anvendes korrekt.

Oplysning og opmærksomhed omkring hovedlus skal intensiveres, for at en målrettet indsats mod hovedlus kan gennemføres. Dette kan øge forældrenes bevidsthed om, at de har ansvaret, og samtidig er det vigtigt, at de har let adgang til god information om, hvad de kan gøre både for at forebygge og for at klare problemet, når det opstår. Informationsmaterialet skal komme fra et centralt sted, så det er enslydende og korrekte oplysninger, forældrene får. Der bør/skal også være mulighed for at få adgang til informationsmaterialet på andre sprog. Der bør desuden laves en strategi for, hvordan der kan tages hånd om de tilfælde, hvor forældre ikke selv har ressourcer til at foretage en effektiv lusebehandling af deres barn.

## Indledning

Hovedlus (*Pediculus capitis*) volder stadig store problemer i Danmark, og erfaringer fra Statens Skadedyrlaboratoriums konsultationstjeneste viste i lighed med informationer om antallet af solgte lusemidler, at problemet var stigende i 1990'erne (Rasmussen and Søholt Larsen 1998). Der har været mange henvendelser fra læger, sundhedsplejersker og apotekspersonale, som efterlyser mere viden om hovedlus og behandling mod hovedlus. Især på skoler, i børnehaver og andre institutioner har hovedlus i mange år været en plage. Hovedlus er ikke under mistanke for at overføre sygdomme, men anses generelt for meget uønskede, da de kan forårsage stærk kløe og irritation i hovedbunden, og da kradsende lusebid kan blive indfaldsvej for bakterier og føre til eksemer, og endelig men ikke mindst fordi det anses for socialt uacceptabelt at være lusebefængt.

Der har i de senere år været meget fokus på hovedlus, og der har været foretaget en målrettet information om hovedlus til primært sundhedspersonale, men alligevel ses et højt infestationsniveau. En mulig forklaring er, at hovedlusene er blevet resistente over for de anvendte lusemidler. Problemet kan dog også skyldes andre faktorer, og vi vurderer, at de vigtigste er mangelfuld effekt og/eller forkert anvendelse af de eksisterende lusemidler - herunder også kæmning, manglende behandling, samt mangelfuld viden om hovedlusenes smitteveje og overlevelse i omgivelserne hos såvel borgere som sundhedspersonale.

Hovedlus lever tæt ved hovedbunden, hvor de trives ved en høj temperatur og luftfugtighed. Når luseæggene lægges, kittes de fast til hårene helt nede ved hovedbunden, hvor de sidder godt fast. Ved den temperatur, som findes lige over hovedbunden, tager udvikling af æggene 6-9 dage. Nyklækkede lus begynder straks at suge blod. Udviklingen til voksen og kønsmoden hovedlus varer 9-12 dage, hvor nymfen skifter hud tre gange. En voksen hun-hovedlus kan lægge 5-8 æg om dagen i løbet af de ca. tre uger, den lever. Hovedlus skal have blod mindst to gange om dagen, og på grund af denne tætte tilknytning til mennesket er hovedlus ilde stedt, hvis de forvilder sig væk fra værten.

En hovedlus forlader kun frivilligt sin vært, hvis den har mulighed for at kravle over på en anden vært. Smitten fra en vært til en anden sker derfor sandsynligvis ved kontakt mellem værter. Hovedlus kan ikke hoppe eller flyve. De hovedlus, som af en eller anden grund falder ud af håret er sædvanligvis gamle, syge eller beskadigede hovedlus. Dog må man regne med, at der er en vis risiko for at blive smittet med hovedlus, hvis man f.eks. låner en kam, en børste eller en hue med hovedlus. Der er dog aldrig foretaget undersøgelser, der belyser smitterisikoen fra omgivelserne, og der savnes også pålidelige oplysninger om deres overlevelse under forskellige forhold (temperatur, fugtighed og struktur af materiale, hvorpå hovedlusene sidder).

Alle kan blive smittet med hovedlus, men hovedlus optræder dog hyppigst hos børn i alderen 3-10 år, og der er en tendens til, at de fleste tilfælde optræder i perioderne august til november og februar til april. Har man mistanke om, at en person er blevet smittet, undersøges håret. Det kan dog være vanskeligt at konstatere hovedlus kort efter smittetidspunktet, hvor der oftest kun vil være få hovedlus og æg.

Det langsigtede formål med projektet er at forbedre mulighederne for forebyggelse og behandling af hovedlus i den danske befolkning. Specifikke mål for projektet har været

at kortlægge de mekanismer, der ligger bag insekticidresistensen, at kortlægge udbredelse og betydning af insekticidresistens hos hovedlus, at udvikle en hurtigmetode til bestemmelse af resistens hos hovedlus, at redegøre for forhold omkring epidemiologi hos hovedlus og at udvikle en landsdækkende strategi til behandling mod hovedlus.

## **Litteraturoversigt over resistens mod lusemidler**

I Danmark er der inden for gruppen af organofosfat-midler kun godkendt produkter med malathion, mens der inden for gruppen af pyrethroid-midler findes godkendte produkter indeholdende permethrin, pyrethrin, phenothrin og bioallethrin, hvoraf kun permethrin bliver markedsført for tiden. Generelt vil resistens over for et stof inden for gruppen af henholdsvis organofosfater eller pyrethroider medføre krydsresistens over for andre midler inden for den samme gruppe. Projektets mål har således været at udvikle en praktisk anvendelig metode til bestemmelse af resistensen hos hovedlus over for henholdsvis organofosfatet malathion og pyrethroidet permethrin.

Insekticidresistens er påvist for flere af de insektgifte, der anvendes eller er blevet anvendt til lusebekæmpelse gennem tiderne. På europæisk plan kan situationen kort sammenfattes som følgende. Resistens mod DDT blev konstateret i 1970'erne i Storbritannien (Maunder 1971), Danmark (Rosdahl 1975) og Holland (Blommers and van Lennep 1978), og samtidig blev der konstateret resistens mod lindan i bl.a. Storbritannien (Maunder 1971) og Holland (Blommers and van Lennep 1978). Fra begyndelsen af 1990'erne er der konstateret resistens over for pyrethroid-midlerne bl.a. i Frankrig mod permethrin og phenothrin (Chosidow et al. 1994), i Tjekkiet mod permethrin, phenothrin, og bioallethrin (Rupes et al. 1995), i Storbritannien mod permethrin og phenothrin (Burgess et al. 1995), og i Israel mod permethrin (Lee et al. 2000, Mumcuoglu et al. 1995). Blandt organofosfat-midlerne er der først fra sidst i 1990'erne konstateret mere omfattende resistens mod malathion i Storbritannien (Downs et al. 1999), selv om der har været rapporteret enkelte tilfælde tidligere i Frankrig og Storbritannien (Burgess et al. 1995).

Der har ikke været beskrevet store problemer med lusebekæmpelsen i Nordamerika og Sydamerika, men der er beskrevet resistens mod permethrin i USA, Panama og Argentina (Lee et al. 2000, Picollo et al. 2000, Vassena et al. 2003). Nærmere undersøgelser af permethrin-resistente hovedlus fra Californien, Texas og Florida dels påviste udbredt resistens på de undersøgte lokaliteter dels identificerede en mutation i Na-kanal proteinet, som er bindingsstedet for permethrin og andre pyrethroider. Undersøgelserne påviste en sammenhæng mellem mutation af Na-kanal proteingenet og resistens over for permethrin ved toksikologiske undersøgelser (Gao et al. 2003, Lee et al. 2003). Mutationen, som forårsager pyrethroid-resistens hos hovedlus, er også identificeret i Japan (Tomita et al. 2003). Yderligere undersøgelser fra USA har påvist, at permethrin-resistens også kan skyldes mekanismer, som nedbryder giften, men begge mekanismer findes ofte sammen (Yoon et al. 2004, Audino et al. 2005).



## Etablering af toksikologisk metode til måling af malathion- og permethrin-resistens hos hovedlus

Traditionelt udføres mange forsøg vedr. lus på mennesker med kropslus (*Pediculus humanus*), da det er muligt og relativt simpelt at dyrke kropslus i laboratoriet, hvorimod der kun findes en besværlig og omkostningstung metode til dyrkning af hovedlus (Takano-Lee et al. 2003). De to lusearter ligner hinanden meget i størrelse og fysiologi og adskiller sig primært i deres biologiske adfærd. Kropslus suger blod én gang i døgn, hvorimod hovedlus spiser flere måltider i løbet af et døgn. Pyrethroider, herunder permethrin, udøver deres giftvirkning ved at binde til et Na-kanal protein i nervesystemets synapser. Sekvensen af dette protein er undersøgt for henholdsvis kropslus og hovedlus, hvor man fandt, at de var identiske (Lee et al. 2003, Tomita et al. 2003).

Der blev anvendt kropslus til at bestemme et basalt toksikologisk niveau for malathion og permethrin, det vil sige til at identificere det dosisområde, hvor dødeligheden er større end 0 og mindre end 100%. De første forsøg med kropslusene blev foretaget under et besøg hos Umweltbundesamt i Berlin. De har i en årrække været Skadedyrlaboratoriets samarbejdspartner og har rutinemæssig dyrkning af kropslus. Efterfølgende er alle forsøg med kropslus foretaget på Skadedyrlaboratoriet. Kropslus blev sendt fra Berlin mandage og modtaget i Sorgenfri tirsdage.

**Filterpapir-test til bestemmelse af resistens.** Vi forsøgte først at implementere en filterpapir-test for resistens, som flere steder anvendes og bl.a. kan anskaffes fra WHO. Der blev imprægneret filterpapir med malathion og permethrin og også anskaffet WHO's lusetest-materiale. Kropslus blev placeret på filterpapir imprægneret med forskellige koncentrationer af malathion eller permethrin (Figur 1). Antallet af døde kropslus blev talt med regelmæssige mellemrum: 1, 2, 4, 6 og 24 timer. Giftvirkningen kunne efterfølgende beregnes ved en probit-analyse, hvor dødelighed og koncentration/mængde af gift til de forskellige tidspunkter for populationen udregnes.

Der blev gennemført en række forsøg med malathion filterpapir-test fra WHO og med papir af egen produktion, men ingen af disse gav et tilfredsstillende resultat.



**Figur 1.** Filterpapir-test for resistens hos lus. Papir (d=3,5 cm) imprægneret med insektgift placeres i et låg fra en petriskål. Bunden, med et 1,5 cm hul, så der er fri luftudveksling, anvendes som låg. Der testes maksimum 10 lus pr. petriskål.

Det lykkedes med permethrin at fastlægge et basalt toksikologisk niveau hos kropslus (Tabel 1). Med udgangspunkt i disse værdier fastlagdes nogle diskriminerende doser, som skulle adskille følsomme og resistente individer. Vi besluttede at fremstille papirer med en dosis på henholdsvis 10 og 20 µg per cm<sup>2</sup> til vores analyser af hovedlus. Permethrin-filtrene fra WHO havde angivet en koncentration på 0,75%, som svarer til ca. 28 µg pr. cm<sup>2</sup>.

Forsøgene med hovedlus på filterpapir var på flere måder problematiske. Det var svært at fastlægge et kriterium for, hvornår en lus var død. Der var stor variation mellem forskellige gentagelser af forsøg, og det var således svært at opnå samme resultater i gentagne forsøg. Det var umuligt at anslå, hvor meget gift en lus blev eksponeret for. På basis af mange års erfaringer med toksikologiske undersøgelser med forskellige gifte og forskellige insektarter måtte vi konkludere, at det ikke var en god test.

**Tabel 1.** Filterpapir-test for permethrin-resistens hos kropslus. Antallet af døde lus blev opgjort efter 24 timer, og LC (lethal concentration) er beregnet ved probit-analyse (SAS Institute).

	LC <sub>50</sub> (95% C.I.) µg per cm <sup>2</sup>	LC <sub>95</sub> (95% C.I.) µg per cm <sup>2</sup>
Voksne fodret	1,2 (0,93-1,4)	2,2 (1,7-3,7)
Voksne sultne	0,85 (0,65-1,0)	1,4 (1,1-2,5)
Nymfe III fodret	5,8 (3,2-11)	21 (11-160)
Nymfe III sultne	3,0 (2,5-3,6)	5,9 (4,6-9,5)

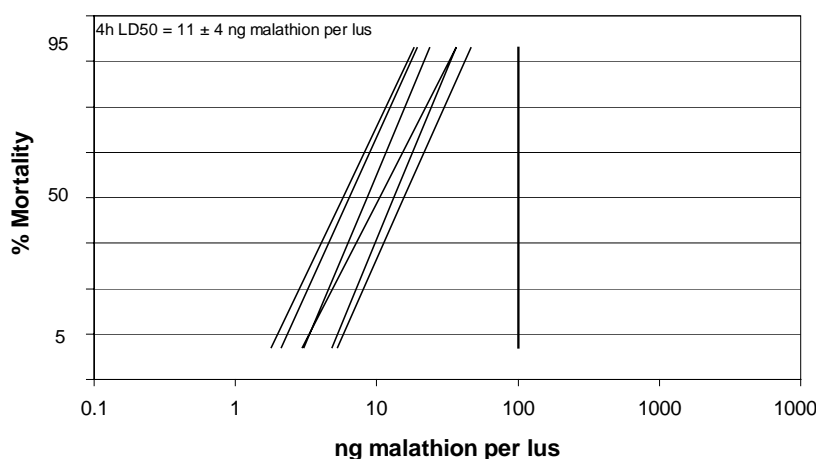
**Dråbetest til bestemmelse af resistens.** På baggrund af ovennævnte blev der så udviklet og tilpasset en dråbetest-metode til anvendelse på kropslus og hovedlus, som anvendes rutinemæssigt ved laboratoriet til større insekter. En dråbetest er let at udføre, og den anvendte mængde gift pr. lus kan bestemmes præcist.

