



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาบทบาทและความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสสมองอักเสบ Japanese
Encephalitis ยุงพาหะนำโรค นกอพยพ และค้างคาวในธรรมชาติ

(The role and relationship of Japanese Encephalitis virus, mosquito vectors, immigration
birds, and bats in nature)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สนทยา เตียวศิริทรัพย์ และคณะ

พฤษภาคม 2553

สัญญาเลขที่ MRG5180153

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาบทบาทและความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสสมองอักเสบ Japanese
Encephalitis ยุงพาหะนำโรค นกอพยพ และค้างคาวในธรรมชาติ

(The role and relationship of Japanese Encephalitis virus, mosquito vectors, immigration
birds, and bats in nature)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สนธยา เตียวศิริทรัพย์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร.สุรางค์ นุชประยูร
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5180153

ชื่อโครงการ : การศึกษาบทบาทและความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสสมองอักเสบ Japanese Encephalitis ยุงพาหะนำโรค นกอพยพ และค้างคาวในธรรมชาติ

ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สนทยา เตียวศิริทรัพย์

หน่วยประสิทธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : sonthaya.t@chula.ac.th, thaya18@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ : วันที่ 15 พฤษภาคม 2551 ถึงวันที่ 14 พฤษภาคม 2553

ทำการศึกษาความหลากหลายของชนิดและปริมาณของยุงจาก 2 พื้นที่ คือ แหล่งนกอพยพ ณ วัดไผ่ล้อม จังหวัดปทุมธานี และแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวรวมทั้งบริเวณพื้นที่ใกล้เคียง ณ วัดสุวรรณคีรีปฏิภม จังหวัดลพบุรี และศึกษาการติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอีด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสพบว่ายุงจากแหล่งนกอพยพนั้นมีจำนวน 7 สกุล ได้แก่ *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia* และ *Uranotaenia* ประกอบไปด้วยยุงจำนวน 18 ชนิด โดยยุงที่พบมากที่สุด 2 ชนิด คือ *Culex tritaeniorhynchus* และ *Culex gelidus* และสุ่มตัวอย่างยุง *Culex tritaeniorhynchus* และ *Culex gelidus* จำนวนชนิดละ 60 กลุ่มตัวอย่าง โดยแต่ละกลุ่มประกอบไปด้วยยุงจำนวน 50 ตัว มาทดสอบหาเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอีปรากฏว่าไม่พบการติดเชื้อในทุกตัวอย่าง สำหรับยุงจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวและบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงนั้นพบว่า ยุงที่สามารถพบได้จากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวนั้นมีทั้งหมดจำนวน 5 สกุล ได้แก่ *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Culex* และ *Uranotaenia* ประกอบไปด้วยยุงจำนวน 8 ชนิด สำหรับยุงที่สามารถพบได้ในบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวนั้นมีทั้งหมดจำนวน 8 สกุล ได้แก่ *Aedes*, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia* และ *Uranotaenia* ประกอบไปด้วยยุงจำนวน 16 ชนิด โดยยุงที่พบได้มากที่สุด 2 ชนิด คือ *Culex quinquefasciatus* และ *Culex tritaeniorhynchus* และเมื่อทำการสุ่มตัวอย่างยุงจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว จำนวน 61 กลุ่มตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น *Armigeres subalbatus* จำนวน 6 กลุ่มตัวอย่าง *Culex gelidus* จำนวน 1 กลุ่มตัวอย่าง *Culex quinquefasciatus* จำนวน 39 กลุ่มตัวอย่าง และ *Culex tritaeniorhynchus* จำนวน 15 กลุ่มตัวอย่าง และยุงจากบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว จำนวน 110 กลุ่มตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น *Aedes albopictus* จำนวน 6 กลุ่มตัวอย่าง *Anopheles stephensi* จำนวน 3 กลุ่มตัวอย่าง *Armigeres subalbatus* จำนวน 23 กลุ่มตัวอย่าง *Culex gelidus* จำนวน 2 กลุ่มตัวอย่าง *Culex quinquefasciatus* จำนวน 36 กลุ่มตัวอย่าง และ *Culex tritaeniorhynchus* จำนวน 40 กลุ่มตัวอย่าง โดยแต่ละกลุ่มประกอบไปด้วยยุงจำนวน 10 ตัว มาทดสอบหาเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอีปรากฏว่าไม่พบการติดเชื้อในทุกตัวอย่าง

คำหลัก : เชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอี ยุงพาหะนำโรค นกอพยพ ค้างคาว

Abstract

Project Code : MRG5180153

Project Title : The role and relationship of Japanese Encephalitis virus, mosquito vectors, immigration birds, and bats in nature

Investigator : Assistant Professor Dr.Sonthaya Tiawsirisup, Parasitology Unit,
Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

E-mail Address : sonthaya.t@chula.ac.th, thaya18@hotmail.com

Project Period : 15 May 2008 - 14 May 2010

Mosquito distribution and Japanese encephalitis virus (JEV) infection were studied in two areas which were the immigration bird nested area in Pathum Thani province and the bat cave area in Lopburi province, Thailand. Mosquitoes were collected by using CO₂-baited CDC-light traps, and dry ice was used as a source of CO₂ to attract mosquitoes. There were seven genera collected from the immigration bird nested area: *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettia*, *Culex*, *Mansonia* and *Uranotaenia*. *Culex tritaeniorhynchus* and *Culex gelidus* were most collected species in this area. Sixty pools of *Culex tritaeniorhynchus* and of *Culex gelidus*, each of which had fifty mosquitoes, were tested for JEV infection by using reverse transcription polymerase reaction (RT-PCR) and all of them were negative. There were five genera collected from the bat cave: *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Culex* and *Uranotaenia* and there were eight genera collected from area close to the bat cave: *Aedes*, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettia*, *Culex*, *Mansonia* and *Uranotaenia*. *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* were most collected species in these areas. Sixty one pools of mosquitoes collected from the bat cave: six pools of *Armigeres subalbatus*, one pool of *Culex gelidus*, thirty nine pools of *Culex quinquefasciatus* and fifteen pools of *Culex tritaeniorhynchus*, each of which had ten mosquitoes, were tested for JEV infection by using RT-PCR and all of them were negative. One hundred and ten pools of mosquitoes collected from the area close to the bat cave: six pools of *Aedes albopictus*, three pools of *Anopheles stephensi*, twenty three pools of *Armigeres subalbatus*, two pools of *Culex gelidus*, thirty six pools of *Culex quinquefasciatus* and forty pools of *Culex tritaeniorhynchus*, each of which had ten mosquitoes, were tested for JEV infection by using RT-PCR and all of them were negative.

Keywords : Japanese Encephalitis virus, mosquito, immigration bird, bat

สรุปย่อ (Executive Summary)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคติดเชื้อที่พบในคนและสัตว์นั้นสามารถเกิดจากเชื้อต่างๆ มากมายหลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย โปรโตซัว หนองพยาธิ และไวรัส โรคติดเชื้อบางโรคก็เป็นโรคอุบัติใหม่ (emerging infectious disease) ซึ่งคือโรคที่ไม่เคยมีการระบาดมาก่อนในบริเวณนั้น โรคติดเชื้อบางโรคก็เป็นโรคอุบัติซ้ำ (re-emerging infectious disease) ซึ่งคือโรคที่เคยมีการระบาดมาก่อนในอดีตแต่ได้หายไปจากบริเวณนั้นนานแล้วแต่ได้กลับมาระบาดใหม่ในปัจจุบันและในบางครั้งโรคมีความรุนแรงมากขึ้น การติดต่อของโรคต่างๆ เหล่านี้อาจเกิดจากการติดต่อโดยตรงระหว่างผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วย หรืออาจติดต่อโดยอาศัยแมลงพาหะนำโรค (arthropod borne diseases) แมลงพาหะนำโรคที่มีความสำคัญมาก คือ ยุง ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไป เชื้อที่จำเป็นต้องอาศัยยุงเป็นพาหะนำโรค ได้แก่ หนองพยาธิฟิลาเรีย และไวรัสต่างๆ

เชื้อไวรัสในสกุลฟลาวิไวรัส (flavivirus) เป็นไวรัสที่จำเป็นต้องอาศัยแมลงดูดเลือดเป็นพาหะในการนำเชื้อ โดยฟลาวิไวรัสที่มีความสำคัญในไทย ได้แก่ เชื้อไวรัสสมองอักเสบ (Japanese encephalitis virus) และเชื้อไวรัสไข้เลือดออก (Dengue virus 1, 2, 3 และ 4) นอกจากนี้แล้วยังมีไวรัสอีกชนิดหนึ่งซึ่งจัดว่าเป็นสาเหตุของโรคอุบัติใหม่ในหลายๆ พื้นที่ในโลก หรือในบางพื้นที่ก็จัดว่าเป็นโรคอุบัติซ้ำที่มีความรุนแรงมากขึ้นกว่าในอดีต คือ เชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ (West Nile virus) สำหรับประเทศไทยยังไม่มีรายงานถึงการระบาดของไวรัสชนิดนี้

