



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสำรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในยุงในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี
และจังหวัดนครปฐม แถบภาคกลางของประเทศไทย

โดย เกรียงไกร วิฑูรย์เสถียร และคณะ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสำรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในยุง ในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม แถบภาคกลางของประเทศไทย

- | | |
|-------------------------------|--|
| 1. นายเกรียงไกร วิฑูรย์เสถียร | หัวหน้าโครงการฯ
สังกัดคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 2. นายคงศักดิ์ เทียงธรรม | ผู้ร่วมวิจัย
สังกัดคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 3. นางนวลอนงค์ สีนวัด | ผู้ร่วมวิจัย
สังกัดคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 4. นายรุ่งโรจน์ แจ่มอัน | ผู้ร่วมวิจัย
สังกัดคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 5. นายทวีศักดิ์ ส่งเสริม | ที่ปรึกษาโครงการ
สังกัดคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

การสำรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในยุงในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม แถบภาคกลาง ของประเทศไทย

เกรียงไกร วิฑูรย์เสถียร นวลอนงค์ สันวัต รุ่งโรจน์ แจ่มอัน คงศักดิ์ เทียงธรรม และทวีศักดิ์ ส่งเสริม

¹ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

²ภาควิชาเวชศาสตร์และคลินิกสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

³ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ มีสารพันธุกรรมชนิด อาร์เอ็นเอ จัดอยู่ในตระกูล *Flaviviridae* และเป็นสาเหตุของโรคเวสต์ไนล์ซึ่งก่อให้เกิดภาวะสมองอักเสบทั้งในมนุษย์และสัตว์ วงจรการเกิดโรคเวสต์ไนล์มีความสัมพันธ์ระหว่างยุง นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยยุงจัดเป็นสัตว์พาหะที่สำคัญ ความผิดปกติที่พบในมนุษย์ ส่วนมากจะก่อให้เกิดความผิดปกติในระบบประสาท เช่น สมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ หนาวสั่น อัมพาต และเสียชีวิต เป็นต้น ปัจจุบันพบรายงานการเกิดโรคเวสต์ไนล์ทั่วโลก โดยเฉพาะในพื้นที่เกี่ยวข้องกับเส้นทางการบินอพยพของนก เช่น อเมริกา ยุโรป แอฟริกา และเอเชีย เป็นต้น แม้ว่าจะยังไม่พบการรายงานการเกิดโรคเวสต์ไนล์อย่างเป็นทางการในประเทศไทย แต่การสำรวจการเกิดโรคเวสต์ไนล์จัดเป็นมาตรการเบื้องต้นที่สำคัญในการเฝ้าระวังการเกิดโรคในพื้นที่เสี่ยงของการเกิดวงจรการเกิดโรค การศึกษาครั้งนี้ทำการเก็บตัวอย่างยุง เพื่อสำรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ ในแถบภาคกลางของประเทศ ภายในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม ในช่วงระหว่างเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2551 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2553 การดักจับยุงอาศัยเครื่องดักยุงชนิด light trap พบว่าชนิดของยุงที่ดักจับได้ประกอบด้วย *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* และ *Mansonia* โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Culex* เช่น *Culex gelidus* และ *Culex quinquefasciatus* จัดเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ดักจับได้มากที่สุด นำตัวอย่างยุงที่ได้มาจัดเป็นกลุ่มตามชนิดยุง กลุ่มละ 50 ตัวอย่าง ซึ่งดักจับได้จำนวน 50 กลุ่มตัวอย่าง ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์โดยอาศัยชุดตรวจสอบยี่ห้อ Vectest[®] กรณีที่ตรวจพบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ด้วยชุดตรวจสอบข้างต้น จะทำการยืนยันผลซ้ำด้วยวิธี conventional RT-PCR แม้ว่าไม่พบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์จากการศึกษาในครั้งนี้ แต่การสำรวจอย่างต่อเนื่อง จัดเป็นสิ่งที่ควรกระทำในแง่ของการเฝ้าระวังการเกิดโรค ซึ่งมีได้จำกัดกลุ่มศึกษาเฉพาะในยุงแต่ควรศึกษาให้ครอบคลุมในสัตว์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

คำสำคัญ เชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ การสำรวจ Vectest[®] และ conventional RT-PCR

**Survey of West Nile virus in mosquito vectors in
Petchburi and Nakhon-pathom province, central Thailand**

Witoonsatian, K.^{1*}, Sinwat, N.¹, Jam-on, R.¹, Thiangtum, K.², Songserm, T.³

¹Department of Farm resources and production medicin , Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand

²Department of Companion Animals Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand

³Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand

Abstract

West Nile virus (WNV) is an RNA virus in *Flaviviridae* family. This agent has emerged worldwide as a significant cause of viral encephalitis. WNV is maintained in an enzootic cycle between mosquitoes, birds and mammals which mosquitoes are the WNV vector. Infection in human is associated mainly with nervous system abnormally concerned encephalitis such as cognitive dysfunction, febrile illness, flaccid paralysis, and death etc. Currently, the outbreaks of WNV have occurred globally especially in the areas that concerned with migratory bird flyways for example America, Europe, Africa, and Asia. In Thailand, however, the official WNV infection has not been previously reported. Therefore, the survey of WNV in Thailand is important and should be investigated especially in an enzootic cycle in area where is at high risk of WNV infection. Initially, the survey of WNV was done in central Thailand, Petchburi and Nakhon-pathom provinces during July 2008 to May 2010. Mosquitoes were collected by using light trap. There were four genera collected including *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Mansonia*. *Culex spp* was abundant and frequently collected. Fifty pools, fifty mosquitoes per each pool, mostly *Culex spp* such as *Culex gelidus* and *Culex quinquefasciatus* were trapped and each of which had fifty mosquitoes were tested for WNV by using the antigen test kit (Vectest[®]). The positive result was confirmed by conventional RT-PCR. There was no the positive result from this survey. However, further survey of WNV is still important not only in an enzootic host as mosquitoes but also others vertebrate animals.

Keywords: West Nile virus (WNV), survey, mosquitoes, Vectest[®], RT-PCR

*Corresponding author.