Testen udføres ved at sætte 0,1 µl dråber med forskellige koncentrationer af malathion eller permethrin på individuelle lus. Antallet af døde lus tælles derefter med regelmæssige mellemrum: 2, 4, 6 og 24 timer. Giftvirkningen kan efterfølgende beregnes ved en probit-analyse, hvor dødelighed og mængde (LD = "lethal dose") af gift til de forskellige tidspunkter for populationen udregnes. Der blev for både malathion og permethrin fastlagt et basalt toksikologisk niveau hos kropslus ved 2, 4, 6 og 24 timer (Appendiks 1 og 2).

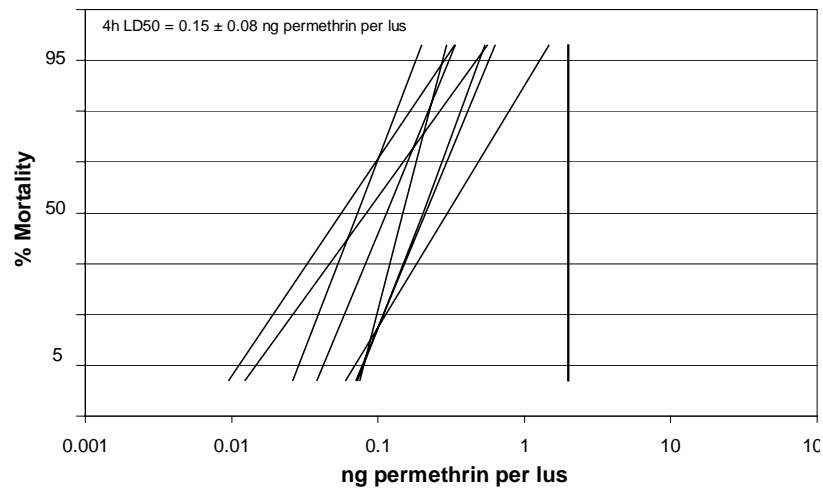


**Figur 2.** Dråbetest for resistens hos lus. En dråbe på 0,1 µl afsættes på en lus. Lusen overføres til et præparatglas med et lille stykke økologisk bomuldslerred. Glassene sættes på et trådnæt over en skål med mættet saltopløsning, som sikrer høj luftfugtighed. Der testes maksimum 10 lus pr. glas.

Til undersøgelserne af resistens hos hovedlus var det både vigtigt at opnå en lav kontroldødelighed, og udvikle en test, som kunne gennemføres på nogle få timer. Det blev derfor valgt, at en test på fire timer skulle være vores standardtest med både malathion og permethrin, og diskriminerende doser på henholdsvis 100 ng malathion (Figur 3) og 2 ng permethrin pr. hovedlus (Figur 4) blev fastlagt. Begge doser var mindst  $2 \times LD_{95}$ , som for henholdsvis malathion og permethrin var 41 ng og 0.5 ng pr. hovedlus. Det vil sige, at vi valgte en mængde gift, som var mindst det dobbelte af den dosis, som dræber 95% af de følsomme lus. Lus som overlever 100 ng malathion er malathion-resistente, og lus der overlever 2 ng permethrin er permethrin-resistente.



**Figur 3.** Dødelig dosis af malathion hos kropslus i dråbetest. Dødelighed ved 4 timer for tredje nymfe stadium og voksne hunner (se Appendiks 1 for detaljer og resultater for 2, 6 og 24 timer). Diskriminerende dosis på 100 ng malathion er angivet ved lodret linie.



**Figur 4.** Dødelig dosis af permethrin hos kropslus i dråbetest. Dødelighed ved 4 timer for tredje nymfe stadium og voksne hunner (se Appendiks 2 for detaljer og resultater for 2, 6 og 24 timer). Diskriminerende dosis på 2 ng permethrin pr. hovedlus er angivet ved lodret linie.

## Indsamling af hovedlus

Indsamlingen af hovedlusene var den mest arbejdskrævende del af projektet. Det har været vigtigt, at indsamlingen foregik effektivt og på en måde, der var så skånsom over for både lus og børn som muligt. Vi ønskede hele, tørre og levende hovedlus og fandt, at den bedste metode at indsamle lusene på var ved hjælp af en sugekæmmer (Snatchers Company A/S, Næstved, Danmark). Enkelte lus fik revet benene af ved denne proces, men generelt var kvaliteten af de indsamlede hovedlus i orden og overlevelsen på samme niveau som ved kæmning med traditionelle tættekamme.

Sugekammeren er konstrueret som et særligt mundstykke til at sætte på en støvsugerslange. Ved hjælp af en lille kam på mundstykket kæmmes hovedlusene ud af håret og opsamles i en filterbeholder, der sidder i støvsugerslangen. Fordelen ved metoden er, at den kan anvendes i tørt hår, og at lusene opsamles i beholderen, hvor de kan opbevares, indtil de forskellige test kan udføres. Beholderne med lus blev placeret i en temperatur-reguleret boks (20°C) indtil de blev sat op til resistens test. Under kæmningen blev filterbeholderne udskiftet for hver ca. to minutters kæmning for at sikre, at de udkæmmede hovedlus ikke tog skade ved f.eks. udtørring i støvsugerens luftstrøm.

Sugekæmning er en god metode til at registrere og fjerne hovedlus fra hovedbunden, men kræver dog erfaring og stor grundighed, hvis den skal anvendes som en effektiv behandling. Kæmning med en sugekæmmer er i lighed med almindelig kæmning med tættekam tidskrævende, hvis man skal sikre, at alle lus fjernes ved hver behandling. Ved de fleste indsamlinger vidste vi ikke på forhånd, hvilke børn der havde lus. Derfor blev alle børn kæmmet med sugekammeren i 2-5 min. Blev der ikke fundet lus i denne

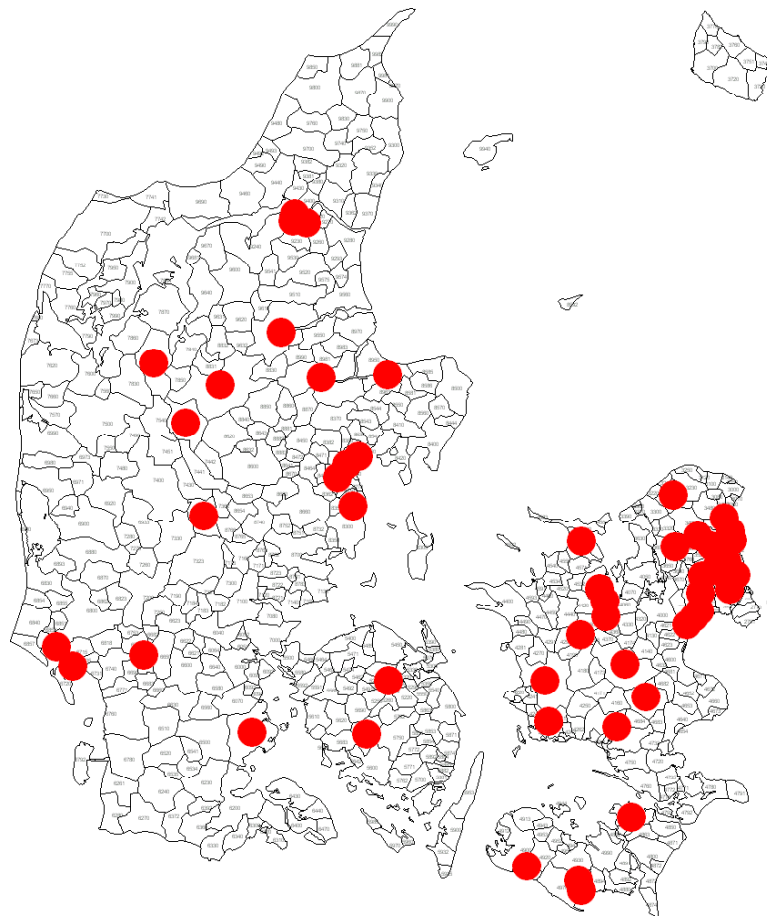
periode, gik vi videre til næste barn. Udover selve kæmningen blev barnets alder, hårlængde og tidligere lusehistorie registreret. For børn med hår længere end ca. 15 cm. var det nødvendigt at inddele håret i 4-8 skarpt adskilte rottehaler, for at kunne lave en effektiv kæmning. Børn med lus blev kæmnet så grundigt, at man kunne regne med, at alle lus var fjernet. I disse tilfælde kunne en kæmning tage fra 20 minutter til en time afhængig af hårets længde og tykkelse samt mængden af lus.

Der blev indrettet et laboratorium til kæmning af dem, der henvendte sig hos Skadedyrlaboratoriet i Sorgenfri. For at få indsamlet lus til undersøgelserne annonceredes efter lus via kontaktede skoler og SFO'er, via Skadedyrlaboratoriets hjemmeside samt via lokalpressen (Det Grønne Område). Luselaboratoriet gjorde indsamlingerne mindre arbejdskrævende, da vi ikke skulle ud af huset med alt vores udstyr, og gjorde det tillige muligt at få indarbejdet metoderne, indtil de fungerede tilfredsstillende. Samtidigt kunne lusene testes umiddelbart efter, at de var redt ud af håret.

Det var primært beboere fra København og Nordsjælland, der havde mulighed for at komme til Sorgenfri, og for at gøre indsamlingen landsdækkende rettede vi henvendelse til den kommunale sundhedspleje i udvalgte kommuner og til alle landets efterskoler. I forbindelse med længere ture rundt i landet indrettedes et "rullende luselaboratorium" med udstyr til indsamlinger, resistens-tests og mulighed for opbevaring af de levende lus. I mange tilfælde var det nødvendigt at teste lusene på indsamlingsstedet, da en lang transporttid ellers ville give en stor dødelighed uden påvirkning med gift og dermed et usikkert resultat. De landsdækkende indsamlinger var særdeles arbejdskrævende, og det var derfor vigtigt at besøge mange lokaliteter pr. tur.

Annonceringen efter hovedlus gav stor opmærksomhed i pressen og et rimeligt antal henvendelser fra folk med luseproblemer. I de fleste tilfælde har sundhedsplejersker rundt omkring i landet formidlet kontakter til skoler og SFO'er, hvor man havde problemer med hovedlus. Efterskolerne viste sig at være et godt sted at finde hovedlus, så de blev besøgt rundt omkring i Danmark. På selve laboratoriet har der også været en del gæster, som er kommet for at blive kæmnet. I forhold til den megen opmærksomhed, som vores indsamling medførte, og i forhold til at hovedlus betegnes som et stort problem i børnehaver, skoler, SFO o.a., var det dog overraskende tidskrævende at skaffe tilstrækkeligt med lus til at kunne gennemføre undersøgelsen.

Der blev indsamlet hovedlus på 28 forskellige skoler og 5 SFO'er fordelt over hele landet (Figur 5). På skolerne blev der kæmnet i 78 forskellige klasser. Udover dette blev der kæmnet i 1 børnehave og på 7 efterskoler. På Skadedyrlaboratoriet har vi foretaget 69 kæmninger af enkeltpersoner. Nogle få af disse kæmninger er foretaget på børn, der er blevet kæmnet flere gange. I alt dækker vores datamateriale kæmning af 1441 personer.



**Figur 5.** Indsamling af hovedlus til resistens-test i Danmark 2004-2005. Hver cirkel repræsenterer et indsamlingssted. Der blev indsamlet hovedlus fra 29 forskellige lokaliteter i hovedstadsområdet.

## Resistens hos danske hovedlus

Der blev indsamlet et del hovedlus, som i første omgang primært blev testet for overlevelse, hvorefter vi også begyndte at teste på filterpapir imprægneret med permethrin. Der viste sig dog hurtigt at være en lang række problemer. Det var svært at holde liv i hovedlusene tilstrækkeligt længe til at gennemføre test med lav kontrol-dødelighed, hovedlusene forsøgte at forlade det imprægnerede papir og det var svært at finde ud af, om de var døde eller levende. Problemerne med at gennemføre gode solide resistenstest på hovedlusene betød - sammen med vores problemer med at få etableret en malathion filterpapir-test - at forsøgene blev afbrudt, og en dråbetest metode blev udviklet.

### Resistens test

Hovedlus indsamles ved sugeskæmning i tørt hår. Lusene sorteres i portioner af ti lus. Der anvendes voksne hunner, hanner samt tredjestadie nymfer. Lusene anvendes umiddelbart eller maksimum to timer efter indsamling. Det formodes, at alle lus indsamlet i én skoleklasse, én børnehave eller én SFO tilhører den samme population. En prøve defineres derfor som alle lus indsamlet på én lokalitet (skole, SFO m.m.) eller fra én person eller søskende kæmmet ved fremmøde på Skadedyrlaboratoriet.