เนื่องจากภาวะโรคร้อนที่เกิดขึ้นในปัจจุบันนี้ ก่อให้เกิดการกระจายตัวของแมลงพาหะนำโรคต่างๆ โดยเฉพาะยุง เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม บางพื้นที่มีฝนตกชุกตลอดทั้งปี เกิดแหล่งน้ำท่วมขัง กลายเป็นแหล่งเพาะพันธุ์อย่างดียิ่งสำหรับยุงชนิดต่างๆ เมื่อยุงเพิ่มมากขึ้น การกระจายตัวของเชื้อต่างๆ ก็เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้แล้วหลายๆ พื้นที่ในประเทศไทยยังเป็นแหล่งที่นกอพยพต่างๆ เช่น นกปากห่างจากแถบเอเชียใต้ ที่จะอพยพเข้ามาอาศัยเพื่อหลบภาวะอากาศหนาว จึงมีโอกาสนกอพยพเหล่านี้อาจนำเชื้อจากประเทศต่างๆ เหล่านั้นเข้ามาด้วย ซึ่งอาจก่อให้เกิดการระบาดของเชื้อต่างๆ ในประเทศไทยได้ ฟลาวิไวรัสที่สามารถเพิ่มจำนวนในนกหรือสัตว์ปีกอื่นๆ ได้แก่ เชื้อไวรัสสมองอักเสบ Japanese encephalitis และไวรัสเวสต์ไนล์ นกบางชนิดเอื้อให้เชื้อพัฒนาเพิ่มจำนวนและมีระดับของเชื้อในกระแสเลือดที่สูงและยาวนาน นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการตรวจพบระดับของภูมิคุ้มกันของค้างคาวต่อเชื้อไวรัสไข้เลือดออก ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่าค้างคาวสามารถติดเชื้อไข้เลือดออกได้ ถ้าค้างคาวสามารถติดเชื้อไข้เลือดออกได้ก็หมายความว่าค้างคาวอาจมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายของเชื้อในธรรมชาติได้

ยุงสามารถติดเชื้อผ่านทาง การดูดเลือดจากนกที่ติดเชื้อ เชื้อจะเข้าไป เพิ่มจำนวนในยุงที่เซลล์ของทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut epithelial cell) และต่อมน้ำลาย (salivary gland) คนและสัตว์จะติดเชื้อจากน้ำลายของยุงในขณะที่ยุงดูดเลือด อย่างไรก็ตามความสามารถและความจำเพาะในการดูดเลือดของยุงชนิดต่างๆ อาจแตกต่างกัน ยุงบางชนิดดูดเลือดสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น ยุงบางชนิดดูด

เลือดสัตว์ปีกเท่านั้น ในขณะที่ยุงบางชนิดดูดเลือดจากสัตว์ได้หลายชนิดรวมทั้งคนด้วย ซึ่งยุงในกลุ่มหลังนี้จะเป็นยุงที่มีความสำคัญในการเป็นพาหะนำโรคระหว่างคนและสัตว์ชนิดต่างๆ

โรคที่มียุงเป็นพาหะนำโรคนี้เป็นโรคที่สามารถติดต่อได้ง่ายและเกิดการระบาดได้อย่างรวดเร็ว ประกอบกับประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่ร้อนชื้นซึ่งเหมาะแก่การแพร่พันธุ์ของยุง ดังนั้นเชื้อไวรัสที่มียุงเป็นพาหะจึงอาจสามารถแพร่กระจายได้โดยง่าย นอกจากนี้แล้วยุงแต่ละชนิดและจากแต่ละพื้นที่นั้นอาจมีความสามารถในการเป็นพาหะของเชื้อที่คล้ายหรือแตกต่างกัน ทางคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่ามีความจำเป็นต้องทำการศึกษาถึงชนิดของยุงและความชุกของการติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบ Japanese encephalitis ในยุงชนิดต่างๆ จากแหล่งที่มีนกอพยพและแหล่งที่มีค้างคาวอาศัยอยู่ในประเทศไทย เพื่อเป็นการเฝ้าระวังโรครวมทั้งหาทางป้องกันโรคต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดของยุงในแหล่งนกอพยพ (นกปากห่าง) และแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว
2. เพื่อศึกษาการติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus) ในยุงที่จับได้จากแหล่งนกอพยพ และจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว

ระเบียบวิธีวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัยเพื่อบรรลุวัตถุประสงค์ทั้ง 2 ข้อ มีดังต่อไปนี้

1. ตัวอย่างยุง

เก็บตัวอย่างยุงจาก 2 พื้นที่คือ บริเวณที่มีนกอพยพ (นกปากห่าง) ณ วัดไผ่ล้อม อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี และบริเวณแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว ณ วัดสุวรรณคีรีปฏิภม (เขาตะกร้าทอง) ตำบลนิคมสร้างตนเอง อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี โดยเก็บตัวอย่างยุงจากบริเวณบริเวณวัดไผ่ล้อมทุกๆ 2 เดือน ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2551 ถึงเดือนมกราคม 2552 และเก็บตัวอย่างยุงจากบริเวณวัดสุวรรณคีรีปฏิภม ทุกเดือน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2552 ถึงเดือนเมษายน 2553 เก็บตัวอย่างยุงโดยใช้กับดักยุงชนิด CDC light trap และน้ำแข็งแห้งเป็นแหล่งของคาร์บอนไดออกไซด์ในการล่อยุง นำตัวอย่างยุงที่ได้มาทำการแยกเพศและชนิดของยุง ตามวิธีของ Rattanarithikul and Panthusiri (1994) ตัวอย่างที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบต่อไป

2. การตรวจหาเชื้อไวรัสจากตัวอย่างยุง

นำตัวอย่างยุงที่ได้มาสกัดแยกสารพันธุกรรม (อาร์เอ็นเอ) ด้วย TRI Reagent LS (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, USA) และนำมาทดสอบหาเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus) โดยใช้เทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ (reverse transcription polymerase reaction, RT-PCR)

ผลงานวิจัยที่ได้รับ

1. ยุงในแหล่งนกอพยพ

1.1 ชนิดและความหลากหลายของยุงในแหล่งนกอพยพ

การศึกษาจากแหล่งนกอพยพ ณ วัดไผ่ล้อม อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี พบว่ามียุงทั้งหมดจำนวน 7 สกุล ได้แก่ *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia* และ *Uranotaenia* โดยชนิดของยุงที่พบมากที่สุด 2 ชนิด คือ *Culex tritaeniorhynchus* และ *Culex gelidus* ซึ่งพบว่า *Culex tritaeniorhynchus* นั้นพบได้มากที่สุดเกือบทุกเดือนที่ทำการศึกษายกเว้นในเดือนพฤศจิกายน 2551 ที่พบว่า *Culex gelidus* นั้นมีจำนวนมากที่สุด

1.2 การศึกษาการติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus) ในยุงจากแหล่งนกอพยพ

ทำการสุ่มตัวอย่างยุง *Culex tritaeniorhynchus* และ *Culex gelidus* จำนวนชนิดละ 500 ตัว ในแต่ละเดือนมาส่งทดสอบพันธุกรรม โดยใช้ยุงจำนวน 50 ตัวต่อกลุ่มตัวอย่าง (pool) ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 120 กลุ่มตัวอย่าง และทดสอบหาเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งไม่พบยุงติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอีในทุกตัวอย่าง

2. ยุงในแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวและบริเวณพื้นที่ใกล้เคียง

2.1 ชนิดและความหลากหลายของยุงในแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวและบริเวณพื้นที่ใกล้เคียง

การศึกษาจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวและบริเวณพื้นที่ใกล้เคียง ณ วัดสุวรรณคีรีปฏิภม (เขาตะกร้าทอง) ตำบลนิคมสร้างตนเอง อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี พบว่าชนิดและปริมาณของยุงภายในแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวและบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงนั้นแตกต่างกันพอสมควร โดยพบว่าสกุลของยุงที่สามารถพบได้ภายในแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวนั้นมีทั้งหมด 5 สกุล ได้แก่ *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Culex* และ *Uranotaenia* ประกอบไปด้วยยุงทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ *Aedes albopictus*, *Anopheles barbirostris*, *Anopheles stephensi*, *Armigeres subalbatus*, *Culex gelidus*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex tritaeniorhynchus* และ *Uranotaenia lateralis*

สำหรับสกุลของยุงที่สามารถพบได้ในบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวนั้นมีทั้งหมด 8 สกุล ได้แก่ *Aedes*, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia*

และ *Uranotaenia* ประกอบไปด้วยยุงทั้งหมด 16 ชนิด ได้แก่ *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes lineatopennis*, *Aedes vigilax*, *Aedes Niveus* subgroup, *Aedeomyia catasticta*, *Anopheles barbirostris*, *Anopheles stephensi*, *Armigeres subalbatus*, *Coquillettidia crassipes*, *Culex gelidus*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex tritaeniorhynchus*, *Mansonia annulata*, *Mansonia uniformis* และ *Uranotaenia lateralis*

การศึกษานี้พบว่าปริมาณของยุงที่พบได้มากที่สุดจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวคือ เดือน พฤษภาคม และปริมาณของยุงที่พบได้มากที่สุด ในบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว คือ เดือนกรกฎาคม ชนิดของยุงที่พบได้มากในแต่ละเดือนนั้นจะแตกต่างกันโดยพบว่า ชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวในเดือนพฤษภาคม มิถุนายน และกรกฎาคม คือ *Culex quinquefasciatus* ชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดในเดือนสิงหาคม คือ *Armigeres subalbatus* ชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดในเดือนกันยายนและตุลาคม คือ *Culex tritaeniorhynchus* และชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดในเดือนพฤศจิกายน ธันวาคม มกราคม กุมภาพันธ์ มีนาคม และเมษายน คือ *Culex quinquefasciatus*

สำหรับชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดจากบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว ในเดือนพฤษภาคม มิถุนายน และกรกฎาคม คือ *Culex quinquefasciatus* ชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดในเดือนสิงหาคม คือ *Armigeres subalbatus* ชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดในเดือนกันยายน ตุลาคม พฤศจิกายน และธันวาคม คือ *Culex tritaeniorhynchus* ชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดในเดือนมกราคม กุมภาพันธ์ และ มีนาคม คือ *Culex quinquefasciatus* และชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดในเดือนเมษายน คือ *Aedes albopictus*

2.2 การศึกษาการติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus) ในยุงจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว และบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว

ทำการสุ่มตัวอย่างยุงแต่ละชนิดที่มีจำนวนมากพอมาทำการสกัดสารพันธุกรรม ซึ่งใช้ยุงจำนวน 10 ตัวต่อกลุ่มตัวอย่าง (pool) โดยทดสอบยุงจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว จำนวน 61 กลุ่มตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น *Armigeres subalbatus* จำนวน 6 กลุ่มตัวอย่าง *Culex gelidus* จำนวน 1 กลุ่มตัวอย่าง *Culex quinquefasciatus* จำนวน 39 กลุ่มตัวอย่าง และ *Culex tritaeniorhynchus* จำนวน 15 กลุ่มตัวอย่าง และทดสอบยุงจาก บริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว จำนวน 110 กลุ่มตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น *Aedes albopictus* จำนวน 6 กลุ่มตัวอย่าง *Anopheles stephensi* จำนวน 3 กลุ่มตัวอย่าง *Armigeres subalbatus* จำนวน 23 กลุ่มตัวอย่าง *Culex gelidus* จำนวน 2 กลุ่มตัวอย่าง *Culex quinquefasciatus* จำนวน 36 กลุ่มตัวอย่าง และ *Culex tritaeniorhynchus* จำนวน 40 กลุ่มตัวอย่าง และทดสอบหาเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งไม่พบยุงติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอีในทุกตัวอย่าง

เนื้อหางานวิจัย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษานิเวศของยุงในแหล่งนกอพยพ (นกปากห่าง) และแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว
2. เพื่อศึกษาการติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus) ในยุงที่จับได้จากแหล่งนกอพยพ และจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การศึกษานิเวศและความหลากหลายของยุง

1.1 การศึกษานิเวศของยุงในแหล่งนกอพยพ

เก็บตัวอย่างยุงจากบริเวณวัดไผ่ล้อม อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี ในระหว่างเดือนมีนาคม 2551 ถึงเดือนมกราคม 2552 เนื่องจากในบริเวณนี้มีสภาพภูมิประเทศที่เหมาะสมแก่การเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงหลาย ๆ ชนิด ได้แก่ แม่น้ำ แหล่งน้ำขัง และนาข้าว รวมทั้งบริเวณนี้เป็นสถานที่ทำรังของนกปากห่างซึ่งเป็นนกที่อพยพเข้ามาอาศัยอยู่ในบริเวณนี้

จับยุงโดยใช้กับดักยุงชนิด CDC light trap จำนวน 8 เครื่อง และใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำแข็งแห้งสำหรับดึงดูดให้ยุงเข้ามาในกับดักยุงชนิดนี้ โดยนำกับดักไปวางไว้ในบริเวณพื้นที่ของวัดไผ่ล้อมในช่วงเย็น เวลาประมาณ 16.00 น. และทำการเก็บกับดักในช่วงเช้า เวลาประมาณ 7.00 น. ในวันถัดไป นำตัวอย่างยุงที่ได้กลับมายังห้องปฏิบัติการ หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อให้ยุงตาย หลังจากนั้นนำตัวอย่างยุงมาทำการแยกเพศและชนิดของยุง ตามวิธีของ Rattanarithkul and Panthusiri (1994) รวมทั้งนับจำนวนของยุง เก็บตัวอย่างยุงที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบ

1.2 การศึกษานิเวศของยุงในแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว

เก็บตัวอย่างยุงจากบริเวณที่มีค้างคาวอาศัยอยู่ในระหว่างเดือนพฤษภาคม 2552 ถึง เดือนเมษายน 2553 โดยพื้นที่ที่ทำการศึกษาคือ บริเวณวัดสุวรรณคีรีปฏิภม (เขาตะกร้าทอง) ตำบลนิคมสร้างตนเอง อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี เนื่องจากบริเวณนี้เป็นถ้ำที่มีค้างคาวอาศัยอยู่และสามารถเข้าไปภายในถ้ำได้

จับยุงโดยใช้กับดักยุงชนิด CDC light trap และอาศัยคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำแข็งแห้งในการล่อยุง ในการศึกษาดังนี้ได้ ทำการวางกับดักยุงภายในแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว จำนวน 4 เครื่อง

และบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว จำนวน 4 เครื่อง ในระหว่างเวลา 17.00 น. จนถึงเวลา 9.00 น. ของวันถัดไป นำตัวอย่างยุงที่ได้กลับมายังห้องปฏิบัติการ หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อให้ยุงตาย หลังจากนั้นนำตัวอย่างยุงมา ทำการแยกเพศและชนิดของยุง ตามวิธีของ Rattanarithikul and Panthusiri (1994) รวมทั้งนับจำนวนของยุง เก็บตัวอย่างยุงที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบ

2. การศึกษาการติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus) ในยุงที่จับได้ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

2.1 เชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสที่นำมาใช้เป็นไวรัสควบคุม (positive control) คือเชื้อ Japanese encephalitis virus สายพันธุ์ปักกิ่ง (Beijing) ที่มีปริมาณไวรัส $10^{4.87}$ TCID₅₀ / ml

2.2 การสกัดสารพันธุกรรม (RNA) จากตัวอย่างไวรัส

สกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างไวรัส ด้วย TRI Reagent LS (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, USA) โดยใช้ไวรัสจำนวน 250 ไมโครลิตร ผสมกับ TRI Reagent LS จำนวน 750 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม chloroform จำนวน 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสด้านบนจำนวน 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่สะอาด จากนั้นเติม isopropanol alcohol จำนวน 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำการล้าง สารพันธุกรรม (RNA pellet) ที่ได้ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้วทำให้ส่วนตะกอนแห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น (ultrapure water, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) จำนวน 20 ไมโครลิตร เพื่อเป็นการละลายสารพันธุกรรม เก็บสารพันธุกรรมที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบต่อไป

2.3 การสกัดสารพันธุกรรม (อาร์เอ็นเอ) จากตัวอย่างยุง

สกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างยุง ด้วย TRI Reagent LS (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, USA) โดยบดตัวอย่างยุงกับสารละลาย Minimum Essential Medium Alpha (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) จำนวน 500 ไมโครลิตร ในหลอดพลาสติกขนาดเล็ก

(microcentrifuge tube) โดยใช้แท่งบดพลาสติก (plastic pestle) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 g เป็นเวลา 10 นาที

ดูดส่วนใสที่ได้จำนวน 250 ไมโครลิตร ผสมกับ TRI Reagent LS จำนวน 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม chloroform จำนวน 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสด้านบนจำนวน 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่สะอาด จากนั้นเติม isopropanol alcohol จำนวน 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำการล้าง สารพันธุกรรม (RNA pellet) ที่ได้ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้วทำให้ส่วนตะกอนแห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น (ultrapure water, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) จำนวน 20 ไมโครลิตร เพื่อเป็นการละลายสารพันธุกรรม เก็บสารพันธุกรรมที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบต่อไป

2.4 ขั้นตอนของเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

นำสารพันธุกรรม (อาร์เอ็นเอ) ของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วย AccessQuick™ RT-PCR system (Promega, USA) โดยใช้ primer ที่มาจาก C/Pr M gene ที่มีลำดับเบส ดังนี้ Forward 5' GAC TAA AAA ACC AGG AGG GC และ Reverse 5' CTC CCC ATG TGT TTG GAC CG โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้จะมีความขนาด 681 base pairs โดยเตรียม master mix จำนวน 23.5 ไมโครลิตร โดยใช้ AccessQuick (2x master mix) จำนวน 12.5 ไมโครลิตร forward primer จำนวน 1 ไมโครลิตร reverse primer จำนวน 1 ไมโครลิตร AMV reverse transcriptase จำนวน 0.5 ไมโครลิตร (2.5 U) และน้ำกลั่น (ultrapure water, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) จำนวน 8.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำ master mix ที่เตรียมไว้มาเติมสารพันธุกรรมที่ต้องการทดสอบจำนวน 1.5 ไมโครลิตร และนำไปเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมเป้าหมายด้วยเครื่อง thermocycler (Perkin Elmer Cetus 9600, CA, USA) โดยผ่านกระบวนการที่มีอุณหภูมิตามลำดับดังนี้

Reverse transcription	48°C	45	นาที	} 35 รอบ
Initial PCR activation	94°C	3	นาที	
Denaturation	94°C	30	วินาที	
Annealing	58°C	30	วินาที	
Extension	72°C	30	วินาที	
Final extension	72°C	7	นาที	

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้มาทำการตรวจสอบในกระบวนการต่อไป

2.5 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product)

เตรียม agarose gel (UltraPure™, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) ที่มีความเข้มข้น 1.2% ใน TAE buffer (pH 7.2) โดยเติม ethidium bromide จำนวน 10 ไมโครลิตร ในเจลจำนวน 100 มิลลิลิตร จากนั้นเทสารละลายลงในแม่พิมพ์ซึ่งจะทำให้เจลที่ได้ มีหลุมสำหรับหยดตัวอย่าง แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วนำมาใส่ในเครื่อง electrophoresis พร้อมกับเติม TAE buffer ให้ท่วมเจลเพื่อให้ทำหน้าที่เป็น running buffer

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ผสมกับ loading buffer (Sucrose 65 % (w/v), Tris-HCl 10mM (pH 7.5), EDTA 10mM, Bromophenol Blue 0.3 % (w/v), BlueJuice™, Invitrogen, USA) จำนวน 6 ไมโครลิตร แล้วมาหยดใส่ในหลุมบนแผ่น agarose gel ที่เตรียมไว้จำนวนหลุมละ 10 ไมโครลิตร โดยมี 1 หลุม ที่หยด DNA ladder จำนวน 5 ไมโครลิตร (Trackit™ 100 bp DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดเพื่อใช้สำหรับเปรียบเทียบขนาดของสายดีเอ็นเอ ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่ขนาด 90 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที เมื่อกระบวนการเสร็จสิ้น นำ แผ่นเจลไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) โดยเปรียบเทียบตำแหน่งแถบสีที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างกับแถบสีที่เกิดขึ้นจาก DNA ladder ถ้าพบแถบจากตัวอย่างเกิดขึ้นที่ตำแหน่งความยาวประมาณ 681 base pairs รวมทั้งเปรียบเทียบกับแถบที่เกิดขึ้นใน positive control จะถือว่าตัวอย่างนั้นมีเชื้อ Japanese Encephalitis virus