Tel. 034-351-901-3; Fax: 034-351-405

E-mail: fvetkkw@ku.ac.th or kenvet59@yahoo.com

Project Title : Survey of West Nile virus in mosquito vectors in Petchburi and

Nakhon-pathom province, central Thailand

**(การสำรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในยุงในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัด
นครปฐม แถบภาคกลางของประเทศไทย)**

Investigator :

- | | |
|-------------------------------|--|
| 1. นายเกรียงไกร วิฑูรย์เสถียร | หัวหน้าโครงการฯ
สังกัดคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 2. นายคงศักดิ์ เทียงธรรม | ผู้ร่วมวิจัย
สังกัดคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 3. นางนวลอนงค์ สีนัด | ผู้ร่วมวิจัย
สังกัดคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 4. นายรุ่งโรจน์ แจ่มอัน | ผู้ร่วมวิจัย
สังกัดคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 5. นายทวีศักดิ์ ส่งเสริม | ที่ปรึกษาโครงการ
สังกัดคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |

E-mail Address : Fvetkkw@ku.ac.th

Project Period : 2 ปี 6 เดือน ตั้งแต่วันที่ 15 พฤษภาคม พ.ศ. 2551 ถึง วันที่ 15 พฤศจิกายน พ.ศ. 2553
(ระยะเวลาโครงการ)

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ มีสารพันธุกรรมชนิด อาร์เอ็นเอ จัดอยู่ในตระกูล *Flaviviridae* และเป็นสาเหตุของโรคเวสต์ไนล์ซึ่งก่อให้เกิดภาวะสมองอักเสบทั้งในมนุษย์และสัตว์ วงจรการเกิดโรคเวสต์ไนล์มีความสัมพันธ์ระหว่างยุง นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยยุงจัดเป็นสัตว์พาหะที่สำคัญ ความผิดปกติที่พบในมนุษย์ ส่วนมากจะก่อให้เกิดความผิดปกติในระบบประสาท เช่น สมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ หนาวสั่น อัมพาต และเสียชีวิต เป็นต้น ปัจจุบันพบรายงานการเกิดโรคเวสต์ไนล์ทั่วโลก โดยเฉพาะในพื้นที่เกี่ยวข้องกับเส้นทางการบินอพยพของนก เช่น อเมริกา ยุโรป แอฟริกา และเอเชีย เป็นต้น แม้ว่าจะไม่พบการรายงานการเกิดโรคเวสต์ไนล์อย่างเป็นทางการในประเทศไทย แต่การสำรวจการเกิดโรคเวสต์ไนล์จัดเป็นมาตรการเบื้องต้นที่สำคัญในการเฝ้าระวังการเกิดโรคในพื้นที่เสี่ยงของการเกิดวงจรการเกิดโรค การศึกษาครั้งนี้ทำการเก็บตัวอย่างยุง เพื่อสำรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ ในแถบภาคกลางของประเทศไทย ภายในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม ในช่วงระหว่างเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2551 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2553 การดักจับยุง

อาศัยเครื่องดักยุงชนิด light trap พบว่าชนิดของยุงที่ดักจับได้ประกอบด้วย *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* และ *Mansonia* โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Culex* เช่น *Culex gelidus* และ *Culex quinquefasciatus* จัดเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ดักจับได้มากที่สุด นำตัวอย่างยุงที่ได้มาจัดเป็นกลุ่มตามชนิดยุง กลุ่มละ 50 ตัวอย่าง ซึ่งดักจับได้จำนวน 50 กลุ่มตัวอย่าง ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์โดยอาศัยชุดตรวจสอบยี่ห้อ Vectest® กรณีที่ตรวจพบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ด้วยชุดตรวจสอบข้างต้น จะทำการยืนยันผลซ้ำด้วยวิธี conventional RT-PCR แม้ว่าไม่พบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์จากการศึกษาในครั้งนี้ แต่การสำรวจอย่างต่อเนื่อง จัดเป็นสิ่งที่ควรกระทำในแง่ของการเฝ้าระวังการเกิดโรค ซึ่งมีได้จำกัด กลุ่มศึกษาเฉพาะในยุงแต่ควรศึกษาให้ครอบคลุมในสัตว์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

คำสำคัญ เชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ การสำรวจ VecTest® และ conventional RT-PCR

Abstract:

West Nile virus (WNV) is an RNA virus in *Flaviviridae* family. This agent has emerged worldwide as a significant cause of viral encephalitis. WNV is maintained in an enzootic cycle between mosquitoes, birds and mammals which mosquitoes are the WNV vector. Infection in human is associated mainly with nervous system abnormally concerned encephalitis such as cognitive dysfunction, febrile illness, flaccid paralysis, and death etc. Currently, the outbreaks of WNV have occurred globally especially in the areas that concerned with migratory bird flyways for example America, Europe, Africa, and Asia. In Thailand, however, the official WNV infection has not been previously reported. Therefore, the survey of WNV in Thailand is important and should be investigated especially in an enzootic cycle in area where is at high risk of WNV infection. Initially, the survey of WNV was done in central Thailand, Petchburi and Nakhon-pathom provinces during July 2008 to May 2010. Mosquitoes were collected by using light trap. There were four genera collected including *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Mansonia*. *Culex spp* was abundant and frequently collected. Fifty pools, fifty mosquitoes per each pool, mostly *Culex spp* such as *Culex gelidus* and *Culex quinquefasciatus* were trapped and each of which had fifty mosquitoes were tested for WNV by using the antigen test kit (Vectest®). The positive result was confirmed by conventional RT-PCR. There was no the positive result from this survey. However, further survey of WNV is still important not only in an enzootic host as mosquitoes but also others vertebrate animals.

Keywords: West Nile virus (WNV), survey, mosquitoes, VecTest®, RT-PCR

1. บทคัดย่อภาษาไทย และภาษาอังกฤษ

การสำรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในยุง ในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม แถบ ภาคกลางของประเทศไทย

เกรียงไกร วิฑูรย์เสถียร นวลอนงค์ สีนัด รุ่งโรจน์ แจ่มอิน คงศักดิ์ เทียงธรรม และทวีศักดิ์ ส่งเสริม

¹ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

²ภาควิชาเวชศาสตร์และคลินิกสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

³ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ มีสารพันธุกรรมชนิด อาร์เอ็นเอ จัดอยู่ในตระกูล *Flaviviridae* และเป็นสาเหตุของโรคเวสต์ไนล์ซึ่งก่อให้เกิดภาวะสมองอักเสบทั้งในมนุษย์และสัตว์ วงจรการเกิดโรคเวสต์ไนล์มีความสัมพันธ์ระหว่างยุง นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยยุงจัดเป็นสัตว์พาหะที่สำคัญ ความผิดปกติที่พบในมนุษย์ ส่วนมากจะก่อให้เกิดความผิดปกติในระบบประสาท เช่น สมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ หนาวสั่น อัมพาต และเสียชีวิต เป็นต้น ปัจจุบันพบรายงานการเกิดโรคเวสต์ไนล์ทั่วโลก โดยเฉพาะในพื้นที่เกี่ยวข้องกับเส้นทางการบินอพยพของนก เช่น อเมริกา ยุโรป แอฟริกา และเอเชีย เป็นต้น แม้ว่าจะยังไม่พบการรายงานการเกิดโรคเวสต์ไนล์อย่างเป็นทางการในประเทศไทย แต่การสำรวจการเกิดโรคเวสต์ไนล์จัดเป็นมาตรการเบื้องต้นที่สำคัญในการเฝ้าระวังการเกิดโรคในพื้นที่เสี่ยงของการเกิดวงจรการเกิดโรค การศึกษาครั้งนี้ทำการเก็บตัวอย่างยุง เพื่อสำรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ ในแถบภาคกลางของประเทศไทย ภายในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดนครปฐม ในช่วงระหว่างเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2551 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2553 การดักจับยุงอาศัยเครื่องดักยุงชนิด light trap พบว่าชนิดของยุงที่ดักจับได้ประกอบด้วย *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* และ *Mansonia* โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Culex* เช่น *Culex gelidus* และ *Culex quinquefasciatus* จัดเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ดักจับได้มากที่สุด นำตัวอย่างยุงที่ได้มาจัดเป็นกลุ่มตามชนิดยุง กลุ่มละ 50 ตัวอย่าง ซึ่งดักจับได้จำนวน 50 กลุ่มตัวอย่าง ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์โดยอาศัยชุดตรวจสอบยี่ห้อ Vectest[®] กรณีที่ตรวจพบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ด้วยชุดตรวจสอบข้างต้น จะทำการยืนยันผลซ้ำด้วยวิธี conventional RT-PCR แม้ว่าไม่พบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์จากการศึกษาในครั้งนี้ แต่การสำรวจอย่างต่อเนื่อง จัดเป็นสิ่งที่ควรกระทำในแง่ของการเฝ้าระวังการเกิดโรค ซึ่งมีได้จำกัดกลุ่มศึกษาเฉพาะในยุงแต่ควรศึกษาให้ครอบคลุมในสัตว์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับวงจรการเกิดโรค

คำสำคัญ เชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ การสำรวจ Vectest[®] และ conventional RT-PCR

**Survey of West Nile virus in mosquito vectors in
Petchburi and Nakhon-pathom province, central Thailand**

Witoonsatian, K.^{1*}, Sinwat, N.¹, Jam-on, R.¹, Thiangtum, K.², Songserm, T.³

¹Department of Farm resources and production medicin , Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand

²Department of Companion Animals Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand

³Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Thailand

Abstract

West Nile virus (WNV) is an RNA virus in *Flaviviridae* family. This agent has emerged worldwide as a significant cause of viral encephalitis. WNV is maintained in an enzootic cycle between mosquitoes, birds and mammals which mosquitoes are the WNV vector. Infection in human is associated mainly with nervous system abnormally concerned encephalitis such as cognitive dysfunction, febrile illness, flaccid paralysis, and death etc. Currently, the outbreaks of WNV have occurred globally especially in the areas that concerned with migratory bird flyways for example America, Europe, Africa, and Asia. In Thailand, however, the official WNV infection has not been previously reported. Therefore, the survey of WNV in Thailand is important and should be investigated especially in an enzootic cycle in area where is at high risk of WNV infection. Initially, the survey of WNV was done in central Thailand, Petchburi and Nakhon-pathom provinces during July 2008 to May 2010. Mosquitoes were collected by using light trap. There were four genera collected including *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Mansonia*. *Culex spp* was abundant and frequently collected. Fifty pools, fifty mosquitoes per each pool, mostly *Culex spp* such as *Culex gelidus* and *Culex quinquefasciatus* were trapped and each of which had fifty mosquitoes were tested for WNV by using the antigen test kit (Vectest[®]). The positive result was confirmed by conventional RT-PCR. There was no the positive result from this survey. However, further survey of WNV is still important not only in an enzootic host as mosquitoes but also others vertebrate animals.

Keywords: West Nile virus (WNV), survey, mosquitoes, Vectest[®], conventional RT-PCR

*Corresponding author.

Tel. 034-351-901-3; Fax: 034-351-405

E-mail: fvetkkw@ku.ac.th or kenvet59@yahoo.com

2. Executive summary

West Nile virus (WNV) อยู่ในตระกูล *Flaviviridae* เช่นเดียวกับเชื้อ St. Louis encephalitis virus (SLEV), Murray Valley encephalitis (MVE) virus, Kunjin virus และ Japanese Encephalitis virus (School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, 2004) พบว่า ยุงเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ และก่อให้เกิดโรคเวสต์ไนล์ ในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม หลายชนิดอาทิเช่น ม้า แมว และสุนัข เป็นต้น โดยยุงที่ได้รับเชื้อไวรัสจากการดูดเลือดคนที่ติดเชื้อ เวสต์ไนล์ เชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวนในตัวยุงประมาณ 1-4 วัน จากนั้นเชื้อจะเข้าสู่ต่อมน้ำลายของยุง ดังนั้นขณะที่ยุงกัดมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เชื้อไวรัสก็จะผ่านเข้าสู่มนุษย์และสัตว์เหล่านั้น และเพิ่มจำนวนภายในต่อมน้ำเหลือง ซึ่งนำไปสู่อาการป่วยตามมา

ปัจจุบันแม้ยังไม่มีรายงานการพบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ และการระบาดของโรคเวสต์ไนล์ในประเทศไทย แต่จากปัจจัยโน้มนำหลาย ๆ ประการอาทิเช่น การอพยพของนกธรรมชาติจากประเทศที่พบการระบาดของโรคเวสต์ไนล์ และภาวะโลกร้อน ซึ่งเอื้ออำนวยให้ยุงได้แพร่ขยายพันธุ์ได้มากขึ้น ทำให้เพิ่มโอกาสที่โรคเวสต์ไนล์จะกลายเป็นโรคอุบัติใหม่ในประเทศไทยและโดยที่ประเทศไทยยังคงมียุงค่อนข้างชุกชุม และด้วยการคมนาคมที่ค่อนข้างสะดวกในปัจจุบันอาจจะทำให้เชื้อโรคมีโอกาสแพร่กระจายได้มากและเร็วขึ้น ดังนั้นโอกาสที่จะมีการพบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในประเทศไทยอาจมีมากขึ้น มาตรการการสำรวจและเฝ้าติดตามการพบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในเบื้องต้นเพื่อให้ทราบถึงสถานการณ์การเกิดอุบัติการณ์และการป้องกันการเกิดโรคเวสต์ไนล์

3. วัตถุประสงค์

เพื่อสำรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในยุง ซึ่งเป็นตัวพาหะของโรคเวสต์ไนล์ บริเวณที่เป็นแหล่งอาศัยของนกธรรมชาติทั้งนกอพยพและนกประจำถิ่น มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และนำไปเป็นข้อมูลในการวางแผนการควบคุมป้องกันการอุบัติใหม่ของโรคเวสต์ไนล์ในสัตว์ อีกทั้งเป็นต้นแบบในการศึกษาโรคติดเชื้ออื่น ๆ ที่สามารถ ติดถึงมนุษย์ได้

4. วิธีทดลอง

4.1 ขอบเขตการดำเนินงานโครงการวิจัย

สำรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในยุงรำคาญ (*Culex spp*) ภายในพื้นที่ 2 จังหวัด ในแถบตะวันตกของประเทศไทย ประกอบด้วย พื้นที่ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และพื้นที่โครงการพระราชดำริแหลมผักเบี้ย อ.หาดเจ้าสำราญ จังหวัด