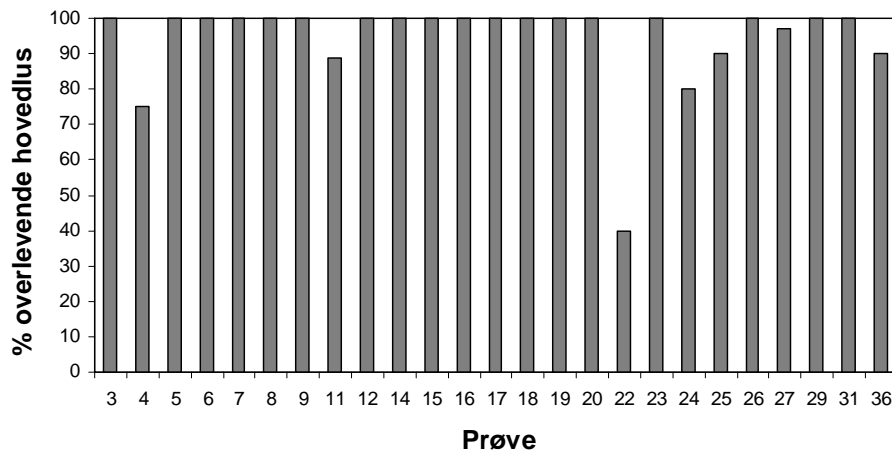
**Dråbetest metode:** Der sættes en 0,1 µl dråbe med henholdsvis 0,10% malathion (100 ng pr. hovedlus) eller 0,0020% permethrin (2 ng pr. hovedlus) opløst i acetone på hver enkelt hovedlus. Der er minimum testet 10 lus i hver prøve. Som kontrol for lusenes levedygtighed behandles 10 lus med acetone. Acetone fordamper øjeblikkelig, og lusene overføres til præparatglas indeholdende et lille stykke økologisk bomuldstof. Glassene med lus inkuberes ved 20°C og en relativ luftfugtighed på >90%. Efter fire timer tælles antallet af døde lus.

**Shampoo-test metode:** Ti lus anbringes i et lille plastikbæger sammen med en lille hårtot og 1ml Nix<sup>®</sup> (Shampoo mod hovedlus med 1% permethrin, Pfizer) eller Prioderm<sup>®</sup> (Shampoo mod hovedlus med 1% malathion, Norpharma), som er blandet 1:1 med vand for at gøre emulsionen tilstrækkeligt flydende. Bægeret rystes, så lus, shampoo og hår blandes, hvorefter det står i 10 minutter ved rumtemperatur. Hår og lus overføres til en lille sigte og skyldes fri for shampoo. Hår og lus overføres til et rent plastikbæger, som inkuberes ved 20°C og en relativ luftfugtighed på >90%. Efter fire timer tælles antallet af døde lus.

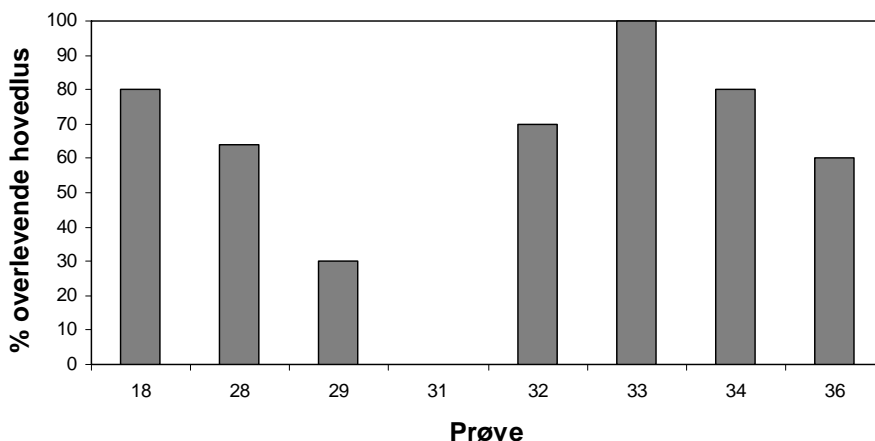
Niogtyve indsamlede prøver kunne testes for permethrin-resistens med den diskriminerende dosis i dråbe-test eller med shampoo-test. Kontrol dødeligheden, det vil sige dødeligheden af ikke-forgiftede lus, var 0-10% (Appendiks 3).

I 18 prøver kunne ingen lus dræbes med den diskriminerende dråbetest-dosis på 2 ng permethrin. I fire prøver blev under 10% lus dræbt. Hos to populationer blev 20-25% lus dræbt, og kun i en prøve blev mere end halvdelen af lusene dræbt; 60% i prøve 22 (Figur 6).

Der blev gennemført otte shampoo-test med Nix<sup>®</sup>; shampoo med 1% permethrin. Resultaterne varierede stærkt - fra alle døde til ingen døde (Figur 7). I fire prøver blev lusene også testet ved ovenstående dråbe-test. Ved prøve 18, 29 og 31 blev ingen lus dræbt ved dråbe-testen, men 20, 70 og 100% blev dræbt ved shampoo-testen. Ved indsamling 36 døde 10% ved dråbe-test og 30% ved shampoo-test. Formentlig bliver lusene i en shampoo-test udsat for en større mængde insekticid end i en dråbetest.



**Figur 6.** Permethrin-resistens hos danske hovedlus med dråbetest.

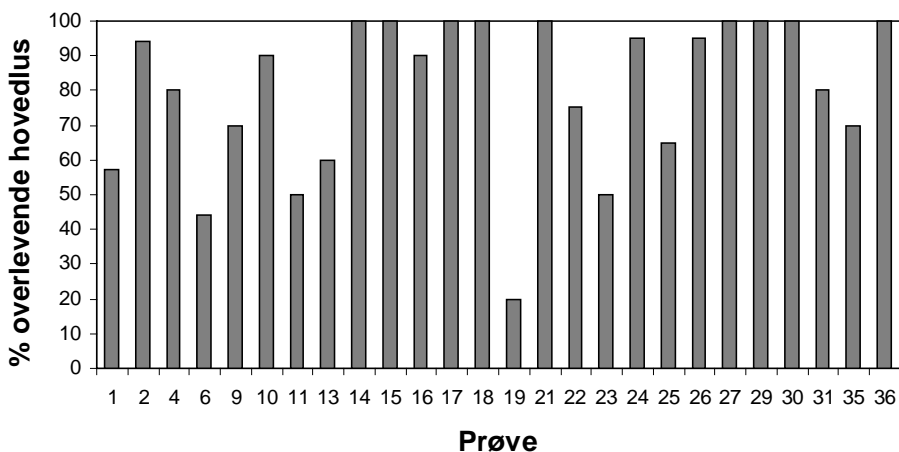


**Figur 7.** Permethrin-resistens hos danske hovedlus med shampoo-test.

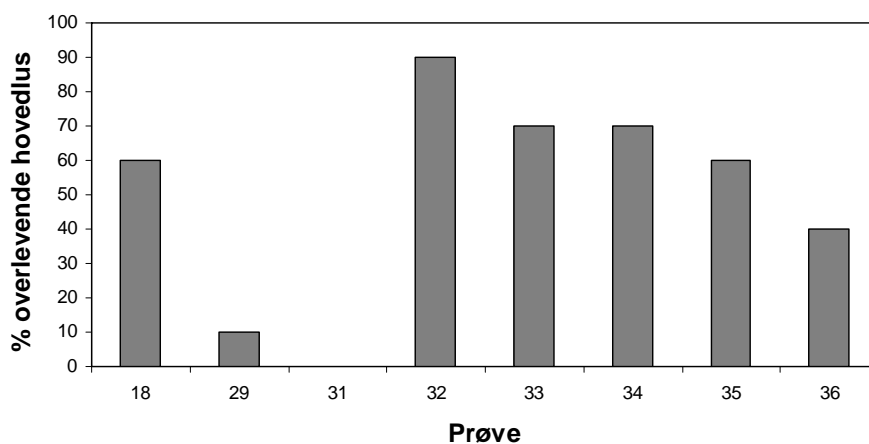


Niogtyve indsamlede prøver kunne testes for malathion-resistens med den diskriminerende dosis i dråbe-test eller med shampoo-test. Kontrol dødeligheden, det vil sige dødeligheden af ikke-forgiftede lus, var mellem 0-10% (Appendiks 4). I ni prøver kunne ingen lus dræbes med den diskriminerende dosis på 100 ng malathion. I fem prøver blev op til 10% lus dræbt. I ti prøver blev 11-50% af lusene dræbt, og hos to populationer blev mere end 50% lus dræbt. Det højeste antal døde lus observeret stammede fra prøve 19, hvor 80% af lusene blev dræbt (Figur 8).

Der blev gennemført otte test med Prioderm® shampoo med 1% malathion. Resultaterne varierede stærkt - fra alle døde til 10% døde (Figur 9). I fire tilfælde er lusene også blevet testet ved ovenstående dråbe-test. Ved indsamlingerne 29 og 36 blev ingen lus dræbt ved dråbetesten, men 60% og 90% blev dræbt ved shampoo-testen. Ved indsamlingerne 31 og 35 døde henholdsvis 20% og 30% ved dråbe-test, og 100% og 40% døde ved shampoo-testene.



**Figur 8.** Malathion-resistens hos danske hovedlus med dråbe-test.



**Figur 9.** Malathion-resistens hos danske hovedlus med shampoo-test.

Det lykkedes to gange (prøve 18 og 22) at indsamle så mange lus, at der kunne gennemføres komplette bioassays. Det vil sige, at lusene blev testet på en række koncentrationer af henholdsvis malathion og permethrin, og populationernes dosis-mortalitet-respons kan beregnes og sammenlignes med basisliniedata for kropslus beskrevet tidligere.

Lusene (20 lus pr. dosis) fra prøve 18 og 22 blev testet med 2, 8, 32, 128 og 512 ng permethrin pr. hovedlus samt acetone som kontrol. Efter fire timer var blot 2 af 240 lus døde uafhængigt af permethrin-koncentrationen i indsamling 18. Der var ligeledes ikke en dosis-mortalitet-respons hos prøve 22, hvor 50-90% af lusene var døde uafhængigt af permethrin-koncentrationen. En optælling efter 24 timer fra prøve 18 viste 10% døde i kontrollerne og dosis-mortalitets-respons. LD<sub>50</sub> kunne beregnes til 23 ng permethrin pr. hovedlus. Sammenlignet med LD<sub>50</sub> beregnet for 24 timer for permethrin-følsomme kropslus på 0,38 ng permethrin pr. kropslus (Appendiks 2) gav dette en resistensfaktor på 61.

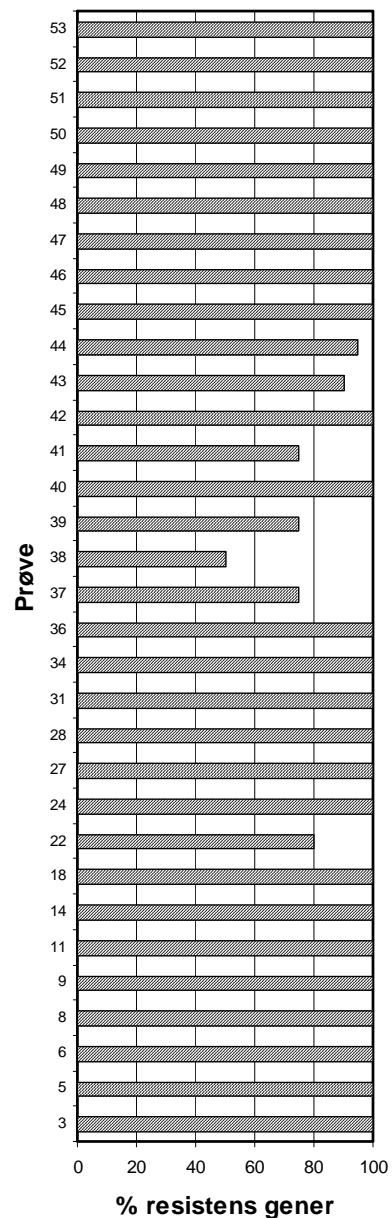
Lusene (20 lus pr. dosis) fra prøve 18 og 22 blev testet med 6, 25, 25, 100, 500, 1000 og 2000 ng malathion pr. hovedlus samt acetone som kontrol. Efter fire timer var blot 4 af 280 lus døde uafhængigt af malathion-koncentrationen i prøve 18. Der var derimod en dosis-mortalitet-respons hos prøve 22, og vi kunne beregne 4 timer LD<sub>50</sub> til 650 ng malathion pr. hovedlus. Sammenlignet med LD<sub>50</sub> for malathion-følsomme kropslus på 11 ng malathion pr. kropslus (Figur 3) gav dette en resistensfaktor på 59. En optælling efter 24 timer fra begge indsamlinger var ikke anvendelig, idet der var henholdsvis 45% og 85% døde i kontrollerne.

## **Bestemmelse af permethrin-resistens ved molekylær metode**

Permethrin er et pyrethroid, det vil sige et syntetisk stof beslægtet med naturligt forekommende stoffer udvundet fra chrysanthemum. Resistens over for pyrethroider herunder permethrin skyldes hos mange insekter en mutation af et Natrium-kanal-protein, som er bindingsstedet for pyrethroider. Mutationerne varierer mellem forskellige arter af insekter, men befinder sig ofte i de samme områder af genet. Ændringen af natrium-kanal protein genet kan detekteres på DNA-niveau med molekylærbiologiske metoder, som er implementeret for flere insektarter. Natrium-kanal proteinets gensekvens hos hovedlus er offentliggjort, og to sammenhængende punktmutationer, som forårsager permethrin-resistens, er beskrevet. Vi har udnyttet denne information og udviklet og implementeret en metode til at detektere frekvensen af denne ændring af genet (Appendiks 6, Kristensen 2005). I dette arbejde har vi yderligere identificeret en ny mutation, som kunne være associeret med permethrin-resistens.