ผลการวิจัย

1. ยุงในแหล่งนกอพยพ

1.1 ชนิดและความหลากหลายของยุงในแหล่งนกอพยพ

การศึกษาจากแหล่งนกอพยพ ณ วัดไผ่ล้อม อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี พบว่ามียุงทั้งหมดจำนวน 7 สกุล ได้แก่ *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettia*, *Culex*, *Mansonia* และ *Uranotaenia* ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 โดยชนิดของยุงที่พบมากที่สุด 2 ชนิด คือ *Culex tritaeniorhynchus* และ *Culex gelidus* ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งพบว่า *Culex tritaeniorhynchus* นั้นพบได้มากที่สุดเกือบทุกเดือนที่ทำการศึกษายกเว้นในเดือนพฤศจิกายน 2551 ที่พบว่า *Culex gelidus* นั้นมีจำนวนมากที่สุด

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนของยุงแต่ละสกุลที่จับได้จากแหล่งนกอพยพ ณ วัดไผ่ล้อม อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี ในช่วงเดือนมีนาคม 2551 ถึงเดือนมกราคม 2552

สกุลของยุง	เดือน					
	มี.ค. 51	พ.ค. 51	ก.ค. 51	ก.ย. 51	พ.ย. 51	ม.ค. 52
<i>Aedes</i>	1	319	27	11	0	2
<i>Anopheles</i>	71	127	34	65	137	181
<i>Armigeres</i>	6	3	3	5	73	94
<i>Coquillettidia</i>	12	214	25	45	21	54
<i>Culex</i>	7,042	8,168	4,350	4,122	22,182	16,625
<i>Mansonia</i>	196	877	276	116	354	87
<i>Uranotaenia</i>	8	29	25	3	0	0
รวม	7,336	9,737	4,740	4,367	22,767	17,043

ตารางที่ 2 แสดงร้อยละของยุงในแต่ละสกุลเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนของยุงที่จับได้ทั้งหมด ที่จับได้จากแหล่งนกอพยพ ณ วัดไผ่ล้อม อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี ในช่วงเดือนมีนาคม 2551 ถึงเดือนมกราคม 2552

สกุลของยุง	เดือน					
	มี.ค. 51	พ.ค. 51	ก.ค. 51	ก.ย. 51	พ.ย. 51	ม.ค. 52
<i>Aedes</i>	0.01	3.28	0.57	0.25	0	0.01
<i>Anopheles</i>	0.97	1.30	0.72	1.49	0.60	1.06
<i>Armigeres</i>	0.08	0.03	0.06	0.11	0.32	0.55
<i>Coquillettidia</i>	0.16	2.20	0.53	1.03	0.09	0.32
<i>Culex</i>	95.99	83.89	91.77	94.39	97.43	97.55
<i>Mansonia</i>	2.67	9.01	5.82	2.66	1.55	0.51
<i>Uranotaenia</i>	0.11	0.30	0.53	0.07	0	0

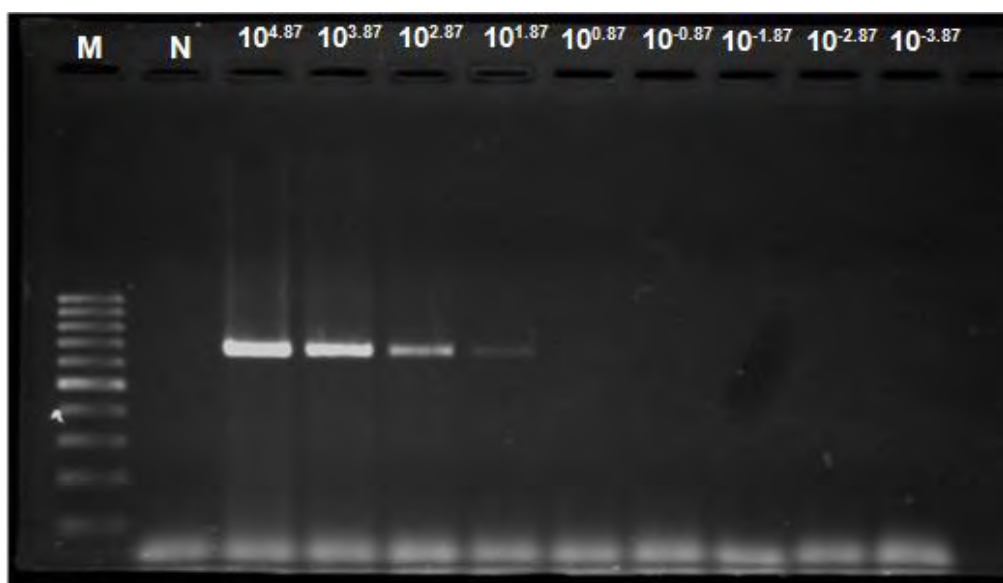
ตารางที่ 3 แสดงจำนวนและร้อยละของยุงแต่ละชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนของยุงที่จับได้ทั้งหมดจากแหล่งนกอพยพ ณ วัดไผ่ล้อม อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี ในช่วงเดือนมีนาคม 2551 ถึงเดือนมกราคม 2552

ชนิดของยุง	เดือน					
	มี.ค. 51	พ.ค. 51	ก.ค. 51	ก.ย. 51	พ.ย. 51	ม.ค. 52
<i>Aedes albopictus</i>	0	4 (0.04%)	16 (0.34%)	4 (0.09%)	0	2 (0.01%)
<i>Aedes lineatopennis</i>	1 (0.01%)	315 (3.24%)	11 (0.23%)	7 (0.16%)	0	0
<i>Anopheles barbirostris</i>	39 (0.53%)	8 (0.08%)	24 (0.51%)	31 (0.71%)	130 (0.57%)	29 (0.17%)
<i>Anopheles kochi</i>	30 (0.41%)	70 (0.72%)	5 (0.11%)	34 (0.78%)	7 (0.03%)	0
<i>Anopheles stephensi</i>	2 (0.03%)	49 (0.5%)	5 (0.11%)	0	0	0
<i>Anopheles tessellatus</i>	0	0	0	0	0	152 (0.89%)
<i>Armigeres subalbatus</i>	6 (0.08%)	3 (0.03%)	3 (0.06%)	5 (0.11%)	73 (0.32%)	94 (0.55%)
<i>Coquillettidia crassipes</i>	12 (0.16%)	214 (2.2%)	25 (0.53%)	45 (1.03%)	21 (0.09%)	54 (0.32%)
<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	7 (0.1%)	17 (0.17%)	0	0	0	0
<i>Culex gelidus</i>	597 (8.14%)	1,740 (17.87%)	1,576 (33.25%)	1,019 (23.33%)	14,913 (65.50%)	1,086 (6.37%)
<i>Culex fuscocephala</i>	39 (0.53%)	201 (2.06%)	9 (0.19%)	2 (0.05%)	35 (0.15%)	14 (0.08%)
<i>Culex quinquefasciatus</i>	1 (0.01%)	1 (0.01%)	0	1 (0.02%)	2 (0.01%)	3 (0.02%)
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	6,398 (87.21%)	6,191 (63.58%)	2,762 (58.27%)	3,097 (70.92%)	7,181 (31.54%)	15,522 (91.08%)
<i>Culex vishnui</i>	0	18 (0.18%)	3 (0.06%)	3 (0.07%)	51 (0.22%)	0
<i>Mansonia annulata</i>	1 (0.01%)	0	0	0	1 (0.004%)	0
<i>Mansonia annulifera</i>	1 (0.01%)	3 (0.03%)	0	6 (0.14%)	5 (0.02%)	0
<i>Mansonia uniformis</i>	194 (2.64%)	874 (8.98%)	276 (5.82%)	110 (2.52%)	348 (1.53%)	87 (0.51%)
<i>Uranotaenia lateralis</i>	8 (0.11%)	29 (0.3%)	25 (0.53%)	3 (0.07%)	0	0

1.2 การศึกษาการติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus) ในยุงที่จับได้จากแหล่งนกอพยพด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

ความไวของ primer C / pre M ในการตรวจหาไวรัสสมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus) เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค RT-PCR

ทำการประเมินความไวของ primer C / pre M ต่อเชื้อไวรัส เมื่อทำการตรวจหาไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้สารพันธุกรรมที่สกัดจากไวรัสที่มีปริมาณตั้งแต่ $10^{4.87}$ TCID₅₀ / ml จนถึง $10^{-3.87}$ TCID₅₀ / ml พบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้ต่ำสุดที่ $10^{1.87}$ TCID₅₀ / ml (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงความไวของ primer C / pre M ในการตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้สารพันธุกรรมที่สกัดจากไวรัสที่มีปริมาณตั้งแต่ $10^{4.87}$ TCID₅₀ / ml จนถึง $10^{-3.87}$ TCID₅₀ / ml เปรียบเทียบกับ negative control (N) และ 100 bp DNA ladder marker (M)

การศึกษาการติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus) ในยุง

ทำการสุ่มตัวอย่างยุง *Culex tritaeniorhynchus* และ *Culex gelidus* จำนวน 500 ตัว ต่อชนิดของยุงในแต่ละเดือน นำมาทำการสกัดสารพันธุกรรม โดยใช้ยุงจำนวน 50 ตัวต่อกลุ่มตัวอย่าง (pool) ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 120 กลุ่มตัวอย่าง และทดสอบหาเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งไม่พบยุงติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอีในทุกตัวอย่าง

2. ยุงในแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวและบริเวณใกล้เคียง