เพชรบุรี และตรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ ในเบื้องต้นด้วยชุดตรวจสอบต่อโรคเวสต์ไนล์ และยืนยันผลด้วยวิธี conventional RT-PCR

4.2 รายละเอียดของขอบเขตการดำเนินงาน โครงการวิจัย

ชนิดของยุง และช่วงเวลาเก็บ

- a. จากการศึกษาของ Hayes และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 พบว่ายุงในตระกูล Culex โดยเฉพาะ *Culex pipens* เป็นยุงพาหะชนิดสำคัญในการนำเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์



รูปภาพที่ 1 ยุงในตระกูล Culex (ชื่อสามัญคือ ยุงรำคาญ ออกหากินช่วงเวลา 18.00 – ตลอดทั้งคืน) ที่มา: www.bugbegone.co.th/mos.html

- b. การเก็บใช้ตาข่ายดักจับแมลง และเครื่องดักเก็บยุง ส่วนยุงที่ดักได้จะถ่ายจากตาข่ายใส่ใน

ภาชนะปิด แล้วนำตัวอย่างยุงไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 15 นาที เพื่อเป็นการทำสลับและรักษาสภาพตัวอย่างยุง จนกระทั่งทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป (Theodore *et al.*, 2001)

4.3 พื้นที่ในการเก็บตัวอย่าง

เน้นบริเวณแหล่งน้ำในเขตชุมชน และแหล่งน้ำธรรมชาติขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นแหล่งอาศัยของนกอพยพและนกประจำถิ่น ดังต่อไปนี้

- จังหวัดนครปฐม :
 - มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน บริเวณหน่วยสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์
 - พิกัด GPS ที่ 47 P 0516933 UTM 1560979
- จังหวัดเพชรบุรี :
 - โครงการพระราชดำริแหลมผักเบี้ย
 - พิกัด GPS ที่ 47 P 0516573 UTM 1562485

4.4 ช่วงเวลาการดำเนินการศึกษา

ระยะเวลาดำเนินการประมาณ 2 ปี เดือนโดยจะทำการเก็บตัวอย่าง และวินิจฉัยตลอด

ระยะเวลาดำเนินการ โดยจะดำเนินการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ดังกล่าวเดือนละ 1 - 2 ครั้ง

4.5 การสรุปและวิเคราะห์ผลการศึกษา ประมาณ 1 เดือนได้แก่ เมษายน 53 ถึง พฤษภาคม 53

4.6 ขั้นตอนการดำเนินงาน

เก็บตัวอย่างยุง ตามช่วงเวลาดังกล่าวโดยใช้ตาข่ายดักจับแมลง และเครื่องดักยุง (รูปภาพที่ 2) ยุงที่ดักได้จะถ่ายจากตาข่ายใส่ในภาชนะปิด แล้วนำไปใส่ในถังน้ำแข็ง หรือ ช่องแช่แข็งภายในตู้เย็น เพื่อเป็นการทำสลายยุงก่อนที่จะนำมาแยกชนิดโดยดูจากลักษณะภายนอกเป็นหลัก (รูปภาพที่ 3) แล้วจึงนำมาศึกษาโดยใช้ชุดตรวจสอบหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ ชื่อการค้า VecTest (Medical analysis systems, Inc., Camarillo, CA, USA) (รูปภาพที่ 4) มีค่าความไวต่อการตรวจสอบประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความจำเพาะต่อการตรวจสอบประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ (Padgett *et al.*, 2006 and Burkhalter *et al.*, 2006) โดยมีขั้นตอนการทดสอบพอสังเขปดังนี้ นำตัวอย่างยุงเพศเมียประมาณ 50 ตัวอย่าง ใส่ลงในหลอดพลาสติกที่บรรจุสารละลายบับเฟอร์ (grinding solution) ของชุดตรวจสอบ VecTest (รูปภาพที่ 4) และใส่ลูกเหล็กในหลอดพลาสติกจำนวน 4 ลูก เพื่อช่วยในการบดตัวอย่างยุงโดยการเขย่าหลอดพลาสติกไปมา จนตัวอย่างเหลวเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenate) (รูปภาพที่ 5 และ 6) จากนั้นนำตัวอย่างละลายเนื้อเยื่อมาทดสอบด้วยชุดตรวจสอบหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ (Stip test, VecTest) ซึ่งอาศัยหลักการของแอนติเจนแอนติบอดีคอมเพลกซ์ชนิดคอลลิคโตรมาโตรกราฟฟี ผลการทดสอบสังเกตลักษณะรูปแบบของแถบสีบนแท่ง stip test (รูปภาพที่ 7) ในกรณีผลลบ จะพบแถบสีม่วงแดงเพียงหนึ่งแถบ ซึ่งแสดงว่าไม่พบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในตัวอย่าง และยังบ่งชี้ว่าชุดตรวจสอบยังใช้งานได้ตามปกติ และกรณีผลบวก จะพบแถบสีม่วงสองแถบ โดยแถบที่แสดงว่าตรวจพบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์นั้นจะพบในตำแหน่งถัดจากแถบที่หนึ่งลงมา



รูปภาพที่ 2 แสดงเครื่องดักจับยุง (mosquitoes light trap model Akio-2000, Japan)



รูปภาพที่ 3 แสดงตัวอย่างยุงที่ดักจับได้ และผ่านการทำสลับ



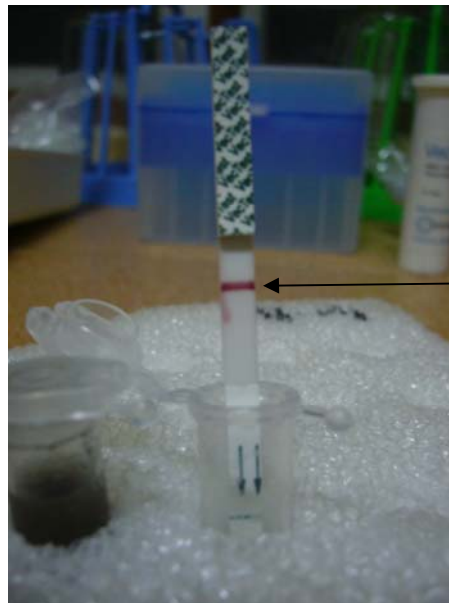
รูปภาพที่ 4 แสดงชุดตรวจสอบหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ ชื่อการค้า VecTest ®



รูปภาพที่ 5 แสดงตัวอย่างยุงประมาณ 50 ตัว ต่อการตรวจสอบ 1 ครั้ง



รูปภาพที่ 6 แสดงสารละลายเนื้อเยื่อตัวอย่างยุงที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน



รูปภาพที่ 7 แสดงผลลบจากชุดตรวจสอบหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ชื่อการค้า VecTest ®

- ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อชุดตรวจสอบ VecTest ® จะทำการยืนยันผลตรวจด้วยวิธี conventional RT-PCR
- ตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้ง 2 วิธีจัดว่าเป็นผลบวกที่แท้จริง และตัวอย่างดังกล่าวจะทำการเก็บรักษาไว้ที่ - 80 องศาเซลเซียส
- รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ผล และปัญหาต่าง ๆ
- รายงานความก้าวหน้าและทำรายงานฉบับสมบูรณ์เมื่อสิ้นสุดโครงการวิจัย

กรณีที่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวก คือสามารถตรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ ด้วยชุดตรวจสอบดังกล่าว จะทำการตรวจยืนยันผลบวกซ้ำ ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

วิธีทางชีวโมเลกุลที่นำมาใช้ในการยืนยันผลบวก ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อชุดตรวจสอบหาไวรัสเวสต์ไนล์ คือวิธี Conventional RT-PCR เนื่องจากลักษณะสารพันธุกรรมของไวรัสเป็นชนิดอาร์เอ็นเอ เส้นเดี่ยว สายบวก (positive-sense single-stranded RNA) โดยอาศัยคู่ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ โดยไพรเมอร์คู่แรก เป็นคู่ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบมาซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีนชนิด non structural protein 3 (NS3) ของเชื้อไวรัสในตระกูล *Flaviviridae* (Anderson *et al.*, 1999) ซึ่งถือได้ว่าเป็นการตรวจยืนยันขั้นแรกว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกข้างต้นนั้น มีเชื้อไวรัสในกลุ่มของ *Flavivirus* หรือไม่ ขณะที่ไพรเมอร์คู่ที่สอง จะเป็นการตรวจเพื่อชี้จำเพาะต่อเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกว่ามีเชื้อไวรัสภายในกลุ่มของ *Flavivirus* จากไพรเมอร์คู่แรก โดยไพรเมอร์คู่ที่สองจะถูกออกแบบมาให้มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในส่วนของยีน E ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสให้ไกล

โครโปรตีนอี ซึ่งมีความสำคัญโดยเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของโปรตีนโครงสร้างของอนุภาคไวรัส เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของอนุภาคไวรัส การปลดปล่อยของอนุภาคไวรัสลูก และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้ง B และ T lymphocytes ของเซลล์โฮสต์ (Campbell *et al.*, 2002 and Sanchez *et al.*, 2005)

การออกแบบไพรเมอร์อาศัยโปรแกรม ClustalW2 และสารพันธุกรรมทั้งหมด ของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ขนาด 11,030 นิวคลีโอไทด์ ที่ลำดับเลขอ้างอิง (Accession number) AY646354.1 (West Nile virus from USA, complete genome)

เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบ ซึ่งได้คู่ไพรเมอร์ดังนี้

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน E ของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์

Forward primer: 5'- CGG CGC CTT CAT ACA CAC – 3'

Reverse primer: 5' – GCC TTT GAA CAG ACG CCA T – 3'

ผลการศึกษาเปรียบเทียบร้อยละของความเหมือน (% homology) ระหว่างสารพันธุกรรมต้นแบบทั้งหมดของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ที่แยกเชื้อได้ในมนุษย์ (West Nile virus from USA, complete genome) กับคู่ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบขึ้น โดยอาศัยโปรแกรม CLUSTAL 2.0.12 Multiple Sequence Alignments ได้ผลดังนี้

Sequence format is Pearson

- Sequence 1: AY646354.1 ประกอบด้วยสารพันธุกรรมจำนวน 11,030 นิวคลีโอไทด์
- Sequence 2: Forward primer for E gene of WNV จำนวน 18 นิวคลีโอไทด์
- Sequence 3: reverse primer for E gene of WNV จำนวน 19 นิวคลีโอไทด์

Start of Pairwise alignments

- Sequences (1:2) Aligned. Score: 100
- Sequences (1:3) Aligned. Score: 100
- Sequences (2:3) Aligned. Score: 33

จากผลการศึกษาข้างชี้ให้เห็นว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้น ทั้ง Forward และ Reverse primer มีลำดับสารพันธุกรรมเหมือนกับสารพันธุกรรมต้นแบบทั้งหมดของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ที่แยกเชื้อได้ในมนุษย์ร้อยละ 100 หรือสามารถกล่าวเบื้องต้นได้ว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมานั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบเฉพาะระหว่างคู่ไพรเมอร์ทั้ง Forward และ Reverse primer พบว่ามีลำดับสารพันธุกรรมเหมือนกันร้อยละ 33 แสดงให้เห็นว่าคู่ไพรเมอร์ถูกออกแบบมาเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดลักษณะการจับคู่กันเองของไพรเมอร์ (primer dimmer)

ผลการศึกษาเพื่อระบุตำแหน่งของ Forward primer for E gene of WNV ในการเข้าจับอย่างเหมาะสม (complementary) กับสารพันธุกรรมต้นแบบทั้งหมดของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ที่แยกเชื้อได้ในมนุษย์ ได้ผลดังนี้

```
AY646354.1|      GTGGCCATTTTGTCCATGGACCAACTACTGTGGAGTCGCACGGAACTACTCCACACAG 1440
Forward      -----

AY646354.1|      GCTGGAGCCACTCAGGCAGGGAGATTTCAGCATCACTCCTGCGGCGCCTTCATACACACTA 1500
Forward      -----CGGCGCCTTCATACACAC-- 18
                        *****

AY646354.1|      AAGCTTGGAGAAATATGGAGAGGTGACAGTGGACTGTGAACACGGTCAGGGATTGACACC 1560
Forward      -----
```

พบว่า Forward primer for E gene จำนวน 18 นิวคลีโอไทด์เข้าจับอย่างเหมาะสม (complementary) กับสารพันธุกรรมต้นแบบทั้งหมดของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ที่แยกเชื้อได้ในมนุษย์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 1,480 ถึง 14,98

ผลการศึกษาเพื่อระบุตำแหน่งของ Forward primer for E gene of WNV ในการเข้าจับอย่างเหมาะสม (complementary) กับสารพันธุกรรมต้นแบบทั้งหมดของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ที่แยกเชื้อได้ในมนุษย์ ได้ผลดังนี้

```
AY646354.1|      GTCAAGTTGACGTCGGGTCATTTGAAGTGTAGAGTGAAGATGGAAAAATTGCAGTTGAAG 1860
reverse      -----

AY646354.1|      GGAACAACCTATGGCGTCTGTTCAAAGGCTTTCAAAGTTTCTTGGGACTCCCGCAGACACA 1920
reverse      -----ATGGCGTCTGTTCAAAGGC----- 19
                        *****

AY646354.1|      GGTCACGGCACTGTGGTGTGGAAATTGCAGTACACTGGCACGGATGGACCTTGCAAAGTT 1980
reverse      -----
```

พบว่า Forward primer for E gene จำนวน 18 นิวคลีโอไทด์เข้าจับอย่างเหมาะสม (complementary) กับสารพันธุกรรมต้นแบบทั้งหมดของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ที่แยกเชื้อได้ในมนุษย์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 1,871 ถึง 1,890