Der er undersøgt mere end 500 hovedlus fra 32 forskellige indsamlinger med den molekylære metode, og fra disse har vi fået anvendelige data i 449 tilfælde. Der findes en detaljeret beskrivelse af data i Appendiks 5. Pyrethroid-følsomme hovedlus er sjældne i Danmark, og i 25 af indsamlingerne har vi udelukkende fundet resistente versioner af natrium-kanal protein genet (Figur 10). Der er kun fundet 12 pyrethroid-følsomme hovedlus i denne undersøgelse, hvilket svarer til 2,7%. En nærmere beregning af genfrekvensen viser, at 95% af natrium-kanal protein generne i vores indsamlinger skal betegnes som pyrethroid-resistente .

Vi havde en ambition om at udvikle standard-laborietest, hvor det hurtigt kunne bestemmes, hvilke mekanismer der forårsager resistens. Den molekylære metode til bestemmelse af permethrin-resistens vil med oprensning af DNA, PCR-test, gelelektroforese kunne gennemføres på en 'lang' arbejdsdag. Der vil dog kunne udvikles en hurtigere men dyrere analyse ved anvendelse af "real-time PCR", hvor man har elimineret gelelektroforesen.



**Figur 10.** Frekvensen af permethrin-resistens gener hos danske hovedlus.

## **Diskussion og konklusion vedr. resistens hos danske hovedlus**

Undersøgelsen viser, at resistens-niveauet over for både permethrin og malathion er højt. Dette resultat skal dog ses i lyset af, at der ikke er blevet indsamlet lus tilfældigt.

Når personer har henvendt sig personligt på Skadedyrlaboratoriet, har de ofte haft lus i en periode og har anvendt forskellige metoder til behandling mod hovedlus herunder midler med malathion eller permethrin. Vores undersøgelse har sandsynligvis et større antal ”problem-tilfælde”, hvor lusebehandling er forsøgt, men har fejlet.

Denne undersøgelse kan således overvurdere niveauet af resistens hos hovedlus. I forbindelse med indsamlingerne blev forældrene spurgt om hvilke midler, der tidligere var blevet anvendt til behandling mod hovedlus. Ud af 684 besvarelser oplyste 189 forældre, at deres barn havde haft lus inden for de seneste tre måneder, og 52% havde brugt lusemidler med malathion eller permethrin til behandling mod hovedlus.

Resistens over for permethrin og malathion er udbredt i Danmark, og begge insektgifte har nedsat effekt over for hovedlus. Spørgsmålet er så, om den observerede resistens over for malathion og permethrin hos hovedlus forårsager behandlingssvigt?

Det er ikke muligt på basis af denne undersøgelse direkte at koble resistens og behandlingssvigt sammen, idet vi ikke har gennemført egentlig kliniske undersøgelser af midlernes effekt på hovedet af danske børn. Der er dog påvist resistens både ved at påføre hovedlusene dråber med en kendt mængde gift og ved anvendelse af luse-shampoo. Mere end 50 års erfaring ved Skadedyrlaboratoriet og andre institutioner med behandling af hundredvis af forskellige insektarter med en lang række forskellige giftstoffer, som stort set uden undtagelse forårsager udvikling af resistens, peger på, at resistens har en afgørende betydning for den kliniske effekt. Hvis resistensen ingen betydning havde for hovedlusenes evne til at overleve, ville den ikke optræde med den store hyppighed, som er påvist i dette projekt.

Det vurderes på basis af det observerede resistensniveau, at lusemidler med permethrin generelt ved korrekt anvendelse kun vil være i stand til at dræbe en begrænset del af hovedlusene. Mange vil formodentlig ikke kunne gennemføre en tilfredsstillende behandling med midler som indeholder permethrin. Lusemidlet Nix<sup>®</sup>, som er en shampoo med 1% permethrin vil generelt have en ringe effekt til behandling af hovedlus.

Det vurderes på basis af det observerede resistensniveau, at lusemidler med malathion generelt ved korrekt anvendelse kun vil være i stand til at dræbe en del af hovedlusene. Det vil kun sjældent forventes, at man kan opnå en effektivitet, som kan kaldes ”en tilfredsstillende behandling”. Lusemidlet Prioderm<sup>®</sup> shampoo med 1% malathion vil generelt have en nedsat effekt til behandling af hovedlus. Prioderm<sup>®</sup> kutanopløsning, som er en opløsning med 0,5% malathion, som skal blive i håret i 12 timer, vil formodentlig have en bedre effekt end Prioderm<sup>®</sup> shampoo, men det kan ikke siges, om effekten vil være tilfredsstillende.

### **Konklusion vedr. resistens**

Resistens over for permethrin og malathion er udbredt i Danmark, og begge insektgifte har nedsat effekt over for hovedlus.

Lusemidler med permethrin vil generelt ved korrekt anvendelse kun være i stand til at dræbe en begrænset del af hovedlusene. Dette sår tvivl om den kliniske effekt af lusemidlet Nix<sup>®</sup>, som er en shampoo med 1% permethrin.

Lusemidler med malathion vil generelt ved korrekt anvendelse kun være i stand til at dræbe en del af hovedlusene. Dette sår tvivl om den kliniske effekt af lusemidlerne Prioderm<sup>®</sup> shampoo og Prioderm<sup>®</sup> kutanopløsning, som er henholdsvis en shampoo med 1% malathion og en opløsning med 0,5% malathion.

### **Data og erfaringer med hovedlus fra indsamlingerne**

Det primære formål med indsamlingerne har været at skaffe levende, usvækkede lus til resistensundersøgelserne. Der blev foretaget en lang række kæmninger af børn på skoler, SFO-er, efterskoler og ved fremmøde på Skadedyrlaboratoriet. I forbindelse med indsamlingerne har det været oplagt at opsamle informationer og erfaringer, som belyser aspekter omkring smitte med hovedlus: frekvens af smittede børn på indsamlingsstederne, betydning af køn, oplysninger om tidligere smitte og bekæmpelse samt antal og stadier af hovedlus på smittede børn.

**Datamaterialet.** Informationerne stammer ikke fra tilfældigt udvalgte grupper af børn, men viser billedet fra de mange kæmninger, som blev foretaget i denne undersøgelse, og skal derfor ses i dette lys. Da hovedprioriteten har været at få fat i så mange hovedlus som muligt og teste dem, før de blev svækkede, er vi gået målrettet efter at få adgang til at kæmme grupper af børn, hvor det på forhånd var konstateret, at et eller flere børn havde hovedlus. Det forhold, at kæmningerne forudsatte en forældretilfærdelse, har sandsynligvis også påvirket billedet ved, at der har været øget fokus på hovedlus i børnenes familier i dagene før vores kæmninger. Endvidere blev kæmningerne på det enkelte barn indstillet, hvis der ikke kunne findes lus efter 2-5 minutters kæmning.

Kontakten til de potentielt lusesmittede børn har vi fået ved at rette henvendelse til skoler, SFO-er, sundhedsplejersker, lokalpresse m.v. og ved at opfordre til at kontakte laboratoriet for aftale om kæmning, hvis der var aktuelle eller vedvarende problemer med hovedlus. Henvendelserne blev så vidt muligt sorteret for at finde frem til dem, hvor der var størst chance for gevinst. I en del tilfælde blev der kæmmet et mindre udvalg af en gruppe børn. I andre tilfælde har det været muligt at kæmme én eller flere hele klasser. Da små børn i børnehavealderen generelt var kede af at lade sig kæmme af en fremmed voksen, har vi i de fleste tilfælde fravalgt de relativt mange henvendelser, der kom fra børnehaver.

Arbejdsgangen i adgangen til at kæmme skoleklasser og SFO-børnegrupper var, at den pågældende lokalitet, straks efter kontakt og aftale med laboratoriet om kæmning blev forsynet med sedler til forældretilfærdelser til underskrift. Tidspunktet for kæmningen var derfor normalt kendt af børnenes forældre mindst to-tre dage i forvejen.

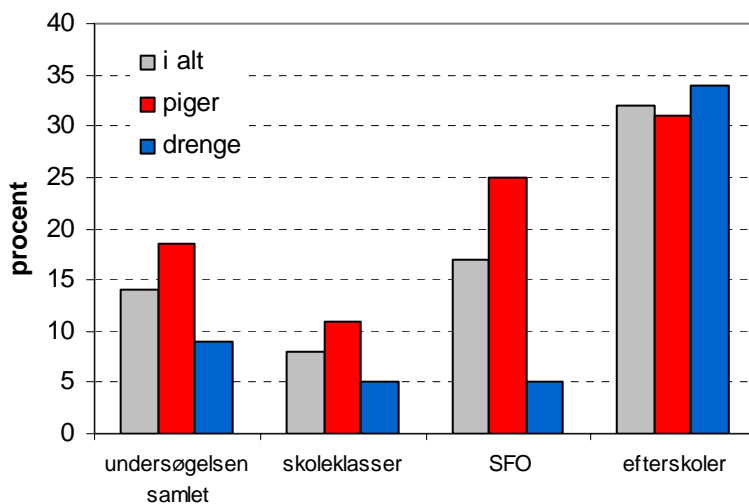
Samtidig med sedlen til kæmmetilladelse blev forældrene opfordret til at svare på et simpelt spørgeskema til anonym aflevering. Her blev der spurgt om barnets alder og

køn, om barnet havde haft lus inden for de sidste tre måneder, og hvad der i så fald var behandlet med. Desuden blev der spurgt, om andre i husstanden havde haft lus i samme periode, og om der i øvrigt var kommentarer.

**Frekvens af smittede børn på indsamlingsstederne.** Undersøgelsen rummer to typer af data, som kan give et indtryk af, hvor udbredt smitten med hovedlus er: 1) resultatet af de kæmninger, som blev foretaget og 2) spørgeskemasvar på spørgsmål, om barnet har haft lus inden for de seneste tre måneder.

Der blev foretaget i alt 1441 kæmninger, og i 208 tilfælde blev der fundet hovedlus i voksen- og/eller nymfestadier. I 69 tilfælde var det muligt at kæmme en hel eller næsten en hel skoleklasse, hvor der angiveligt var ”store problemer” med hovedlus. Der blev fundet lus i 44 af disse klasser, svarende til 64% af klasserne. I ca. hver tredje af de klasser, hvor der angiveligt skulle være store problemer med lus, kunne der således ikke findes hovedlus den dag, hvor vi kæmmede. Der blev i alt kæmmet 1014 børn i de 69 klasser, og her kunne vi finde hovedlus på 8% af børnene. I 80% af de 44 klasser med lus blev der fundet ét eller to børn med lus i klassen, og det højeste antal vi registrerede i en enkelt klasse var syv elever med lus.

I SFO’erne blev der kæmmet et mindre antal børn fra flere forskellige klasser og i mange tilfælde først og fremmest de børn, hvor der iflg. SFO-personalet ville være størst chance for at finde lus. Der blev i alt kæmmet 155 børn i SFO’erne, og 27 af børnene, svarende til 17%, havde hovedlus. En sandsynlig forklaring på den højere andel med lus i forhold til skoleklasserne er, at SFO-personalet har haft en god fornemmelse for at udvælge de ”rigtige” børn.



**Figur 11.** Andel af kæmmede børn med hovedlus på de forskellige typer af indsamlingssteder.

Der blev kæmmet elever på syv forskellige efterskoler. Af de i alt 131 efterskoleelever, som lod sig kæmme, havde 32% hovedlus, og andelen af kæmmede elever med lus var således højere her end i institutionerne med de yngre aldersklasser af børn. En del af forklaringen kan skyldes en ”udvælgelseskomponent”, og det var heller ikke nødvendigt

at indhente en forældretilladelse, så problemet med, at der var fjernet lus fra håret inden vi fik mulighed for at kæmme, kan have været mindre.

Foruden resultatet af kæmningerne, giver også undersøgelsens spørgeskemasvar et billede af, hvor udbredt smitten med hovedlus er. Der blev returneret 684 udfyldte spørgeskemaer fra forældrene i de skoleklasser og SFO'er, hvor vi kæmmede børnene.

Af de besvarede spørgeskemaer fremgår, at 28% af børnene i de kæmmede klasser har haft lus inden for de seneste tre måneder, og inkluderes tilfælde hos andre i husstanden, har 32% af familierne haft tilfælde med lus inden for de seneste tre måneder. I 114 tilfælde ud af de i alt 189 tilfælde, hvor barnet havde haft lus inden for de seneste tre måneder, havde andre i familien også haft lus, svarende til 75% af tilfældene.

Tallene bekræfter, at der hen over tid er mange familier, som stifter nært bekendtskab med hovedlus og har et behov for at kunne foretage en effektiv behandling. En dansk spørgeskemaundersøgelse fra 1999 (Rasmussen and Søholt Larsen 1999) angiver, at i løbet af et skoleår havde 33% af børnene haft lus en eller flere gange. I de tilfælde, hvor barnet havde haft lus, havde der hos 60% af familierne også været lus hos andre i familien. Det kan ikke siges, om tilfældene med lus har været stigende eller faldende i perioden mellem de to undersøgelser, da de dækker over forskellige tidsrum, men de viser begge, at der i mange tilfælde vil være flere i en familie, der har lus, og at det derfor også er vigtigt at fokusere på dette, når man vil lusene til livs.