2.1 ชนิดและความหลากหลายของยุงในแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวและบริเวณพื้นที่ใกล้เคียง

การศึกษาจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวและบริเวณพื้นที่ใกล้เคียง ณ วัดสุวรรณคีรีปฏิภม (เขาตะกร้าทอง) ตำบลนิคมสร้างตนเอง อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี พบว่าชนิดและปริมาณของยุงภายในแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวและบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงนั้นแตกต่างกันพอสมควร โดยพบว่าสกุลของยุงที่สามารถพบได้ภายในแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวนั้นมีทั้งหมด 5 สกุล ได้แก่ *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Culex* และ *Uranotaenia* ประกอบไปด้วยยุงทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ *Aedes albopictus*, *Anopheles barbirostris*, *Anopheles stephensi*, *Armigeres subalbatus*, *Culex gelidus*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex tritaeniorhynchus* และ *Uranotaenia lateralis* ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5

สำหรับสกุลของยุงที่สามารถพบได้ในบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวนั้นมีทั้งหมด 8 สกุล ได้แก่ *Aedes*, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettia*, *Culex*, *Mansonia* และ *Uranotaenia* ประกอบไปด้วยยุงทั้งหมด 16 ชนิด ได้แก่ *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes lineatopennis*, *Aedes vigilax*, *Aedes Niveus* subgroup, *Aedeomyia catasticta*, *Anopheles barbirostris*, *Anopheles stephensi*, *Armigeres subalbatus*, *Coquillettia crassipes*, *Culex gelidus*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex tritaeniorhynchus*, *Mansonia annulata*, *Mansonia uniformis* และ *Uranotaenia lateralis* ดังแสดงในตารางที่ 6 และ 7

การศึกษานี้พบว่าปริมาณของยุงที่พบได้มากที่สุดจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวคือ เดือน พฤษภาคม และปริมาณของยุงที่พบได้มากที่สุดภายในบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวคือ เดือนกรกฎาคม ชนิดของยุงที่พบได้มากในแต่ละเดือนนั้นจะแตกต่างกันโดยพบว่า ชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวในเดือนพฤษภาคม มิถุนายน และกรกฎาคม คือ *Culex quinquefasciatus* ชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดในเดือนสิงหาคม คือ *Armigeres subalbatus* ชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดในเดือนกันยายนและตุลาคม คือ *Culex tritaeniorhynchus* และชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดในเดือนพฤศจิกายน ธันวาคม มกราคม กุมภาพันธ์ มีนาคม และเมษายน คือ *Culex quinquefasciatus*

สำหรับชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดจากบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว
ในเดือนพฤษภาคม มิถุนายน และกรกฎาคม คือ *Culex quinquefasciatus* ชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุด
ในเดือนสิงหาคม คือ *Armigeres subalbatus* ชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดในเดือนกันยายน ตุลาคม
พฤศจิกายน และธันวาคม คือ *Culex tritaeniorhynchus* ชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดในเดือนมกราคม
กุมภาพันธ์ และมีนาคม คือ *Culex quinquefasciatus* และชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดในเดือนเมษายน
คือ *Aedes albopictus*

ตารางที่ 4 แสดงชนิดและจำนวนของยุงจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว ณ วัดสุวรรณคีรีปฏิภม (เขาตะกร้าทอง)
ตำบลนิคมสร้างตนเอง อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี ในระหว่างเดือนพฤษภาคม 2552 ถึงเดือนเมษายน 2553

ชนิดของยุง	เดือน											
	พ.ค. 52	มิ.ย. 52	ก.ค. 52	ส.ค. 52	ก.ย. 52	ต.ค. 52	พ.ย. 52	ธ.ค. 52	ม.ค. 53	ก.พ. 53	มี.ค. 53	เม.ย. 53
<i>Aedes albopictus</i>	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Anopheles barbirostris</i>	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0
<i>Anopheles stephensi</i>	0	0	0	1	3	4	1	1	1	0	0	0
<i>Armigeres subalbatus</i>	15	8	9	46	9	14	0	1	3	1	6	0
<i>Culex gelidus</i>	0	1	0	0	15	8	0	4	1	0	0	1
<i>Culex quinquefasciatus</i>	250	77	38	39	30	24	5	29	62	13	24	4
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	10	1	0	22	39	77	3	27	0	0	0	0
<i>Uranotaenia lateralis</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
รวม	277	87	47	109	96	127	11	65	67	14	30	6

ตารางที่ 5 แสดงชนิดและร้อยละของยุงจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว ณ วัดสุวรรณคีรีปฏิภม (เขาตะกร้าทอง)
ตำบลนิคมสร้างตนเอง อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี ในระหว่างเดือนพฤษภาคม 2552 ถึงเดือนเมษายน 2553

ชนิดของยุง	เดือน											
	พ.ค. 52	มิ.ย. 52	ก.ค. 52	ส.ค. 52	ก.ย. 52	ต.ค. 52	พ.ย. 52	ธ.ค. 52	ม.ค. 53	ก.พ. 53	มี.ค. 53	เม.ย. 53
<i>Aedes albopictus</i>	0.7	0	0	0.9	0	0	0	0	0	0	0	16.7
<i>Anopheles barbirostris</i>	0	0	0	0	0	0	9.1	4.6	0	0	0	0
<i>Anopheles stephensi</i>	0	0	0	0.9	3.1	3.1	9.1	1.5	1.5	0	0	0
<i>Armigeres subalbatus</i>	5.4	9.2	19.1	42.2	9.4	11.0	0	1.5	4.5	7.1	20.0	0
<i>Culex gelidus</i>	0	1.1	0	0	15.6	6.3	0	6.2	1.5	0	0	16.7
<i>Culex quinquefasciatus</i>	90.3	88.5	80.9	35.8	31.3	18.9	45.5	44.6	92.5	92.9	80.0	66.6
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	3.6	1.1	0	20.2	40.6	60.6	27.3	41.5	0	0	0	0
<i>Uranotaenia lateralis</i>	0	0	0	0	0	0	9.1	0	0	0	0	0

ตารางที่ 6 แสดงชนิดและจำนวนของยุงจากบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว ณ วัดสุวรรณคีรีปฏิภม (เขาตะกร้าทอง)
ตำบลนิคมสร้างตนเอง อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี ในระหว่างเดือนพฤษภาคม 2552 ถึงเดือนเมษายน 2553

ชนิดของยุง	เดือน											
	พ.ค. 52	มิ.ย. 52	ก.ค. 52	ส.ค. 52	ก.ย. 52	ต.ค. 52	พ.ย. 52	ธ.ค. 52	ม.ค. 53	ก.พ. 53	มี.ค. 53	เม.ย. 53
<i>Aedes aegypti</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Aedes albopictus</i>	3	12	17	37	6	15	1	0	7	2	2	4
<i>Aedes lineatopennis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aedes vigilax</i>	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aedes Niveus</i> subgroup	0	0	0	2	0	7	0	0	0	0	0	0
<i>Aedeomyia catasticta</i>	0	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Anopheles barbirostris</i>	0	0	0	0	0	4	7	0	1	0	0	0
<i>Anopheles stephensi</i>	0	0	4	9	12	13	14	2	6	0	0	0
<i>Armigeres subalbatus</i>	20	64	29	76	45	23	7	3	6	1	1	0
<i>Coquillettidia crassipes</i>	0	3	2	0	1	3	1	0	3	0	0	0
<i>Culex gelidus</i>	1	3	0	1	21	0	1	0	0	0	0	0
<i>Culex quinquefasciatus</i>	154	154	298	47	10	4	1	2	13	4	8	3
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	4	12	8	71	264	246	73	41	12	0	0	0
<i>Mansonia annulata</i>	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
<i>Mansonia uniformis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0
<i>Uranotaenia lateralis</i>	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
รวม	185	255	361	249	359	321	105	52	51	7	13	7

ตารางที่ 7 แสดงชนิดและร้อยละของยุงจากบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว ณ วัดสุวรรณคีรีปฏิภม (เขาคะกร้าทอง)
ตำบลนิคมสร้างตนเอง อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี ในระหว่างเดือนพฤษภาคม 2552 ถึงเดือนเมษายน 2553

ชนิดของยุง	เดือน											
	พ.ค. 52	มิ.ย. 52	ก.ค. 52	ส.ค. 52	ก.ย. 52	ต.ค. 52	พ.ย. 52	ธ.ค. 52	ม.ค. 53	ก.พ. 53	มี.ค. 53	เม.ย. 53
<i>Aedes aegypti</i>	1.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15.4	0
<i>Aedes albopictus</i>	1.6	4.7	4.7	14.9	1.7	4.7	1.0	0	13.7	28.6	15.4	57.1
<i>Aedes lineatopennis</i>	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aedes vigilax</i>	0	0	0	2.4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aedes Niveus</i> subgroup	0	0	0	0.8	0	2.2	0	0	0	0	0	0
<i>Aedeomyia catacticta</i>	0	2.7	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Anopheles barbirostris</i>	0	0	0	0	0	1.2	6.7	0	2.0	0	0	0
<i>Anopheles stephensi</i>	0	0	1.1	3.6	3.3	4.0	13.3	3.8	11.8	0	0	0
<i>Armigeres subalbatus</i>	10.8	25.1	8.0	30.5	12.5	7.2	6.7	5.8	11.8	14.3	7.7	0
<i>Coquilletidia crassipes</i>	0	1.2	0.6	0	0.3	0.9	1.0	0	5.9	0	0	0
<i>Culex gelidus</i>	0.5	1.2	0	0.4	5.8	0	1.0	0	0	0	0	0
<i>Culex quinquefasciatus</i>	83.2	60.4	82.5	18.9	2.8	1.2	1.0	3.8	25.5	57.1	61.5	42.9
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	2.2	4.7	2.2	28.5	73.5	76.6	69.5	78.8	23.5	0	0	0
<i>Mansonia annulata</i>	0	0	0	0	0	0	0	7.7	0	0	0	0
<i>Mansonia uniformis</i>	0	0	0.3	0	0	0	0	0	5.9	0	0	0
<i>Uranotaenia lateralis</i>	0	0	0	0	0	1.9	0	0	0	0	0	0