เมื่อทำการพิจารณาดำเนินการเข้าจับของทั้ง Forward และ Reverse primer กับสารพันธุกรรมต้นแบบทั้งหมดของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ที่แยกเชื้อได้ในมนุษย์ จะได้ขนาดของสารพันธุกรรมจำนวน 410 นิวคลีโอไทด์

ผลการศึกษาความความจำเพาะเจาะจงของทั้ง Forward และ Reverse primer Program BLASTN 2.2.24 พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบข้างต้น มีความจำเพาะเจาะจงกับสารพันธุกรรมของ

เชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ ในตำแหน่งของสารพันธุกรรมที่แปลรหัสได้โปรตีน polyprotein, E protein ของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ ที่มีการรายงานอยู่ในฐานข้อมูล Genbank ดังตารางข้างล่างนี้

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HM488124.1	West Nile virus isolate WNV-1/CTFS/BID-V4113/2006, complete genome	36.2	36.2	100%	0.87	100%
HM488123.1	West Nile virus isolate WNV-1/CTFS/BID-V4112/2006, complete genome	36.2	36.2	100%	0.87	100%
HM488122.1	West Nile virus isolate WNV-1/CTFS/BID-V4111/2006, complete genome	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386883.1	West Nile virus isolate IL070911CoHAL2 polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386882.1	West Nile virus isolate IL070905CoRSL2 polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386881.1	West Nile virus isolate IL070905CoRNL2 polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386879.1	West Nile virus isolate IL070829CoIHb polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386878.1	West Nile virus isolate IL070829CoIHa polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386877.1	West Nile virus isolate IL070829CoDA polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386876.1	West Nile virus isolate IL070829CoIH1 polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386875.1	West Nile virus isolate IL070824CoWWG2 polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386874.1	West Nile virus isolate IL070822CoALG1 polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386873.1	West Nile virus isolate IL070822CoALG2 polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386872.1	West Nile virus isolate IL070816CoEC polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386871.1	West Nile virus isolate IL070816CoCA polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386870.1	West Nile virus isolate IL070815CoSH polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386869.1	West Nile virus isolate IL070815CoHA polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386868.1	West Nile virus isolate IL070815CoMA polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386867.1	West Nile virus isolate IL070809CoRnc polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386866.1	West Nile virus isolate IL070809CoRnb polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386865.1	West Nile virus isolate IL070809CoRNA polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386864.1	West Nile virus isolate IL070809CoALG2 polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%
GU386863.1	West Nile virus isolate IL070808CoWWG2 polyprotein gene, partial cds	36.2	36.2	100%	0.87	100%

การสังเคราะห์ชิ้น E อาศัยเครื่อง Thermocycle ที่ออกแบบขั้นตอนการสังเคราะห์ตามคู่มือของเครื่อง ดังนี้

1. RT-PCR master mixtures:

- SuperScript III RT/ Platinum Taq Mix 50 μ L
- 2X Reaction Mix (a buffer containing 0.4 mM of each dNTP, 3.2 mM MgSO₄)
- Primers
- Templates

2. RT-PCR steps:

- ขั้นตอนที่ 1. reverse transcription อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที
- ขั้นตอนที่ 2. reverse transcription อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- ขั้นตอนที่ 3. Denaturation อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที
- ขั้นตอนที่ 4. Annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที
- ขั้นตอนที่ 5. Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที
- ขั้นตอนที่ 6. Post-extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

โดยมีการกำหนดให้เครื่องสังเคราะห์สารพันธุกรรม ตามขั้นตอนที่กำหนดขึ้นจำนวน 6 ขั้นตอน ซึ่งในขั้นตอนที่ 1 และ 2 จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนชนิดของสารพันธุกรรมจากชนิดอาร์

เอ็นเอเป็นชนิดดีเอ็นเอคู่เหมือน (complementary DNA, cDNA) และในขั้นตอนที่ 3 – 6 จะเป็นการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมที่สนใจจากสารพันธุกรรม cDNA ต้นแบบที่เตรียมได้จากขั้นตอนก่อนนี้ จากนั้นทำซ้ำในขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 35 ซ้ำ โดยอิน E ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะมีขนาดประมาณ 410 คู่เบส ซึ่งสามารถอ่านผลของการสังเคราะห์โดยอาศัยวิธี Agar gel electrophoresis ในสารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของ agar gel ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที และนำ agar gel ไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide และอ่านแถบสารพันธุกรรมของอิน E ดังกล่าว ภายใต้แสงยูวี โดยเปรียบเทียบขนาดกับสารพันธุกรรมมาตรฐาน (Genetic marker)

หมายเหตุ ส่วนของตัวอย่างบวกมาตรฐานของเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ (positive control) คือ West Nile Virus NATtrol™ strain NY 2001-6263, ZeptoMetrix corporation, USA.

5. ผลการทดลอง

ผลการสำรวจตัวอย่าง และการวิเคราะห์ผลด้วยชุดตรวจสอบ: ไม่พบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในทุกตัวอย่างของยุง ที่ถูกเก็บมาตรวจสอบภายในพื้นที่และช่วงเวลาดังกล่าว

6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

สำรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในยุง ในช่วงระหว่างเดือน พฤษภาคม 52 ถึงเดือนพฤศจิกายน 52 ภายในพื้นที่ 2 จังหวัด ในแถบตะวันตกของประเทศไทย ประกอบด้วย พื้นที่ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และพื้นที่ แหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี และตรวจหาเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ ในเบื้องต้นด้วยชุดตรวจสอบต่อโรคเวสต์ไนล์ และยืนยันผลด้วยวิธี conventional RT-PCR ซึ่งผลการสำรวจตัวอย่าง และการวิเคราะห์ผลด้วยชุดตรวจสอบ ไม่พบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ในทุกตัวอย่างของยุง ที่ถูกเก็บมาตรวจสอบภายในพื้นที่และช่วงเวลาดังกล่าว แม้ผลการวิเคราะห์จะไม่พบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ก็ตาม แต่ยังคงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเฝ้าสำรวจ และติดตามการเกิดโรคเวสต์ไนล์ในพื้นที่ดังกล่าวต่อไป

แม้ยังไม่มีรายงานการตรวจพบโรคเวสต์ไนล์ในประเทศไทย อีกทั้งผลการสำรวจตามแผนการดำเนินงานโครงการวิจัยนี้ก็ยังตรวจไม่พบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ อย่างไรก็ตามการเฝ้าระวังการเกิดโรคนี้อย่างต่อเนื่องยังเป็นสิ่งที่จำเป็น และควรตระหนัก โดยเฉพาะการสำรวจ และเฝ้าระวังในพื้นที่เสี่ยงต่อการอุบัติของโรคนี้ ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ได้ดำเนินการสำรวจเบื้องต้นในพื้นที่แถบตะวันตกของประเทศไทย โดยอ้างอิงข้อมูลธรรมชาติในการก่อโรคเวสต์ไนล์มาใช้ในการวางแผนการดำเนินงาน พบว่าพื้นที่ โครงการพระราชดำริแหลมผักเบี้ย จ.เพชรบุรี และพื้นที่ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ควรพิจารณาอยู่ในพื้นที่เฝ้าระวังต่อการอุบัติใหม่ของโรคเวสต์ไนล์ ในประเทศไทย