**Kønsfordelingen af børn med lus.** Med hensyn til kønsfordelingen af de kæmmede børn er der i undersøgelsen blevet kæmmet 844 piger og 597 drenge. Det billede, der tegnede sig, viste, at der både i undersøgelsen som helhed og i skoleklasserne og SFO'erne var flere med lus blandt de kæmmede piger end blandt de kæmmede drenge (Figur 11). I SFO'erne var andelen af piger med lus i forhold til drenge væsentligt højere sammenlignet med resultaterne fra skoleklasserne. Det kan skyldes, at vi i SFO'erne i højere grad har "udvalgt" de børn, vi kæmmede. På efterskolerne var fordelingen af piger og drenge med lus næsten ens, idet 17 ud af 50 drenge og 25 ud af 81 piger havde hovedlus. Dette illustrerer, at andre faktorer end køn har betydning for, om man bliver smittet med lus. Den vigtigste faktor skønnes at være hvor tæt og hyppig kontakt der er mellem personer. Ifølge de returnerede 684 spørgeskemasvar havde 189 af børnene haft lus inden for de sidste tre måneder. Blandt pigerne havde 41% haft lus inden for de sidste tre måneder, mens det var 10% af drengene, der havde haft lus inden for de sidste tre måneder.

**Antal lus på de smittede børn.** Vi har ingen præcise tal, men på langt de fleste af de 208 børn blev der fundet mindre end 10 voksne lus ved kæmningerne. Der blev kun fundet ganske få børn (under ti) med, hvad vi vil betegne som rigtigt mange lus, det vil sige mellem 30 og 200 voksne hovedlus samt et endnu større antal (flere hundrede) lus i nymfestadiet. Dette er i overensstemmelse med observationer fra udlandet, hvor ca. 80% af de inficerede børn havde 1-10 lus i håret, og kun ca. 3% havde mere end 20 lus (Mumcuoglu et al. 1990).

Generelt var der så få lus på hver lokalitet, at de måtte slås sammen fra alle børnene for at få nok til at gennemføre de nødvendige resistens bioassays. Den meget tidskrævende proces at optælle alle lus og skelne mellem de mindste nymfestadier har i de fleste tilfælde måttet nedprioriteres i forhold til at få lusene resistentestet. Det lykkedes dog at få indsamlet et lille datamateriale på det nøjagtige antal af lus hos nogle af de børn,

der blev kæmmet. Dette giver et indtryk af, hvor mange og hvilke stadier af hovedlus, der var til stede på de smittede børn.

Nedenfor viser tabel 2 resultatet af 9 præcise optællinger af de forskellige lusestadier, der kunne kæmmes ud af håret ved en grundig "første kæmning". Fordelingen af hun- og hanlus er nogenlunde ens i alle 9 tilfælde. Der er generelt færre lus i voksenstadiet end i nymfestadierne. Man kunne forvente, at hvis man har forholdsvis mange lus, ville de fleste af dem være i de mindste nymfestadier. Dette billede vil sandsynligvis ændre sig, hvis lusene udsættes for en eller anden form for behandling, f.eks. lusekur eller kæmning, som ikke er effektiv nok. Mange lus går til under opvæksten, og nogle vil sprede sig til andre hoveder. En væsentlig faktor er også, at det er de mindste nymfestadier, der er sværest at fange med tættekammen. Nogle børn har så tynde hårstrå, at kammen ikke altid fanger de mindste nymfer. Hos børn, der har rigtigt mange lus, er det en umulig opgave at fjerne alle de små stadier ved 1. kæmning.

**Tabel 2.** Antal og stadier af hovedlus talt op hos 9 børn efter én grundig første kæmning.

Barn	Voksne hunlus	Voksne hanlus	3.nymfestadie	2.nymfestadie	1.nymfestadie
A	4	11	94	62	10
B	3	4			
C	22	19	60	26	4
D		1	15	11	14
E	15	19	69	42	90
F	56	32	128	34	34
G	19	14	60	51	58
H	30	25	67	113	95
I	5	4	19	16	9
J	4	3	16	39	228
I alt	158	132	528	394	542
I alt %	9	7,5	30	22,5	31

Barn G og H (tabel 2) var to søstre med forholdsvis mange voksne lus, og dermed havde de også mange små lus, som ikke alle kunne kæmmes ud ved første kæmning. Pigerne blevet kæmmet yderligere tre gange med ca. en uges mellemrum og ved fjerde kæmning havde G i alt to 3.-stadienymfer plus to 2.-stadienymfer i håret. Barn H havde hhv. 6 hunlus, 6 hanlus og 23, 17 og 16 nymfer i stadie 3, 2 og 1 ved fjerde kæmning. Selv efter så mange kæmnings er det ikke lykkedes at gøre pigerne helt lusefri, hvilket oplagt skyldes, at der går for lang tid mellem hver kæmning, for at behandlingen kan være effektiv.



**Smitte med hovedlus.** Det er svært at gennemføre undersøgelser, der viser, hvor let eller svært det er at blive smittet med lus. Det er almindeligt anerkendt i den internationale litteratur, at smitte med lus primært sker ved tæt kontakt mellem to hoveder. Formodentlig overføres en lus fra et hoved til andet, når håret fra en anden person kommer så tæt på, at lusene kan gribe fat i det. En laboratorieundersøgelse udført af australske forskere (Canyon et al. 2002) viser at der i under 10% af tilfældene overføres en lus fra et hår til andet, når disse passerer tæt forbi hinanden. For at lusene ville gribe ud efter det nye hår, krævedes en meget langsom bevægelse af håret, og at håret bevægede sig i en bestemt vinkel i forhold til lusene.

Smitte med hovedlus fra omgivelserne kan ikke udelukkes, men må generelt anses for at være uden betydning sammenlignet med tæt kontakt mellem hoveder. I løbet af vores undersøgelse har vi kun i ganske få tilfælde fundet lus uden for hovedbunden, og disse kan henføres til, at lusene kort forinden er blevet redt ud af håret. Hovedpuder, børster, huer og anden hovedbeklædning kan dog udgøre en mindre smitterisiko f.eks. i form af levedygtige lus, som er fulgt ud med løse hår.

**Problemstillinger/behandlingsvigt.** Hovedlus har i de senere år været betegnet som et massivt problem, og mange forældre har den oplevelse, at de ikke slipper af med dem, eller at de konstant vender tilbage. I langt de fleste tilfælde fandt vi i en skoleklasse med "luseproblemer" enten ikke nogen børn med lus, eller også var der én til to af eleverne, som havde lus. Kæmningerne giver kun et indtryk af en "her og nu" situation, og forældrenes oplysninger viser da også, at ser man over en længere periode, har flere børn haft lus.

En del af grunden til, at lus opfattes som en stor og vedvarende plage, kan skyldes, at problemet aldrig bliver løst permanent. Dels fordi behandlingen ikke er 100% effektiv, og dels fordi børnene hurtigt smittes igen fra andre i omgangskredsen, der ikke er blevet behandlet. I mange af de tilfælde, hvor flere børn fra samme lokalitet havde lus, var det vores indtryk, at de enten var "nære venner", kærester, bofæller eller søskende. Andre undersøgelser konkluderer, at den største smitterisiko kommer fra den nærmeste familie eller barnets bedste venner, som oftest er klassekammerater (Burgess 1995).

I løbet af projektperioden har vi været i kontakt med mange forældre, pædagoger, sundhedspersonale og andre, som har erfaringer og/eller problemer med hovedlusbekæmpelse. Det er en bred vifte af cases, som spænder fra tilfælde, hvor forældre er helt uvidende, om hvordan lus smitter, og hvordan man tjekker for hovedlus, og måske endda bruger mange ressourcer på at gøre rent i huset og vaske sengetøj frem for at koncentrere indsatsen til det smittede hår, til tilfælde hvor der er problemer med at opnå succesfuld behandling, selv om alt tyder på, at den/de anvendte behandlingsmetode(r) udføres korrekt; det være sig både behandlinger med de godkendte lusemidler, med forskellige alternative planteoliebaserede midler og med kæmning. I nogle tilfælde har vi oplevet, at forældrene slet ikke gjorde noget for at behandle lusene hos deres barn. De har måske givet op, fordi "det nytter jo alligevel ikke", eller måske er der ikke ressourcer i hjemmet til at gennemføre en behandling. Blandt de ældre børn var der nogle, som "havde valgt at leve med lusene" og derfor ikke gjorde noget for at slippe af med dem. Det er klart, at de børn, som ikke får en eller anden form for lusebehandling og dermed har forholdsvis mange lus, konstant vil udgøre en smitekilde for andre personer i omgangskredsen. I disse tilfælde vil forældrene til børn i omgangskredsen

ikke have en chance for at holde deres barn fri for lus i længere tid, uanset at de selv er dygtige til at håndtere problemet.

## **Strategi til forebyggelse og behandling mod hovedlus**

På baggrund af projektets resultater og erfaringer bør der udarbejdes en handlingsplan for den fremtidige behandling af hovedlus i Danmark. Handlingsplanen skal udarbejdes i tæt samarbejde mellem Sundhedsstyrelsen, Lægemiddelstyrelsen, Skadedyrlaboratoriet samt sundheds- og apotekspersonale, der har den primære kontakt med borgerne. Handlingsplanen skal indeholde følgende komponenter:

**Oplysning og opmærksomhed omkring hovedlus.** For at kunne udføre en målrettet indsats mod hovedlus er det afgørende at forstå, at både forebyggelse og behandling er en vigtig del af processen. Et vigtigt led i forebyggelsen af hovedlus er oplysning. Alle forældre (målgruppen er primært forældre til børn i alderen 3-10 år) bør have nem adgang til information om, hvordan man undersøger sit barn for lus, og hvordan de behandles.

Værktøj til bedre information kan være en brugervenlig hjemmeside med information på flere niveauer og fælles informationsmateriale, som sundheds- og apotekspersonale kan bruge til forældre og kunder. Informationsmateriale på relevante sprog bør være tilgængelige, så sundhedspersonale kan anvende dette i de tilfælde, hvor der er behov.

Der bør indføres faste årlige oplysnings- eller lusekampagner f.eks. i forbindelse med skolestart efter sommerferie. Kampagnerne kan enten organiseres nationalt, regionalt eller lokalt. Vigtige budskaber er:

- forældrene har ansvaret
- alle bør tjekke deres børn for lus en gang om ugen
- give omgangskredsen/skolen besked, hvis der findes lus
- undersøge den øvrige del af familien, hvis der findes lus
- følge op på behandlingen og kontrollere om den har virket.

Vedvarende problemer med hovedlus kan i nogle tilfælde henføres til smitte fra en eller flere personer, der af forskellige årsager ikke behandles. I disse tilfælde vil der ofte være en konstant smitterisiko for omgangskredsen, og der bør derfor indføres faste retningslinier for, hvordan institutions-, sundheds- og skolepersonale skal forholde sig med hensyn til at mindske smitterisikoen.

**Forebyggelse.** Der findes ingen midler eller metoder, der effektivt kan forebygge, at man bliver smittet med lus. Den eneste måde at undgå lus på er ved at have håret kortere end 1 cm, hvilket for langt de fleste ikke vil være en acceptabel foranstaltning. Forebyggelse af et luseproblem kan ske ved regelmæssig og forholdsvis hyppig kæmning af håret. På den måde vil eventuelle tilfælde af hovedlus hurtigt kunne opdages og behandles, så smitterisikoen bliver så lille som mulig.

**Kæmning.** Kæmning er i princippet en sikker, billig og uskadelig metode til at fjerne lus med og bør anbefales til behandling mod hovedlus. Metoden anvendes allerede af en del forældre enten som eneste behandling eller som supplement til lusemidlerne.

Kæmningen kan udføres med en almindelig tættekam eller med sugekæmning. Den bedste effekt af kæmning med almindelig tættekam opnås, hvis håret er vådt og påført balsam. Anvendes sugekæmning skal håret være tørt. Undersøgelser viser, at kæmning i praksis ikke altid er så effektiv, som man kunne forvente. Det kan skyldes, at det kræver stor grundighed og en vedholdende indsats, hvis kæmning skal være en effektiv behandling. Dermed er det ikke en metode, som man umiddelbart kan forvente, at alle har tid/ressourcer/tålmodighed til at gennemføre. Samtidig med, at metoden anbefales/fremhæves som behandling, bør der udarbejdes informationsmateriale, der nøje beskriver et kæmningsforløb.

**Lusemidler.** Lusemidler til behandling af lus burde ideelt slå alle lus og æg ihjel ved korrekt udført behandling. Vi har ikke kendskab til, at der på det danske eller globale marked findes lusemidler, der kan betegnes som 100% effektive, hvad enten der kan være resistensproblemer forbundet med disse eller ej. De lusemidler, forbrugerne har adgang til, er dels de godkendte lægemidler, som der er resistensproblemer med, dels en række alternative planteoliebaserede lusemidler, som der ikke stilles krav til om dokumentation for effektivitet. Derfor er det vigtigt at gøre det klart for forbrugere/forældre, at behandling med et lusemiddel uanset type ikke nødvendigvis løser problemet. Forældrene skal altid kontrollere, om behandlingen har haft den ønskede effekt, og vurdere om der er behov for ekstra eller anden behandling. For at gennemføre en effektiv behandling er det også afgørende, at lusemidlerne anvendes korrekt.