2.2 การศึกษาการติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus) ในยุง จากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว และบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวด้วย เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

การศึกษานี้ได้ทำการสุ่มตัวอย่างยุงแต่ละชนิดที่มีจำนวนมากพอมาทำการสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ TRI Reagent LS (Molecular Research Center Inc, Cincinnati, Ohio, USA) ซึ่งใช้ยุงจำนวน 10 ตัวต่อกลุ่มตัวอย่าง (pool) โดยทดสอบยุงจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว จำนวน 61 กลุ่มตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น *Armigeres subalbatus* จำนวน 6 กลุ่มตัวอย่าง *Culex gelidus* จำนวน 1 กลุ่มตัวอย่าง *Culex quinquefasciatus* จำนวน 39 กลุ่มตัวอย่าง และ *Culex tritaeniorhynchus* จำนวน 15 กลุ่มตัวอย่าง และทดสอบยุงจากบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว จำนวน 110 กลุ่มตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น *Aedes albopictus* จำนวน 6 กลุ่มตัวอย่าง *Anopheles stephensi* จำนวน 3 กลุ่มตัวอย่าง *Armigeres subalbatus* จำนวน 23 กลุ่มตัวอย่าง *Culex gelidus* จำนวน 2 กลุ่มตัวอย่าง *Culex quinquefasciatus* จำนวน 36 กลุ่มตัวอย่าง และ *Culex tritaeniorhynchus* จำนวน 40 กลุ่มตัวอย่าง ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 8 และ 9 และทดสอบหาเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งไม่พบยุงติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอีในทุกตัวอย่าง

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนกลุ่มตัวอย่าง (pool) ของยุงแต่ละชนิดจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวที่นำทดสอบหาเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (reverse transcription polymerase chain reaction)

ชนิดของยุง	เดือน											
	พ.ค. 52	มิ.ย. 52	ก.ค. 52	ส.ค. 52	ก.ย. 52	ต.ค. 52	พ.ย. 52	ธ.ค. 52	ม.ค. 53	ก.พ. 53	มี.ค. 53	เม.ย. 53
<i>Aedes albopictus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anopheles barbirostris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anopheles stephensi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Armigeres subalbatus</i>	1	-	-	4	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Culex gelidus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Culex quinquefasciatus</i>	10	7	3	3	3	2	-	2	6	1	2	-
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	1	-	-	2	3	7	-	2	-	-	-	-
<i>Uranotaenia lateralis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
รวม	12	7	3	9	7	10	0	4	6	1	2	0

ตารางที่ 9 แสดงจำนวนกลุ่มตัวอย่าง (pool) ของยุงแต่ละชนิดจากบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวที่นำทดสอบหาเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis virus) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (reverse transcription polymerase chain reaction)

ชนิดของยุง	เดือน											
	พ.ค. 52	มิ.ย. 52	ก.ค. 52	ส.ค. 52	ก.ย. 52	ต.ค. 52	พ.ย. 52	ธ.ค. 52	ม.ค. 53	ก.พ. 53	มี.ค. 53	เม.ย. 53
<i>Aedes aegypti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aedes albopictus</i>	-	1	1	3	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Aedes lineatopennis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aedes vigilax</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aedes Niveus</i> subgroup	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aedeomyia catasticta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anopheles barbirostris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anopheles stephensi</i>	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-
<i>Armigeres subalbatus</i>	2	6	2	7	4	2	-	-	-	-	-	-
<i>Coquilletidia crassipes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Culex gelidus</i>	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Culex quinquefasciatus</i>	10	10	10	4	1	-	-	-	1	-	-	-
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	-	1	-	7	10	10	7	4	1	-	-	-
<i>Mansonia annulata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mansonia uniformis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Uranotaenia lateralis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
รวม	12	18	13	21	18	14	8	4	2	0	0	0

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาถึงความหลากหลายของชนิดและจำนวนของยุงจาก 2 แหล่ง คือ แหล่งนกอพยพ ณ วัดไผ่ล้อม อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี และแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวและบริเวณพื้นที่ใกล้เคียง ณ วัดสุวรรณคีรีปฏิภม (เขาตะกร้าทอง) ตำบลนิคมสร้างตนเอง อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับชนิดและจำนวนของยุงในแต่ละพื้นที่ซึ่งอาจมีความเสี่ยงต่อการเกิดการระบาดของโรคที่มียุงเป็นพาหะในการนำเชื้อ พื้นที่ที่ทำการศึกษา นี้เป็นเพียงตัวอย่างของบริเวณที่อาจมีความเสี่ยง แต่อย่างไรก็ตามยังมีอีกหลายพื้นที่ในประเทศไทยที่จำเป็นต้องให้ความสำคัญและเฝ้าระวังโรคอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้สามารถป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ยุงจากแหล่งนกอพยพในการศึกษานี้มีทั้งหมดจำนวน 7 สกุล ได้แก่ *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia* และ *Uranotaenia* ประกอบไปด้วยยุงจำนวนทั้งหมด 18 ชนิด โดยชนิดของยุงที่พบมากที่สุด 2 ชนิด และอาจมีบทบาทสำคัญในการนำเชื้อในบริเวณนี้ คือ ยุงรำคาญชนิด *Culex tritaeniorhynchus* และ *Culex gelidus* และได้สุ่มตัวอย่างยุง *Culex tritaeniorhynchus* และ *Culex gelidus* จำนวนชนิดละ 60 กลุ่มตัวอย่าง มาทดสอบหาเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอีด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) แต่อย่างไรก็ตามไม่พบยุงติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอีในทุกตัวอย่าง

สำหรับยุงจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวและบริเวณพื้นที่ใกล้เคียง ณ วัดสุวรรณคีรีปฏิภม (เขาตะกร้าทอง) ตำบลนิคมสร้างตนเอง อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี พบว่าสกุลของยุงที่สามารถพบได้ภายในแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวนั้นมีทั้งหมด 5 สกุล ได้แก่ *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Culex* และ *Uranotaenia* ประกอบไปด้วยยุงทั้งหมด 8 ชนิด สำหรับสกุลของยุงที่สามารถพบได้ใน บริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวนั้นมีทั้งหมด 8 สกุล ได้แก่ *Aedes*, *Aedeomyia*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia* และ *Uranotaenia* ประกอบไปด้วยยุงทั้งหมด 16 ชนิด การศึกษานี้พบว่าชนิดของยุงที่พบได้มากที่สุดจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว และบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาวและอาจมีบทบาทสำคัญในการนำเชื้อในบริเวณนี้ คือ ยุงรำคาญชนิด *Culex quinquefasciatus* และ *Culex tritaeniorhynchus* และเมื่อทำการสุ่มตัวอย่างยุงจากแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว จำนวน 61 กลุ่มตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น *Armigeres subalbatus* จำนวน 6 กลุ่มตัวอย่าง *Culex gelidus* จำนวน 1 กลุ่มตัวอย่าง *Culex quinquefasciatus* จำนวน 39 กลุ่มตัวอย่าง และ *Culex tritaeniorhynchus* จำนวน 15 กลุ่มตัวอย่าง และยุงจากบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อยู่อาศัยของค้างคาว จำนวน 110 กลุ่มตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น *Aedes albopictus* จำนวน 6 กลุ่มตัวอย่าง *Anopheles stephensi* จำนวน 3 กลุ่มตัวอย่าง *Armigeres subalbatus* จำนวน 23 กลุ่มตัวอย่าง *Culex gelidus* จำนวน 2 กลุ่มตัวอย่าง *Culex quinquefasciatus* จำนวน 36 กลุ่มตัวอย่าง และ *Culex tritaeniorhynchus* จำนวน 40 กลุ่มตัวอย่าง มาทดสอบหาเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอีด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส แต่อย่างไรก็ตามไม่พบยุงติดเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอีในทุกตัวอย่าง

นอกจากความหลากหลายของยุงในพื้นที่ต่าง ๆ ที่แตกต่างกันแล้วนั้น การศึกษานี้ยังพบว่า สภาพแวดล้อมนั้นมีบทบาทที่สำคัญต่อปริมาณของยุงด้วยเป็นอย่างมาก โดยบริเวณที่มีแหล่งน้ำขังซึ่งเอื้อให้เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงเป็นอย่างมากดังเช่นกับแหล่งนกอพยพในการศึกษานี้ซึ่งเป็นพื้นที่ซึ่งล้อมรอบไปด้วยแม่น้ำ แหล่งน้ำขัง และนาข้าว ทำให้ยุงที่พบในบริเวณนี้มีปริมาณสูงมาก ในขณะที่บริเวณแหล่งที่อยู่อาศัยของค่างควาและบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงที่ทำการศึกษานั้นเป็นถ้ำบนภูเขาทำให้บริเวณนี้มีจำนวนของยุงไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามความหลากหลายของ ชนิดของยุงนั้นยังคงมีมากพอสมควร จากการศึกษานี้พบว่าในพื้นที่ที่ทำการศึกษาทั้ง 2 บริเวณนั้นมียุงชนิดเดียวกันที่พบได้มากคือ ยุงรำคาญชนิด *Culex tritaeniorhynchus* จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ายุงชนิดนี้เป็นยุงที่มีศักยภาพในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสสมองอักเสบเจอีได้เป็นอย่างดี การวางแผนป้องกันการระบาดของโรคจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จำเป็นต้องให้ความสำคัญกับยุงชนิดนี้