7.ภาคผนวก

7.1 กีฏวิทยาุงลาย (*Aedes spp*)

ุงลาย (*Aedes spp.*) เป็นแมลงจำพวกหนึ่งในประเทศไทย มีุงลายทั้งสิ้น 113 ชนิด แยกเป็น 17 Subgenera เช่น *Aedes*, *Stegomyia*, *Finlaya* เป็นต้น ุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออก มี 2 ชนิดคือ ุงลายบ้าน *Aedes aegypti* Linnaeus และุงลายสวน *Aedes albopictus* S k u s e ุงลายเป็นุงที่ไม่ชอบแสงแดด และลมแรง ดังนั้นจึงหากินไม่ไกลจากแหล่งเพาะพันธุ์ โดยทั่วไปมักบินไปไม่เกิน 50 – 80 เมตร นอกจากนี้ยังพบว่ามีุงลายชุกชุมในฤดูฝน ช่วงหลังฝนตกชุก เพราะมีอุณหภูมิและความชื้นเหมาะแก่การแพร่พันธุ์ ส่วนในฤดูอื่นๆ จะพบว่าความชุกชุมของุงลายลดลง สำหรับในเรื่องการแพร่กระจายของุงลายนั้น เชื่อกันว่าุงลายบ้าน ซึ่งเป็นุงที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาได้แพร่กระจายไปยังประเทศต่างๆ ระหว่างเส้นรุ้งที่ 40 องศาเหนือและใต้ โดยติดไปกับพาหนะที่ใช้ในการคมนาคม โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางเรือ

สำหรับในประเทศไทย ไม่มีใครทราบแน่นอนว่าุงลายได้เข้ามาแพร่พันธุ์ตั้งแต่เมื่อใด แต่มีรายงานปรากฏในวารสารวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับการพบุงลายในประเทศไทยครั้งแรก เมื่อปี พ.ศ. 2450 โดยเข้าใจว่าในระยะต้นๆ ุงลายจะแพร่พันธุ์อยู่ในเฉพาะเมืองใหญ่ ต่อมาในปี พ.ศ. 2508 พบว่าุงลายไม่ได้จำกัดอยู่เฉพาะในเมืองใหญ่ๆ แต่พบอยู่ทั่วไปทุกเมือง รวมทั้งตามชนบทในภาคต่างๆ ของประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบว่า การแพร่กระจายของุงลายถูกจำกัดโดยความสูงพื้นที่ที่คือจะไม่พบุงลายบ้านที่ระดับความสูง มากกว่า 1,000 ฟุต จากระดับน้ำทะเล ต่างจากุงลายสวน ซึ่งสามารถพบได้ทุกระดับความสูงแม้กระทั่งบนยอดเขา

ลักษณะทั่วไปของุงลาย รูปร่างุงลายแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. ส่วนหัว (Head) มีอวัยวะที่สำคัญ คือ ปาก (Proboscis) ทำหน้าที่เจาะดูดเลือด น้ำหวาน รยางค์ปาก 1 คู่ (Maxillary palpus) หนวด 1 คู่ (Antenna) และตา 1 คู่ เป็นตาประกอบ (Compound cyes) หนวด 1 คู่ ตัวผู้เรียกว่า Pilos
2. ส่วนอก (Thorax) แบ่งเป็น 3 ส่วน เป็นที่ติดตั้งเกี่ยวกับอวัยวะที่ใช้ในการเคลื่อนไหว ได้แก่

ขา (Legs) มีอยู่ 3 คู่ คือ ขาคู่หน้า ขาคู่กลาง และขาคู่หลัง ขาแมลงแบ่งออกเป็น 5 ส่วนคือ

Coxa (ปล้องแรกที่อยู่ติดกับส่วนอก), Trochanter, Femer (โคนขา), Tibia (ขา

ตอนกลาง), Tarsus (ขาตอนปลาย)

ปีก (Wings) มี 2 คู่ เติ่นชัดเพียง 1 คู่ โดยปีกหลังจะหดสั้นลง เรียกว่า ดิ่งปีก (Halteres) ใช้สำหรับทรงตัว และบังคับทิศทางการบิน ปีกคู่หน้ามีลักษณะบางใส มีเกล็ดปีก (Scale) มีเส้นปีกที่ชัดเจนแน่นอน และมีขนเล็กๆ (Wing fringe) บริเวณขอบด้านหลังของปีก

3. ส่วนท้อง (Abdomen) ประกอบด้วยปล้องต่างๆ 10 ปล้อง ซึ่งเห็นได้ชัด 8 ปล้อง โดยปล้องที่ 9, 10 เป็นส่วนประกอบของอวัยวะสืบพันธุ์ โดยทั่วไปจะมีเกล็ดปกคลุม ส่วนท้องขณะที่ยังไม่มีเลือดจะแฟบเล็ก เมื่อกินเลือดแล้วจะขยายออกได้มากทั้งนี้เนื่องจากบริเวณด้านข้างมีเยื่อบางๆ ทำให้อาหารสามารถขยายเพิ่มขึ้นได้ ด้านในท้องมีอวัยวะย่อยอาหาร อวัยวะสืบพันธุ์ และอวัยวะขับถ่าย

4. ตัวเต็มวัยของยุงลาย (Adult)

การลอกคราบ ยุงลายจะโผล่ส่วนหัวออกมาจากรอยด้านหลังของสันอก (Cephalothorax) ของตัวโม่งใช้เวลาเพียง 2 - 3 ชั่วโมง ออกจากคราบแล้วพักตัวสักครู่ให้ปีกแห้งแล้วจึงบินเพื่อหาแหล่งผสมพันธุ์ ยุงตัวผู้จะกินน้ำหวานเป็นอาหาร ส่วนยุงตัวเมียจะต้องการเลือดเพื่อการเจริญพัฒนาของไข่ ระยะเวลาตั้งแต่ลอกคราบจนถึงวางไข่ของตัวเมียประมาณ 2 - 3 สัปดาห์ ฉะนั้น ถ้าสิ่งแวดล้อมเหมาะสม ยุงลายอาจมี 15 - 20 รุ่นต่อปี อายุของยุงปกติตัวผู้มีอายุ 6 - 7 วัน ยุงตัวเมียอาจมีชีวิตได้ถึง 4 - 5 เดือน