Anvendelsen af lusemidler med permethrin og malathion skal revurderes, idet disse vurderes at have en nedsat eller utilstrækkelig effekt. De planteoliebaserede lusemidler som er brugernes alternativ til lægemidlerne er registreret som medicinsk udstyr. Der kræves ikke godkendelse af nogen myndighed i EU, og Lægemedelstyrelsen har ikke - som ved lægemidler til behandling af hovedlus - vurderet og godkendt den dokumentation, der foreligger på effektivitet, behandlingstid og eventuelle bivirkninger ved anvendelsen af disse produkter. Medicinsk udstyr virker ifølge producenterne fysisk og ikke farmakologisk på lusene og skal opfylde en række krav til kvalitet og sikkerhed for lovligt at kunne markedsføres. Det er producenterens ansvar, at kravene overholdes, og at produktet CE-mærkes af producenten som tegn på, at kravene er opfyldt.

**Resistens.** Forekomst af insekticidresistens hos danske hovedlus samt betydningen af resistensen for bekæmpelsen af hovedlus skal indarbejdes i vejledningen om hovedlus. Der skal etableres faste rutiner vedrørende registrering af tilfælde af behandlingssvigt/resistens ved anvendelse af permethrin eller malathion og evt. nye aktivstoffer, der markedsføres i Danmark. Der bør gennemføres en landsdækkende undersøgelse af styrken og forekomsten af resistens over for de på markedet værende kemiske midler med jævne mellemrum, f.eks. hvert tredje år. Den herved indsamlede viden kan løbende anvendes i rådgivningen om anvendelse af de kemiske lusemidler

## Referencer

- Audino, P. G., S. Barrios, C. Vassena, G. M. Cueto, E. Zerba, and M. I. Picollo. 2005.** Increased monooxygenase activity associated with resistance to permethrin in *Pediculus humanus capitis* (Anoplura : Pediculidae) from Argentina. *J. Med. Entomol.* 42:342-345.
- Blommers, L. and M. van Lennep. 1978.** Head lice in the Netherlands: susceptibility for insecticides in field samples. *Entomol. Exp. Appl.* 23:243-251.
- Burgess, I. 1995.** *Pediculus Humanus Capitis* in Schoolchildren. *Lancet* 345:730-731.
- Burgess, I., S. Peock, C. M. Brown, and J. Kaufman. 1995.** Head lice resistant to pyrethroid insecticides in Britain. *BMJ* 311:752.
- Canyon, D. V., R. Speare, and R. Muller. 2002.** Spatial and kinetic factors for the transfer of head lice (*Pediculus capitis*) between hairs. *Journal of Investigative Dermatology* 119:629-631.
- Chosidow, O., C. Chastang, C. Brue, E. Bouvet, M. Izri, N. Monteny, S. Bastuji-Garin, J. J. Rousset, and J. Revuz. 1994.** Controlled study of malathion and d-phenothrin lotions for *Pediculus humanus var capitis*-infested schoolchildren. *Lancet* 344:1724-1727.
- Downs, A.-M. R., K. A. Stafford, I. Harvey, and G. C. Coles. 1999.** Evidence for double resistance to permethrin and malathion in head lice. *British Journal of Dermatology* 141:508-511.
- Gao, J. R., K. S. Yoon, S. H. Lee, M. Takano-Lee, J. D. Edman, T. L. Meinking, D. Taplin, and J. M. Clark. 2003.** Increased frequency of the T929I and L932F mutations associated with knockdown resistance in permethrin-resistant populations of the human head louse, *Pediculus capitis*, from California, Florida and Texas. *Pestic Biochem Physiol* 77:115-124.
- Kristensen, M. 2005.** Identification of sodium channel mutations in human head louse (Anoplura; Pediculidae) from Denmark. *J Med Entomol* 42:826-829.
- Lee, S. H., J. R. Gao, K. S. Yoon, K. Y. Mumcuoglu, D. Taplin, J. D. Edman, L. M. Takano, and J. M. Clark. 2003.** Sodium channel mutations associated with knockdown resistance in the human head louse, *Pediculus capitis* (De Geer). *Pestic. Biochem. Physiol.* 75:79-91.
- Lee, S. H., K. S. Yoon, M. S. Williamson, S. J. Goodson, L. M. Takano, J. D. Edman, A. L. Devonshire, and J. M. Clark. 2000.** Molecular analysis of kdr-like resistance in permethrin-resistant strains of head lice, *Pediculus capitis*. *Pestic Biochem Physiol* 66:130-143.

- Maunder, J. W. 1971.** Resistance to organochlorine insecticides in head lice, and trials using alternative compounds. *Medical Officer* 27-29.
- Mumcuoglu, K., J. Miller, R. Gofin, B. Adler, F. Ben Ishai, and R. Almog. 1990.** Epidemiological studies on head lice infestation in Israel. I. Parasitological examination of children. *International Journal of Dermatology* 29:502-506.
- Mumcuoglu, K. Y., J. Hemingway, J. Miller, I. Ioffe-Uspensky, S. Klaus, F. Ben-Ishai, and R. Galun. 1995.** Permethrin resistance in the head louse *Pediculus capitis* from Israel. *Med Vet Entomol* 9:427-447.
- Piccolo, M. I., C. V. Vassena, G. A. M. Cueto, M. Verneti, and E. N. Zerba. 2000.** Resistance to insecticides and effect of synergists on permethrin toxicity in *Pediculus capitis* (Anoplura : Pediculus) from Buenos Aires. *J Med Entomol* 37:721-725.
- Rasmussen, A. M. and K. Søholt Larsen. 1998.** Hovedlus. Statusartikel. *Ugeskr Laeger* 160:6057-6060.
- Rasmussen, A. M. and K. Søholt Larsen. 1999.** Spørgeskemaundersøgelse om hovedlus (*Pediculus capitis*) i Danmark. *Danish Pest Infestation Laboratory Report* 12:1-37.
- Rosdahl, N. 1975.** DDT-resistant head lice. *Ugeskr Laeger* 137:1931-1933.
- Rupes, V., J. Moravec, J. Chmela, J. Ledvinka, and J. Zelenkov. 1995.** A resistance of head lice (*Pediculus capitis*) to permethrin in Czech Republic. *Cent Eur J Public Health* 3:30-32.
- Takano-Lee, M., K. S. Yoon, J. D. Edman, B. A. Mullens, and J. M. Clark. 2003.** In vivo and in vitro rearing of *Pediculus humanus capitis* (Anoplura : Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 40:628-635.
- Tomita, T., N. Yaguchi, M. Mihara, M. Takahashi, N. Agui, and S. Kasai. 2003.** Molecular analysis of a para sodium channel gene from pyrethroid-resistant head lice, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 40:468-474.
- Vassena, C. V., G. Mougabure Cueto, P. Gonzalez Audino, R. A. Alzogaray, E. N. Zerba, and M. Piccolo, I. 2003.** Prevalence and levels of permethrin resistance in *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires, Argentina. *J. Med. Entomol.* 40:447-450.
- Yoon, K. S., J. R. Gao, S. H. Lee, G. C. Coles, T. L. Meinking, D. Taplin, J. D. Edman, M. Takano-Lee, and J. M. Clark. 2004.** Resistance and cross-resistance to insecticides in human head lice from Florida and California. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80:192-201.

## Appendiks

1. Bestemmelse af dosis-mortalitet af malathion hos kropslus i dråbetest.....	31
2. Bestemmelse af dosis-mortalitet af permethrin hos kropslus i dråbetest. ....	32
3. Undersøgelse af permethrin-resistens hos danske hovedlus 2004-05. ....	33
4. Undersøgelse af malathion-resistens hos danske hovedlus 2004-05.....	34
5. Undersøgelse af antallet af permethrin-resistente gener hos danske hovedlus...	35
6. Kristensen (2005). Identification of sodium channel mutations in human head louse (Anoplura; Pediculidae) from Denmark. <i>Journal of Medical Entomology</i> 42 (5): 826-829.....	36

**Appendiks 1.** Bestemmelse af dosis-mortalitet af malathion hos kropslus i dråbetest. Dødelighed ved 2, 4, 6 og 24 timer. L3 = Tredje nymfestadium, F = voksne hunner.

	Dato	LD <sub>50</sub> (95% C.I.) ng per kropslus	LD <sub>95</sub> (95% C.I.) ng per kropslus	Hældning (± SEM)	χ <sup>2</sup> (df)	P>χ <sup>2</sup>
2t	L3 300604	18.2 (13.8-25.4)	45.1 (30.9-90.0)	4.2 (± 0.76)	5.0 (5)	0.41
	F 280704	12.2 (0.55-30.8)	95.8 (35.8-5,600)	1.8 (± 0.56)	12 (4)	0.017
	L3 280704	18.2 (12.7-24.9)	123 (74.8-298)	2.0 (± 0.32)	5.4 (4)	0.24
	L3 100804	22.1 (10.5-44.4)	86.9 (43.5-1,260)	2.8 (± 0.65)	13 (4)	0.0097
	L3 180804	13.3 (9.95-17.4)	53.2 (35.9-110)	2.7 (± 0.47)	0.62 (3)	0.89
	L3 240804	11.7 (8.81-15.0)	40.5 (28.2-78.7)	3.0 (± 0.53)	0.22 (3)	0.97
	L3 310804	6.37 (0.00-21.3)	29.2 (12.0->900)	2.5 (± 0.75)	8.7 (3)	0.033
	F 010904	6.09 (4.91-7.39)	20.0 (15.0-31.9)	3.2 (± 0.45)	6.1 (3)	0.11
	F 070904	4.88 (3.88-6.04)	8.75 (6.90-14.0)	6.5 (± 1.4)	2.6 (3)	0.46
4t	L3 300604	15.6 (11.7-22.2)	46.0 (30.0-103)	3.5 (± 0.62)	3.0 (5)	0.71
	F 280704	10.2 (6.19-14.6)	79.4 (48.1-202)	1.8 (± 0.33)	7.5 (4)	0.11
	L3 280704	16.6 (11.7-22.4)	97.9 (62.2-216)	2.1 (± 0.34)	6.3 (4)	0.18
	L3 100804	13.2 (11.0-15.9)	36.4 (27.7-56.7)	3.7 (± 0.53)	3.0 (4)	0.55
	L3 180804	10.4 (7.78-13.4)	36.4 (25.3-71.4)	3.0 (± 0.55)	1.1 (3)	0.79
	L3 240804	8.54 (6.50-10.7)	23.8 (17.3-45.2)	3.7 (± 0.74)	0.19 (3)	0.98
	L3 310804	5.75 (4.19-7.48)	18.4 (13.1-33.7)	3.3 (± 0.58)	4.8 (3)	0.19
	F 010904	6.36 (5.21-7.66)	19.2 (14.5-29.8)	3.4 (± 0.48)	3.0 (3)	0.39
	F 070904	4.97 (3.91-6.21)	8.91 (6.98-14.5)	6.5 (± 1.4)	3.4 (3)	0.34
6t	L3 300604	10.2 (7.95-14.1)	30.2 (20.1-67.0)	3.5 (± 0.65)	2.7 (5)	0.75
	F 280704	9.94 (0.38-23.7)	71.1 (28.1-1,750)	1.9 (± 0.58)	11 (4)	0.022
	L3 280704	16.8 (5.19-33.5)	114 (48.9-3,720)	1.9 (± 0.46)	8.4 (4)	0.078
	L3 100804	11.4 (9.27-13.8)	35.3 (26.5-56.8)	3.4 (± 0.49)	0.46 (4)	0.98
	L3 180804	9.75 (7.47-12.3)	29.2 (20.9-55.8)	3.5 (± 0.65)	0.98 (3)	0.81
	L3 240804	6.72 (5.00-8.34)	16.3 (12.2-30.6)	4.3 (± 0.96)	1.7 (3)	0.64
	L3 310804	6.09 (4.36-8.19)	20.3 (13.9-40.5)	3.1 (± 0.57)	3.7 (3)	0.30
	F 010904	6.22 (5.08-7.50)	19.0 (14.4-29.8)	3.4 (± 0.47)	3.9 (3)	0.27
	F 070904	4.97 (3.91-6.21)	8.91 (6.98-14.5)	6.5 (± 1.4)	3.4 (3)	0.34
24t	L3 300604	Ikke beregnet				
	F 280704	6.06 (2.60-9.53)	62.7 (36.1-201)	1.6 (± 0.34)	5.1 (4)	0.28
	L3 280704	10.1 (0.51-22.9)	104 (38.6-10,200)	1.6 (± 0.46)	9.0 (4)	0.061
	L3 100804	8.13 (6.43-9.85)	24.0 (18.1-39.4)	3.5 (± 0.58)	2.0 (4)	0.73
	L3 180804	5.70 (3.16-7.75)	22.7 (15.3-59.0)	2.7 (± 0.68)	1.7 (3)	0.65
	L3 240804	5.12 (2.97-6.54)	13.2 (9.71-33.6)	4.0 (± 1.2)	0.35 (3)	0.95
	L3 310804	4.36 (3.20-5.64)	10.7 (7.80-20.1)	3.1 (± 0.57)	3.7 (3)	0.30
	F 010904	5.14 (1.84-9.36)	17.0 (9.35-390)	3.2 (± 0.74)	7.5 (3)	0.057
	F 070904	4.6 (-)	5.3 (-)	>10	0.56 (3)	0.91

**Appendiks 2.** Bestemmelse af dosis-mortalitet af permethrin hos kropslus i dråbetest. Dødelighed ved 2, 4, 6 og 24 timer. L3 = Tredje nymfestadium, F = voksne hunner.