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

สำหรับงานวิจัยในอนาคตนั้นยังคงมีความจำเป็นที่ต้องทำการศึกษาถึงชนิดและปริมาณของยุงในพื้นที่ต่าง ๆ แม้ว่าการศึกษาในลักษณะนี้จะได้เพียงข้อมูลพื้นฐาน แต่อย่างไรก็ตามก็จัดได้ว่าเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่จำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้น สำหรับการศึกษาถึงการติดเชื้อต่าง ๆ ในยุงนั้นก็มีความสำคัญเช่นเดียวกันเนื่องจากจะเป็นการเฝ้าระวังโรคได้เป็นอย่างดี แม้ว่าในการศึกษา นั้นอาจตรวจไม่พบเชื้อใดๆ แต่ก็ไม่สามารถมองข้ามการศึกษาในลักษณะนี้ได้ เนื่องจากจะ ทำให้เป็นการขาดข้อมูลที่เป็นปัจจุบัน และเป็นการยากในการวางแผนป้องกันการระบาดของโรคต่างๆ ทั้งโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำต่างๆ

นอกเหนือจากการศึกษาในลักษณะของการสำรวจตัวอย่างจากพื้นที่แล้ว การศึกษาถึงศักยภาพของยุงชนิดต่างๆ ในการนำเชื้อในท้องปฏิบัติการนั้นก็มีความสำคัญมาก เพื่อ ทำให้ทราบบทบาทของยุงชนิดต่างๆ ในการนำโรคและความสำคัญของยุงแต่ละชนิดในการนำโรคในธรรมชาติ

เอกสารอ้างอิง

Rattanarithikul R, Panthusiri P. 1994. Illustrated keys to the medically important mosquitos of Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 25 Suppl 1; 1-66

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Tiawsirisup, S. and Nuchprayoon, S. 2010. Mosquito distribution and Japanese encephalitis virus infection in the immigration bird (Asian open-billed stork) nested area in Pathum Thani province, central Thailand. *Parasitology Research* 106: 907-910.
(Impact factor = 1.43)

Mosquito distribution and Japanese encephalitis virus infection in the immigration bird (Asian open-billed stork) nested area in Pathum Thani province, central Thailand

Sonthaya Tiawsirisup · Surang Nuchprayoon

Received: 24 December 2009 / Accepted: 13 January 2010 / Published online: 13 February 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Japanese encephalitis virus infection is a mosquito-borne emerging or re-emerging infectious disease in several countries. The ecology of this virus in nature includes amplifying avian or mammal hosts and mosquito vectors. Infected immigration birds from epidemic areas may play important roles in the outbreak of the disease. The prevalence is high during the raining season in Thailand and human cases have been reported from several provinces including Bangkok suburbs. This study was conducted to investigate the mosquito distribution and Japanese encephalitis virus infection in the immigration bird (Asian open-billed stork) nested area, Pathum Thani province, central Thailand. Mosquitoes were collected by using CO₂-baited Centers for disease control and prevention (CDC) light traps, and dry ice was used as a source of CO₂ to attract mosquitoes from March 2008 to January 2009. Eight traps were operated from 4 p.m. until 7 a.m. on each study day. There were seven genera collected: *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia*, and *Uranotaenia*. *Culex tritaeniorhynchus* was the most collected species in each month, except November, in which *Culex gelidus* was the most collected species. Sixty pools of *C. gelidus* and of *C. tritaeniorhynchus*, each of which had 50 mosquitoes,

were tested for Japanese encephalitis virus infection by using reverse transcription polymerase chain reactions; however, none of them was infected with the virus.

Introduction

Japanese encephalitis virus (JEV) infection is an emerging or re-emerging infectious disease in several countries in Asia including Thailand (Gunakasem et al. 1981; Thisyakorn and Nimmannitya 1985). This virus was first isolated in 1935 in Japan and it has spread throughout Asia and Australia (van den Hurk et al. 2001). This virus belongs to the Japanese encephalitis (JE) serogroup of the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. Others in this serogroup are West Nile virus, St. Louis encephalitis virus, Rocio virus, and Kunjin virus which have recently been reclassified as a subtype of West Nile virus. There are five virus genotypes of JEV which have been identified according to the nucleotide sequencing of capsid/premembrane protein (C/PrM) and envelope gene. The genotype that has spread in Thailand since 1980s is genotype III; however, it has recently changed to genotype I since 2003 (Nitapattana et al. 2008).

Ecology of JEV involves avian and mammal amplifying hosts and mosquito vectors. Swine, ardeid birds, and *Culex* mosquitoes play major roles in the transmission cycle of this virus in nature (Simpson et al. 1976; van den Hurk et al. 2009). Vertebrate host was infected with JEV when bitten by an infected mosquito. This virus causes encephalitis and death in vertebrate animals and humans (Gould et al. 1964). It is considered the most important mosquito-borne viral encephalitis in humans, particularly in Asia, where it is responsible for the death of around 20,000 people annually (Jackson et al. 2007).

S. Tiawsirisup (✉)
Veterinary Parasitology Unit, Department of Veterinary Pathology,
Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University,
Henri-Dunant Rd., Pathumwan,
Bangkok 10330, Thailand
e-mail: sonthaya.t@chula.ac.th

S. Nuchprayoon
Lymphatic Filariasis Research Unit, Department of Parasitology,
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand

Immigration birds from an endemic area play an important role for many infectious disease distributions and possibly for JEV outbreak. Several places in Thailand are the famous places for immigration birds. In Thailand, Phailom temple is one of the famous places for Asian or white open-billed storks (*Ciconia ciconia*) where birds emigrate from other countries, and it is also among the places within Thailand during the immigration season. This study area is located on the side of Chao Phraya River in Pathum Thani province, the neighboring province of Bangkok. It has been concerned that the outbreak of any vector-borne diseases in this area might reach Bangkok in a short period of time.

This study was performed to investigate the distribution of mosquito species in the immigration bird nested area and to study JEV infection in some selected mosquitoes species. The information from this study would be useful for the future research on epidemiological study, prevention, and control of JEV in Thailand.

Materials and methods

Mosquito collection

Mosquitoes were collected by using CO₂-baited CDC light traps, and dry ice was used as a source of CO₂ to attract mosquitoes from March 2008 to January 2009. Eight traps were operated from 4 p.m. until 7 a.m. on each study day at the immigration bird (Asian open-billed stork) nested area (14°14'35" N, 100°31'35" E) in Pathum Thani province, central Thailand. Collected mosquitoes were identified according to Rattanarithikul and Panthusiri (1994) and kept at -80°C until tested.

Viral ribonucleic acid extraction

Five hundred *C. gelidus* and 500 *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes were randomly selected from each month. Viral ribonucleic acid (RNA) was extracted by using Tri Reagent LS® (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) according to its manufacturer's recommendation with slight modification. Briefly, a pool of 50 mosquitoes was homogenized in 500 µl of Minimum Essential Medium Alpha (Invitrogen, Carlsbad, CA) by using plastic pestle. The mosquito homogenate was then centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. Two hundred and fifty microliters of the homogenate were mixed with 750 µl of Tri Reagent LS®. Two hundred microliters of chloroform were also added and RNA was precipitated in 500 µl of isopropanol. RNA pellet was then washed with 75% ethanol and dissolved in 20 µl of ultrapure water (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA was kept at -80°C until tested.

Reverse transcription polymerase chain reaction

Sixty RNA samples extracted from *C. gelidus* and 60 RNA samples extracted from *C. tritaeniorhynchus* mosquitoes were tested for JEV by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The primers for C/PrM gene of JEV were forward 5' GAC TAA AAA ACC AGG AGG GC and reverse 5' CTC CCC ATG TGT TTG GAC CG. RT-PCR cycling conditions were 45 min at 48°C for the reverse transcription step and 3 min at 94°C for the initial PCR activation step followed by 35 cycles of 30 s at 94°C (denaturation), 30 s at 58°C (annealing), 30 s at 72°C (extension), and 7 min at 72°C for the final extension. RT-PCRs were performed in 25-µl reaction. One and a half microliters of RNA were mixed with 12.5 µl of master mix (AccessQuick®, Promega, Madison, WI), 0.2 µM of forward and reverse primer, 2.5 U of Avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (AccessQuick®, Promega, Madison, WI), and 8.5 µl of ultrapure water (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA was amplified by using thermocycler (Perkin Elmer Cetus 9600, Perkin Elmer, Waltham, MA). The PCR product was analyzed in 1.2% agarose gel (UltraPure™, Invitrogen, Carlsbad, CA) with expected 681-base pair band.

Results

Mosquito distribution and weather information

There were 7,336 mosquitoes collected in this study in March 2008 by using eight mosquito traps, and the number of mosquitoes changed to 9,737, 4,740, 4,367, 22,767, and 17,043 in May 2008, July 2008, September 2008, November 2008, and January 2009, respectively.

A total of seven genera of mosquitoes were collected: *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia*, and *Uranotaenia*. *Culex* was the most collected genus in each month (Table 1). The most collected species of the mosquitoes for each genus were *Aedes lineatopennis*, *Anopheles barbir-stris*, *Armigeres subalbatus*, *Coquillettidia crassipes*, *C. tritaeniorhynchus*, *Mansonia uniformis* and *Uranotaenia lateralis*. *C. tritaeniorhynchus* was the most collected species in each month, except November, in which *C. gelidus* was the most collected species. Information regarding temperature, humidity, and rain in Pathum Thani province during the study period were shown in Fig. 1. The range of the average temperature, humidity, and rain were 25.1–29.7°C, 62.8–78.7%, and 0–7.6 mm, respectively.