	Dato	LD <sub>50</sub> (95% C.I.) ng per kropslus	LD <sub>95</sub> (95% C.I.) ng per kropslus	Hældning (± SEM)	χ <sup>2</sup> (df)	P>χ <sup>2</sup>	
2t	L3	170804	0.19 (0.15-0.24)	0.58 (0.42-1.01)	3.4 (± 0.55)	4.0 (5)	0.56
	F	170804	0.34 (0.25-0.51)	1.68 (0.91-9.08)	2.4 (± 0.59)	4.1 (2)	0.13
	L3	180804	0.17 (0.14-0.21)	0.41 (0.31-0.71)	4.3 (± 0.79)	3.9 (5)	0.56
	L3	240804	0.23 (0.18-0.30)	0.89 (0.61-1.68)	2.8 (± 0.43)	4.6 (5)	0.47
	F	250804	Ikke beregnet				
	L3	250804	0.05 (0.01-0.08)	0.31 (0.20-1.20)	2.1 (± 0.61)	0.86 (4)	0.93
	L3	310804	0.07 (0.03-0.10)	0.40 (0.25-1.14)	2.1 (± 0.50)	2.9 (4)	0.57
	L3	070904	0.10 (0.09-0.12)	0.25 (0.20-0.40)	4.3 (± 0.72)	0.95 (4)	0.92
4t	L3	170804	0.21 (0.17-0.27)	0.63 (0.46-1.10)	3.5 (± 0.55)	2.3 (5)	0.81
	F	170804	0.30 (0.21-0.43)	1.46 (0.81-7.16)	2.4 (± 0.59)	2.5 (2)	0.28
	L3	180804	0.20 (0.16-0.25)	0.54 (0.40-0.93)	3.9 (± 0.67)	2.4 (5)	0.80
	L3	240804	0.07 (0.05-0.09)	0.20 (0.14-0.47)	3.7 (± 0.99)	1.1 (5)	0.95
	F	250804	0.11 (0.02-0.16)	0.34 (0.24-1.46)	3.5 (± 1.3)	0.56 (4)	0.97
	L3	250804	0.06 (0.02-0.09)	0.33 (0.21-1.25)	2.1 (± 0.60)	1.4 (4)	0.85
	L3	310804	0.08 (0.04-0.12)	0.55 (0.35-1.47)	2.0 (± 0.42)	5.4 (4)	0.25
	L3	070904	0.15 (0.13-0.17)	0.29 (0.24-0.42)	5.6 (± 0.91)	1.4 (4)	0.84
6t	L3	170804	0.27 (0.21-0.34)	0.99 (0.67-1.81)	2.9 (± 0.44)	8.7 (5)	0.12
	F	170804	0.33 (0.24-0.49)	1.46 (0.83-6.61)	2.6 (± 0.59)	4.3 (2)	0.12
	L3	180804	0.25 (0.21-0.32)	0.63 (0.47-1.08)	4.1 (± 0.71)	6.0 (5)	0.31
	L3	240804	0.13 (0.09-0.17)	0.52 (0.35-1.10)	2.7 (± 0.49)	3.7 (5)	0.59
	F	250804	0.16 (0.09-0.20)	0.39 (0.29-0.96)	4.2 (± 1.2)	0.85 (4)	0.93
	L3	250804	0.11 (0.07-0.15)	0.59 (0.37-1.67)	2.2 (± 0.47)	3.2 (4)	0.52
	L3	310804	0.12 (0.08-0.17)	0.71 (0.46-1.58)	2.2 (± 0.39)	4.3 (4)	0.37
	L3	070904	0.17 (0.15-0.20)	0.35 (0.28-0.51)	5.3 (± 0.86)	1.0 (4)	0.90
24t	L3	170804	0.46 (0.35-0.60)	1.98 (1.33-3.73)	2.6 (± 0.36)	7.1 (5)	0.21
	F	170804	0.58 (0.38-1.76)	4.82 (1.65-485)	1.8 (± 0.58)	0.15 (2)	0.93
	L3	180804	0.36 (0.28-0.46)	1.18 (0.84-2.04)	3.2 (± 0.46)	8.8 (5)	0.12
	L3	240804	0.28 (0.22-0.37)	1.16 (0.79-2.23)	2.7 (± 0.40)	0.91 (4)	0.92
	F	250804	0.59 (0.40-0.89)	3.76 (1.96-15.9)	2.0 (± 0.43)	2.2 (4)	0.70
	L3	250804	0.28 (0.21-0.39)	1.25 (0.78-3.11)	2.5 (± 0.44)	2.7 (4)	0.63
	L3	310804	0.20 (0.14-0.26)	1.02 (0.66-2.16)	2.3 (± 0.37)	0.44 (4)	0.98
	L3	070904	0.25 (0.21-0.32)	0.97 (0.69-1.65)	2.8 (± 0.38)	2.5 (4)	0.65



**Appendiks 3.** Undersøgelse af permethrin-resistens hos danske hovedlus 2004-05. Procent døde hovedlus er angivet. Lusene er testet med en diskriminerende dosis på 2 ng permethrin eller lusemidlet Nix<sup>®</sup>.

Prøve	Antal	Kontrol	Permethrin	Nix <sup>®</sup>
3	26	0	0	
4	10		25	
5	22	0	0	
6	27	0	0	
7	18	0	0	
8	7	0	0	
9	110	0	0	
11	28	0	11	
12	20	0	0	
14	19	0	0	
15	26	0	0	
16	31	0	0	
17	30	0	0	
18	280	10	0	20
19	50	10	0	
20	20	0	0	
22	260	10	60	
23	50	0	0	
24	50	10	20	
25	50	10	10	
26	50	0	0	
27	80	0	3	
29	11			36
31	100	0	0	70
36	50	0	0	100
32	30	0		30
33	20			0
34	20			20
36	60	0	10	40

**Appendiks 4.** Undersøgelse af malathion-resistens hos danske hovedlus 2004-05. Procent døde hovedlus er angivet. Lusene er testet med en diskriminerende dosis på 100 ng malathion eller lusemidlet Prioderm<sup>®</sup> shampoo.

Prøve	Antal	Kontrol	Malathion	Prioderm <sup>®</sup>
1	24	0	43	
2	44	0	6	
4	10		20	
6	27	0	56	
9	110	0	30	
10	19	0	10	
11	28	0	50	
13	20	0	40	
14	19	0	0	
15	26	0	0	
16	31	0	10	
17	30	0	0	
18	280	10	0	40
19	50	10	80	
21	26	0	0	
22	260	10	15	
23	50	0	50	
24	50	10	5	
25	50	10	35	
26	50	0	5	
27	80	0	0	
29	100	0	0	90
30	20	0	0	
31	50	0	20	100
32	30	0		10
33	20			30
34	20			30
35	26	0	30	40
36	60	0	0	60

**Appendiks 5.** Undersøgelse af antallet af permethrin-resistente gener hos danske hovedlus. F = følsom gen. R = resistent gen. Andet = hovedlus med andre mutationer. (se Appendix 6 for detaljer vedr. metoden).

Prøve	Antal	F/F	F/R	R/R	Andet	Frekvens af R
3	26			26		1
5	6			6		1
6	23			23		1
8	7			7		1
9	39			39		1
11	14			14		1
14	22			22		1
18	22			22		1
22	46	1	16	29		0.80
24	18			18		1
27	12			12		1
28	10			10		1
31	20			20		1
34	18			18		1
36	20			20		1
37	8	2		6		0.75
38	17	7	1	8	1	0.5
39	14	1	5	8		0.75
40	13			13		1
41	2		1	1		0.75
42	1			1		1
43	20			18	2	0.90
44	20	1		19		0.95
45	4			4		1
46	4			4		1
47	6			6		1
48	9			9		1
49	10			10		1
50	2			2		1
51	8			8		1
52	3			3		1
53	5			5		1
Total	449	12	23	411		0.95

# Identification of Sodium Channel Mutations in Human Head Louse (Anoplura: Pediculidae) from Denmark

MICHAEL KRISTENSEN

Danish Pest Infestation Laboratory, Danish Institute of Agricultural Science, Skovbrynet 14, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark

J. Med. Entomol. 42(5): 826-829 (2005)

**ABSTRACT** The presence of the two mutations T929I-L932F in the voltage-sensitive sodium channel gene associated with permethrin resistance (*kdr*-like) was shown in head louse, *Pediculus humanus capitis* De Geer, populations in Denmark. The existence of one susceptible and one T929I-L932F haplotype based on the limited single nucleotide polymorphism (SNP) of these sequences was established. One louse had an SNP causing a G943A substitution in the *trans*-membrane segment five of domain II on the sodium channel, which has not been identified in other insect species. A polymerase chain reaction-restriction endonuclease method using genomic DNA to discriminate between resistant and susceptible alleles in head lice was developed and implemented. The SNP that results in the T929I substitution also creates a cutting site for the restriction endonuclease *SspI*, and the presence of one or two *SspI* cutting sites in head lice is diagnostic for the T929I-L932F haplotype.

**KEY WORDS** *Pediculus humanus capitis*, pyrethroid resistance, allele-specific polymerase chain reaction, knockdown resistance

THE HEAD LOUSE, *Pediculus humanus capitis* De Geer, is a prevalent pest of human populations. It is frequent among school children to  $\approx 12$  yr, and in recent years the problem seems to be increasing in many parts of the world (Burgess 2004). A rise in sales of pediculicides and widespread anecdotal reports of treatment failures in Denmark as well as documentation of widespread resistance in head lice in England (Downs et al. 2002), Australia (Hunter and Barker 2003), and Argentina (Picollo et al. 1998) suggest that resistance to the insecticides used in pediculicides could be increasing.

Recently, three point mutations (M815I, T929I, and L932 F) in the voltage-gated sodium channel  $\alpha$ -subunit were associated with permethrin resistance in head lice from United States and the United Kingdom as well as Japan (Lee et al. 2000, Tomita et al. 2003). The three mutations are found together and probably coexist as a haplotype; it can be speculated that it is a worldwide head lice permethrin resistance haplotype. The T929I mutation has been functionally validated as a knockdown resistance, *kdr*, type in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), and recently in the head louse by expression in *Xenopus* oocytes (Vais et al. 2001, Lee et al. 2005). One additional mutation, D11E, has been identified, but it is unlikely to be involved in insensitivity of the sodium channel, because it is conservative, located in an N-terminal inner membrane segment, and found in susceptible body lice (Gao et al. 2003, Tomita et al. 2003).

Increased frequency of the *kdr*-like T929I-L932F haplotype was associated with knockdown resistance

in permethrin-resistant populations of head lice from different parts of the United States, i.e., head lice populations phenotyped to have high frequency of permethrin resistance had high frequency of the resistant allele; but in one permethrin-resistant strain, the resistance were synergized by piperonyl butoxide, which inhibits monooxygenases (Gao et al. 2003, Yoon et al. 2004). Thus, multiple resistance mechanisms occur against permethrin.

The objectives of this study are to investigate the presence and the incidence of the T929I-L932F mutations in head lice from Denmark and to develop and implement a simple and fast method for determination of permethrin resistance in head lice. Sequence determination of genomic polymerase chain reaction (PCR)-amplified fragments from a number of individuals also should reveal whether the different genotypes have multiple origins. This research is the first step in a larger survey of insecticide resistance in head lice in Denmark.

## Materials and Methods

**Head Lice.** Lice were collected from heads of infested children in Denmark. In school A, head lice were found on three of 42 children combed. One child had one louse, whereas two children had >50 lice of different developmental stages. In school B, head lice were found on four of 29 children combed. Two children had >50 lice of different developmental stages. One child had 19 newly hatched head lice, and one child had two female and 10 male head lice. In

school C, head lice were found on seven of 88 children combed. One child had >50 lice, whereas the remaining children had from three to 17 lice of different developmental stages. The Danish Pest Infestation Laboratory (DPIL) sample was from a child with >200 head lice combed at the laboratory.

**Genomic DNA Extraction.** Genomic DNA was extracted from individual adult or nymphal head lice by DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). A louse was homogenized in 100  $\mu$ l of DNAzol by using a sterile plastic pellet pestle (Kontes, Vineland, NJ). After 30-min incubation, the homogenate was centrifuged for 10 min at  $10,000 \times g$  at room temperature. The supernatant was transferred to a tube, and DNA was precipitated by adding 60  $\mu$ l of 96% ethanol. The sample was cooled to  $-20^{\circ}\text{C}$  for 20 min, and the DNA pelleted by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 7 min. The DNA pellet was washed by ice-cold 70% ethanol, air-dried, and suspended in 25  $\mu$ l of 8 nM NaOH.

**PCR-Restriction Endonuclease (REN) Assay.** To genotype each head louse for the presence of the T929I and L932F replacements in the sodium channel, a PCR-REN method was developed based on the report of Lee et al. (2003). A nested PCR with two outer primers (5'BL5'GN: GAGTCTTCAAATTGGCCAAATC-GTG; and 3'SPI: CATTGTCAGCGGTGGGAGCAGA) and two inner primers (5'SPIL: CCCACGTTAAATT-TATTAATTTCAA; and 3'SP5N: GATAAACTAGAGG-AACCGAAATT) amplified a 561-bp fragment. Cutting the fragment with *SspI* (New England BioLabs, Beverly, MA) gives a diagnostic restriction enzyme pattern for resistant and susceptible genotypes as well as identifies heterozygotes. The PCR was 25- $\mu$ l reactions performed in thin-walled microcentrifuge tubes by using the optimized reaction conditions: 1  $\mu$ l of genomic DNA prepared as described above from single head lice, 10 pmol of each primer, 2.5  $\mu$ l of  $10\times$  PCR buffer, 1 pmol of dNTP mix, 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  bovine serum albumin, and 1 U of *Taq* DNA polymerase. Amplification conditions were of  $95^{\circ}\text{C}$  for 1 min followed by 35 cycles, each consisting of denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s, annealing at  $56^{\circ}\text{C}$  for 30 s, extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 60 s, and a final extension step at  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Ten microliters of amplified fragments was digested by *SspI* and analyzed by 3% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining under UV light.

**Sequencing of DNA Fragments.** The PCR fragments were purified by QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Valencia, CA) and were sequenced in both directions by the primers used for amplification or two sequencing primers (Lus7: TTCAATTATGGGTCCA; and Lus8: CCGAAATTTGAGAGTA) with dye terminators on an ABI PRISM377 DNA sequencer (MWG-Biotech, Ebersberg, Germany). The sequences were assembled and analyzed with the Sequencher program (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

## Results and Discussion

**T929I-L932 F Haplotypes in Danish Head Lice.** To evaluate the presence of the T929I and L932F mutation in Denmark, head lice were collected from sev-

eral different schools by combing. Genomic DNA was prepared from 43 lice, and a 561-bp fragment of the sodium channel gene was amplified by PCR. The 561-bp fragment was determined to be a fragment of the sodium channel gene, compared with the published cDNA sequence GenBank AY191156 (Lee et al. 2003). In the amplified genomic sequence, the coding sequence were interrupted by two introns (Fig. 1).

Three different sequences were identified in our material (Fig. 1). A susceptible unaltered sequence (GenBank DQ062567), which was found in 10 lice; the T929I-L932 F *kdr*-like mutation (GenBank DQ062568), which was identified in 32 lice, and of these six seemed to be heterozygotes as determined by visual inspection of the nucleotide sequence chromatograms (Table 1); and one louse (ph45) had a different phenotype (GenBank DQ062569).

There was no variation among the 10 susceptible and the 32 *kdr* sequences. In the coding sequence, the only variation between the susceptible and the *kdr* sequences was the two C $\rightarrow$ T single nucleotide polymorphisms (SNPs), causing the T929I-L932 F substitutions that lead to the resistance haplotype. Comparison of the introns showed seven SNPs.

The presence of the *kdr*-like T929I-L932 F haplotype that has been linked to permethrin resistance (Gao et al. 2003, Yoon et al. 2004) was shown in Danish head lice populations, and the one susceptible and one *kdr*-like haplotype were established based on the limited number of SNPs in these sequences. A comparison of haplotypes from multiple geographic origins would be interesting.

**New Sodium Channel Mutation.** One louse had a different nucleotide sequence (ph45), with a G $\rightarrow$ C SNP causing a G943A substitution (Fig. 1). The ph45 sequence was susceptible T929-L932, but it had a distinct intron. Compared with the susceptible sequence, it had five SNPs, whereas it only had two compared with the *kdr*-like allele (Fig. 1). The G943A mutation is like the T929I-L932 F mutations occurring in the *trans*-membrane segment five of domain II on the sodium channel and has not been identified in other insect species.

**Establishment of a *kdr* Genotyping Technique.** The C $\rightarrow$ T SNP that predicts the T929I substitution also creates a cutting site for the restriction endonuclease *SspI*. A screening of the PCR fragment identified an additional cutting site for *SspI* in both the susceptible and the *kdr* sequences (Fig. 1). The presence of one or two *SspI* cutting sites in head lice would thus be diagnostic for the T929I-L932F haplotype. A susceptible head louse can be identified by two bands of 429 and 131 bp after cutting with *SspI* (Fig. 2). A T929I-L932F head louse can be identified by three bands of 370, 131, and 60 bp after cutting with *SspI* (Fig. 2). Four bands, 429, 370, 131, and 60 bp, are indicative of the heterozygote (Fig. 2).

Individual head lice were genotyped without knowing their sequences. The genotyping was doubtful in two of the 43 lice. In one louse, the amount of PCR product was low, and the PCR-REN expected a sus-

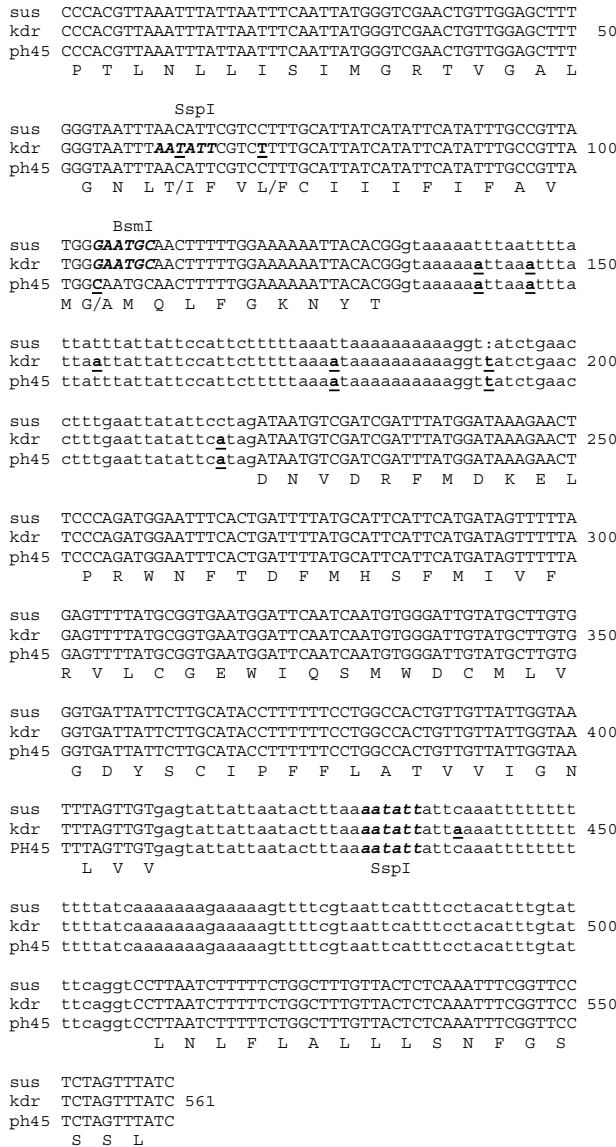
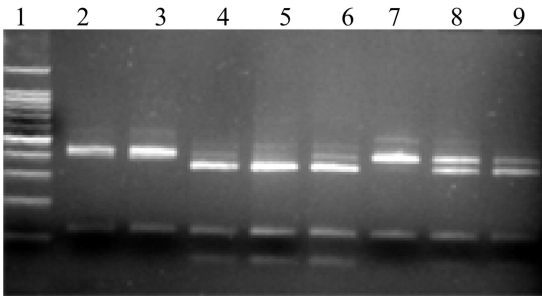


Fig. 1. Alignment of the *P. humanus capitis* sodium channel genomic fragment nucleotide sequences and deduced amino acid sequences from susceptible, *kdr*-like, and ph45 alleles. The *SspI* (AATATT) and the *BsmI* recognition sites (GAATGC) are shown in bold. Single nucleotide polymorphisms are bold and underlined.

ceptible or heterozygote outcome, and the sequencing showed susceptible. Another louse was expected to be heterozygote, but the susceptible bands were weak. This finding was confirmed by sequencing where the *kdr*-like and the susceptible sequences were disproportionate. This outcome could be because of contamination and not a true heterozygote. Testing of the 43 head lice by PCR-REN confirmed the sequencing results (Table 1), but ≈5% of the individuals should be expected to be doubtful in a larger survey. Repeating questionable results could decrease this number.

Table 1. Distribution of the T9291-L932F *kdr*-like allele in Danish head lice from different localities as determined by nucleotide sequence determination and PCR-REN genotyping

Location	Child	n	<i>kdr/kdr</i>	<i>kdr/sus</i>	<i>sus/sus</i>	C943A
School A	11	8	6		2	
School B	4	4	4			
	5	10	1	1	7	1
School C	15	3	3			
	2	7	3		4	
	3	6	4	1	1	
DPIL	4	1	1			
	1	4	4			



**Fig. 2.** Genotype of sodium channel gene alleles by PCR-REN after separation on a 3% agarose gel. The diagnostic restriction enzyme pattern after cutting with *SspI* of susceptible head lice (lanes 2, 3, and 7) is 429 and 131 bp; *kdr*-like head lice (lanes 4–6) is 370, 131 and 60 bp; and heterozygotes (lanes 8 and 9) is 429, 370, 131, and 60 bp. The marker in the first lane is 100-bp DNA ladder.

The frequency of the T929I-L932 F *kdr*-like haplotype was 0.67 in this relatively small sample from four different locations. A larger survey will be needed to confirm the pyrethroid resistance status of Danish head lice populations. Persistent cross-resistance is possible, because DDT-resistance in Danish head lice was reported in the 1970s (Rosdahl 1975), and permethrin has been widely used for head lice control for the past two decades in Denmark.

The G943A haplotype also could be determined diagnostically by the restriction endonuclease *BsmI* (Fig. 1), which cut both the susceptible and the *kdr* alleles, whereas an allele with the G→C SNP, causing the G943A substitution, was not cut.

A PCR-REN method using genomic DNA to discriminate between resistant and susceptible sodium channel gene alleles in head lice was implemented. The technique allows for easy discrimination of three genotypes by the number of bands detected on an agarose gel. The advantage of the PCR-REN method is low price and minimal equipment (PCR machine and a gel electrophoresis apparatus) to run the test. However, a major disadvantage with the PCR-REN technique is that any new alleles, such as the G943A, which does not change the potential restriction enzymes site, are not detected. Most other PCR diagnostics, e.g., TaqMan assay (Daborn et al. 2004) or the serial invasive signal amplification reaction recently developed for genotyping of permethrin-resistant head lice (Kim et al. 2004), are costly to establish, and new resistance-causing alleles are not detected. An advantage of these techniques is that no gels need to be run.

#### Acknowledgments

I thank the louse group Anne-Marie Rasmussen, Mette Knorr, Kristian Hansen, and Jørgen B. Jespersen for collection of head lice and encouraging participation in the project. The Danish Ministry for the Interior and Health supported this work.

#### References Cited

- Burgess, I. E. 2004. Human lice and their control. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 457–481.
- Daborn, P. J., C. McCart, D. Woods, and R. H. ffrench-Constant. 2004. Detection of insecticide resistance-associated mutations in cat flea *Rdl* by TaqMan-allele specific amplification. *Pestic. Biochem. Physiol.* 79: 25–30.
- Downs, A.M.R., K. A. Stafford, L. P. Hunt, J. C. Ravenscroft, and G. C. Coles. 2002. Widespread insecticide resistance in head lice to the over-the-counter pediculocides in England, and the emergence of carbaryl resistance. *Br. J. Dermatol.* 146: 88–93.
- Gao, J. R., K. S. Yoon, S. H. Lee, M. Takano-Lee, J. D. Edman, T. L. Meinking, D. Taplin, and J. M. Clark. 2003. Increased frequency of the T929I and L932F mutations associated with knockdown resistance in permethrin-resistant populations of the human head louse, *Pediculus capitis*, from California, Florida and Texas. *Pestic. Biochem. Physiol.* 77: 115–124.
- Hunter, J. A., and S. C. Barker. 2003. Susceptibility of head lice (*Pediculus humanus capitis*) to pediculicides in Australia. *Parasitol. Res.* 90: 476–478.
- Kim, H. J., S. B. Symington, S. H. Lee, and J. M. Clark. 2004. Serial invasive signal amplification reaction for genotyping permethrin-resistant (*kdr*-like) human head lice, *Pediculus capitis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80: 173–182.
- Lee, S. H., J. R. Gao, H. J. Kim, and J. M. Clark. 2005. Control and management of human pediculosis, pp. 383–393. In J. M. Clark and H. Ohkawa [eds.], *New discoveries in agrochemicals*. Oxford University Press, New York.
- Lee, S. H., J. R. Gao, K. S. Yoon, K. Y. Mumcuoglu, D. Taplin, J. D. Edman, L. M. Takano, and J. M. Clark. 2003. Sodium channel mutations associated with knockdown resistance in the human head louse, *Pediculus capitis* (De Geer). *Pestic. Biochem. Physiol.* 75: 79–91.
- Lee, S. H., K. S. Yoon, M. S. Williamson, S. J. Goodson, L. M. Takano, J. D. Edman, A. L. Devonshire, and J. M. Clark. 2000. Molecular analysis of *kdr*-like resistance in permethrin-resistant strains of head lice, *Pediculus capitis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 66: 130–143.
- Piccollo, M. I., C. V. Vassena, A. A. Casadio, J. Massimo, and E. N. Zerba. 1998. Laboratory studies of susceptibility and resistance to insecticides in *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 35: 814–817.
- Rosdahl, N. 1975. DDT-resistant head lice. *Ugeskr. Laeger.* 137: 1931–1933.
- Tomita, T., N. Yaguchi, M. Mihara, M. Takahashi, N. Agui, and S. Kasai. 2003. Molecular analysis of a para sodium channel gene from pyrethroid-resistant head lice, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 40: 468–474.
- Vais, H., M. S. Williamson, A. L. Devonshire, and P.N.R. Usherwood. 2001. The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pest Manag. Sci.* 57: 877–888.
- Yoon, K. S., J. R. Gao, S. H. Lee, G. C. Coles, T. L. Meinking, D. Taplin, J. D. Edman, M. Takano-Lee, and J. M. Clark. 2004. Resistance and cross-resistance to insecticides in human head lice from Florida and California. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80: 192–201.

Received 7 March 2005; accepted 23 May 2005.