Japanese encephalitis virus infection in mosquitoes

Sixty samples of RNA extracted from *C. gelidus* and 60 samples of RNA extracted from *C. tritaeniorhynchus*

Table 1 Percentage of collected mosquito species distribution in the immigration bird (Asian open-billed stork) nested area in Pathum Thani province, central Thailand during March 2008–January 2009

Mosquito species	Collected month					
	Mar 2008	May 2008	Jul 2008	Sep 2008	Nov 2008	Jan 2009
<i>Aedes albopictus</i>	0	0.04	0.34	0.09	0	0.01
<i>Aedes lineatopennis</i>	0.01	3.24	0.23	0.16	0	0
<i>Anopheles barbirostris</i>	0.53	0.08	0.51	0.71	0.57	0.17
<i>Anopheles kochi</i>	0.41	0.72	0.11	0.78	0.03	0
<i>Anopheles stephensi</i>	0.03	0.5	0.11	0	0	0
<i>Anopheles tessellatus</i>	0	0	0	0	0	0.89
<i>Armigeres subalbatus</i>	0.08	0.03	0.06	0.11	0.32	0.55
<i>Coquillettidia crassipes</i>	0.16	2.2	0.53	1.03	0.09	0.32
<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	0.1	0.17	0	0	0	0
<i>Culex gelidus</i>	8.14	17.87	33.25	23.33	65.50	6.37
<i>Culex fuscocephala</i>	0.53	2.06	0.19	0.05	0.15	0.08
<i>Culex quinquefasciatus</i>	0.01	0.01	0	0.02	0.01	0.02
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	87.21	63.58	58.27	70.92	31.54	91.08
<i>Culex vishnui</i>	0	0.18	0.06	0.07	0.22	0
<i>Mansonia annulata</i>	0.01	0	0	0	0.004	0
<i>Mansonia annulifera</i>	0.01	0.03	0	0.14	0.02	0
<i>Mansonia uniformis</i>	2.64	8.98	5.82	2.52	1.53	0.51
<i>Uranotaenia lateralis</i>	0.11	0.3	0.53	0.07	0	0

mosquitoes were tested for JEV by using reverse transcription polymerase chain reaction, and all of them were negative for JEV.

Discussion

This study reported the collected mosquitoes from the immigrated Asian open-billed stork nested area in Pathum Thani province, central Thailand. This area is adjacent to

Chao Phraya River and surrounded by rice fields. Natural and man-made water reservoirs covered with water plants were also located in this area. These are some reasons why various species of mosquitoes were collected from this area. *C. gelidus* and *C. tritaeniorhynchus* might play important roles as vectors for any pathogen that happens in this area because they were the two most collected species of mosquitoes in this study area. The study by Tiawsirisup et al. (2008) also reported that these mosquitoes were the two most collected species during August and December in 2006. The previous study, however, did not find any *Aedes* and *Coquillettidia* in this area. In the current study, mosquito traps were operated from 4 p.m. until 7 a.m. on each study day. Some *Aedes albopictus* and *A. lineatopennis* were collected during this period of time, even though *Aedes* mosquitoes were active during the daytime. *A. lineatopennis* might be an important mosquito in this area during May, since a high number of them were collected during this time; however, no data indicate the vector competency of this mosquito for arbovirus in Thailand. In Australia, on the other hand, Ross River virus has been isolated from *A. lineatopennis* collected from northwest Queensland (van den Hurk et al. 2002).

The lowest and highest numbers of mosquitoes collected in this study were in July and November, respectively. Generally, mosquito distribution in most areas in Thailand is high during monsoon (May–October), moderate during transition (March–April and November–December), and low during dry (January–February) season. This study,

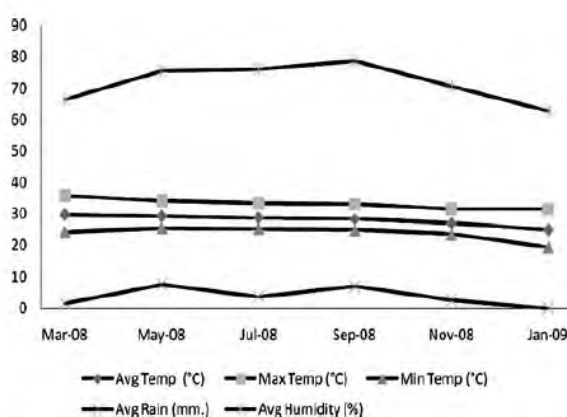


Fig. 1 Temperature, rain, and humidity in Pathum Thani province during the study period

however, showed that the number of collected mosquitoes gradually decreased from January, May, July, and September. Temperature, humidity, and rainfall might have affected the number of mosquitoes which varies each year.

Japanese encephalitis virus infection in humans in Thailand has been reported every year; however, the incidence has decreased since the immunization program in human was developed. The report from the Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand showed that the incidence of JEV infection in human were about 0.1 case per 100,000 people in 2008–2009. These human cases have been reported from the central, northern, northeastern, and southern Thailand.

Swine production is a very important agricultural industry in every part of Thailand. Even though the biosecurity of the farms has increased, it does not prevent pigs from arthropod-borne diseases including JEV infection. The intensive JEV circulation in swine farming in Thailand may be indicated by antibody seroconversion against JEV in pigs (Gingrich et al. 1987). Waste water reservoirs in the farm are famous breeding places for *C. gelidus* and *C. tritaeniorhynchus*, the major competent vectors for JEV (Gould et al. 1962; Gingrich et al. 1987; Pant et al. 1994). Recently, *C. quinquefasciatus* became another species of *Culex* mosquito that was a potential vector for JEV in Thailand (Nitattapattana et al. 2005).

This study, however, could not detect any Japanese encephalitis virus (JEV) in *C. gelidus* and *C. tritaeniorhynchus* by using the sensitive and specific reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCR). Beijing strain of JEV was used as a positive control in this study, and the RT-PCR in this study which detects the C/PrM gene of JEV can detect the virus that has the lowest virus titer at $10^{1.87}$ TCID₅₀/ml. Higher sensitive RT-PCR or other techniques such as immunohistochemistry staining of infected cells might be a useful techniques for the future.

Even though no data indicated the relationship of Asian open-billed stork in the ecology of JEV in nature, the antibody against West Nile virus, another *Flavivirus*, has been shown in this wild bird species in nature in Poland (Hubalek et al. 2008). More studies need to be carried out to conclude that Asian open-billed stork may be not an important reservoir for JEV in nature in Thailand.

Acknowledgments This study was financially supported by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission of Higher Education (MRG5180153). The authors would like to thank the Virology Unit, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science for Japanese encephalitis virus and the laboratory assistant. The authors would also like to thank Thai Meteorological Department for the weather information.

References

- Gingrich JB, Nisalak A, Latendresse JR, Pomsdhit J, Paisansilp S, Hoke CH, Chantalakana C, Satayaphantha C, Uechiewcharnkit K (1987) A longitudinal study of Japanese encephalitis in suburban Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 18:558–566
- Gould DJ, Barnett HC, Suyemoto W (1962) Transmission of Japanese encephalitis virus by *Culex gelidus* Theobald. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 56:429–435
- Gould DJ, Byrne RJ, Hayes DE (1964) Experimental infection of horses with Japanese encephalitis virus by mosquito bits. *Am J Trop Med Hyg* 13:742–774
- Gunakasem P, Chantrasri C, Simasathien P, Chaianun S, Jatanasen S, Pariyanonth A (1981) Surveillance of Japanese encephalitis cases in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 12:333–337
- Hubalek Z, Wegner E, Halouzka J, Tryjanowski P, Jerzak L, Sikutova S, Rudolf I, Kruszewicz AG, Jaworski Z, Wlodarczyk R (2008) Serologic survey of potential vertebrate hosts for West Nile virus in Poland. *Viral Immunol* 21:247–253
- Jackson Y, Chappuis F, Loutan L (2007) Japanese encephalitis. *Rev Med Suisse* 3:1233–1236
- Nitattapattana N, Apiwatnasom C, Barbazan P, Leemingsawat S, Yoksan S, Gonzalez JP (2005) First isolation of Japanese encephalitis from *Culex quinquefasciatus* in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36:875–878
- Nitattapattana N, Dubot-Peres A, Gouilh MA, Souris M, Barbazan P, Yoksan S, de Lamballerie X, Gonzalez JP (2008) Change in Japanese encephalitis virus distribution, Thailand. *Emerg Infect Dis* 14:1762–1765
- Pant U, Ilkal MA, Soman RS, Shetty PS, Kanojia PC, Kaul HN (1994) First isolation of Japanese encephalitis virus from the mosquito, *Culex tritaeniorhynchus* Giles, 1901 (Diptera: Culicidae) in Gorakhpur district, Uttar Pradesh. *Indian J Med Res* 99:149–151
- Rattanakulikul R, Panthasiri P (1994) Illustrated keys to the medically important mosquitoes of Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 25(Suppl 1):1–66
- Simpson DI, Smith CE, Marshall TF, Platt GS, Way HJ, Bowen ET, Bright WF, Day J, McMahon DA, Hill MN, Bendell PJ, Heathcote OH (1976) Arbovirus infections in Sarawak: the role of the domestic pig. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 70:66–72
- Thisyakorn U, Nimmanitya S (1985) Japanese encephalitis in Thai children, Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 16:93–97
- Tiawsirisup S, Sripatranusorn S, Oraveerakul K, Nuchprayoon S (2008) Distribution of mosquito (Diptera: Culicidae) species and *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infections during the bird immigration season in Pathumthani province, central Thailand. *Parasitol Res* 102:731–735
- van den Hurk AF, Nisbet DJ, Johansen CA, Foley PN, Ritchie SA, Mackenzie JS (2001) Japanese encephalitis on Badu Island, Australia: the first isolation of Japanese encephalitis virus from *Culex gelidus* in the Australasian region and the role of mosquito host-feeding patterns in virus transmission cycles. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95:595–600
- van den Hurk AF, Nisbet DJ, Foley PN, Ritchie SA, Mackenzie JS, Beebe NW (2002) Isolation of arboviruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected from the Gulf Plains region of northwest Queensland, Australia. *J Med Entomol* 39:786–792
- van den Hurk AF, Ritchie SA, Mackenzie JS (2009) Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus. *Annu Rev Entomol* 54:17–35