ชีวนิสของยุงลาย

1. อาหารของยุงลาย อาหารที่มีความจำเป็นในการสร้างพลังงานต่างๆของทั้ง 2 เพศ คือ น้ำหวานจากดอกไม้ น้ำหวานจะถูกเก็บและย่อยในทางเดินอาหารส่วน Ventral diverticulum หรือ กิ้น (Crop) ส่วนเลือดมีความจำเป็นในการเจริญพัฒนาของไข่ ฉะนั้นยุงตัวเมียเท่านั้นที่กินเลือด โดยสามารถกินเลือดได้มากกว่าน้ำหนักตัว 1.5 - 2 เท่า หรือประมาณ 4.2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ปริมาณนี้มากมายจนยุงต้องกำจัดออก โดยการขับน้ำใสๆ ออกทางก้นภายใน 5 - 15 นาที ซึ่ง 2 - 3 หยดแรกเป็นกรดยูริก ต่อมาเป็นสารพวกที่ไปปฏิกิริยาบวกกับ Nihydrin และเม็ดเลือดแดง ยุงจะย่อยเลือดในส่วน Midgut

2. นิสการออกหากิน ยุงลายชอบกินเลือดคนมากกว่าเลือดสัตว์จึงจัดเป็นพวก Anthrophilic ชอบกัดคนในบ้าน (Endophagic) และเกาะพักในบ้านเพื่อรอให้ไข่ออกแล้วจึงบินไปวางไข่ ปกติยุงลาย

จะออกหากินในเวลากลางวันประมาณ 09.00-11.00 น. และ 13.00-15.00 . ชอบกัดบริเวณแขน ขา มากกว่าใบหน้า

3. ความสามารถในการบินและเกาะพัก ยุงลายบินได้ไกลประมาณ 100 หลา หรือไม่เกิน 1 กิโลเมตร จากแหล่งเพาะพันธุ์ของมัน หลังจากยุงลายกัด คุณเลือดแล้วจะหาที่เกาะพักตามบริเวณที่มีมืดและอับลม เช่น ห้องน้ำ ห้องนอน ห้องเก็บของ ยุงลายชอบเกาะพักตามสิ่งห้อยแขวนภายในบ้าน เช่น เสื้อผ้า มุ้ง ม่าน หรือตะกร้าเสื้อผ้าที่ใช้แล้ว ฝาผนังบ้าน เป็นต้น

4. การผสมพันธุ์ ยุงลายสามารถผสมพันธุ์กันได้แม้แต่ในที่แคบๆ เช่น ในหลอดแก้ว การผสมพันธุ์แบบนี้เรียกว่า Stenpgamy ยุงลายตัวผู้จะบินเข้าหาตัวเมียตามเสียงของการบิน

5. การวางไข่ หลังจากกินเลือดแล้ว ยุงลายจะใช้เวลาช่วงหนึ่งในการเจริญเติบโตของไข่ และรังไข่ ให้พร้อมที่จะวางไข่ ระยะเวลาดังกล่าวขึ้นอยู่กับอุณหภูมิดังนี้

- 29 - 30 องศาเซลเซียส ยุงลายจะวางไข่ภายใน 3 - 4 วัน
- 25 - 27 องศาเซลเซียส ยุงลายจะวางไข่ภายใน 4 - 5 วัน
- 20 - 25 องศาเซลเซียส ยุงลายจะวางไข่ตั้งแต่ 4 วัน ขึ้นไป
- ต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ยุงลายจะวางไข่ภายใน 26 - 27 วัน

เมื่อพร้อมที่จะวางไข่แล้ว ยุงจะหาที่เหมาะสมบินลงไปเกาะที่ผิวหนังมนุษย์หรือน้ำ โดยเอาเท้าเกาะติดกับผิวหนัง โดยใช้ส่วนปลายของท้องแตะกับผิวหนัง ยกส่วนท้องขึ้น แล้วปล่อยลงพร้อมกับวางไข่ ยุงลายจะวางไข่ที่ละฟองแล้วเดิน

การวางไข่จะวางเป็นจังหวะ

สม่ำเสมอ (Rhythmical oviposition) ซึ่งเป็นพฤติกรรมแบบ Circadian เช่นเดียวกับนิสัยการกัด ยุงลายสามารถวางไข่ได้ครั้งละ 50 - 150 ฟอง จำนวนไข่ขึ้นอยู่กับปริมาณของเลือดที่กิน และความสมบูรณ์ของตัวแม่พันธุ์ ในธรรมชาติยุงลายตัวเมียหนึ่งตัววางไข่ได้ประมาณ 3 ครั้ง จำนวนครั้งที่วางไข่ เรียกว่า อายุทางสรีระวิทยา (Physiological egg) การหาอายุทางสรีระวิทยา มีความสำคัญมากกว่าอายุที่แท้จริงของยุงเพราะยุงที่ผ่านการวางไข่มาแล้ว 1 ครั้ง ย่อมมีโอกาสนำเชื้อโรคได้มากกว่ายุงที่ยังไม่ได้วางไข่

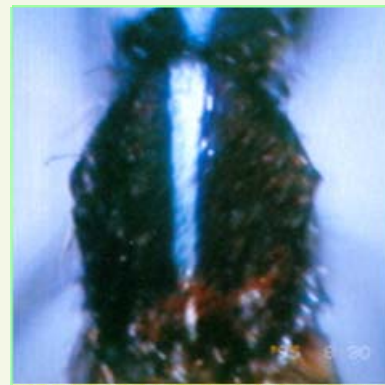
ยุงลายชอบวางไข่ตามภาชนะน้ำขังที่มีน้ำนิ่งและใส น้ำฝนมักเป็นน้ำที่ยุงลายชอบวางไข่มากที่สุด ดังนั้นจึงพบลูกน้ำยุงลายตามภาชนะขังน้ำดื่มและน้ำใช้ภายในบ้านและนอกบ้าน จากการสำรวจแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายพบว่า ร้อยละ 64.52 เป็นภาชนะเก็บขังน้ำที่อยู่ภายในบ้าน และร้อยละ 35.53 เป็นภาชนะเก็บขังน้ำที่อยู่ภายนอกบ้าน

แหล่งเพาะพันธุ์ จากการสำรวจแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายในประเทศไทย พบลูกน้ำ ยุงลายในภาชนะที่มนุษย์สร้างขึ้นเป็นส่วนใหญ่ จำแนกแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายตามลักษณะ ได้ ดังนี้

1. ภาชนะธรรมชาติ เช่น กะลามะพร้าว ซอกโพรงไม้
2. ตุ่มน้ำใส่น้ำดื่ม น้ำใช้
3. ภาชนะขังน้ำเล็กๆ เช่น จานรองขาตู้กันมด แจกันดอกไม้ ที่ล้างเท้า จานรองกระถาง ต้นไม้ ขางรถยนต์เก่าๆ กระจบ่อ เป็นต้น



รูปที่ 1 ยุงลายบ้าน , *Aedes aegypti* มีลักษณะเด่นคือ มีเกล็ดสีดำสลับขาวตามลำตัว หัว ออก ท้อง และส่วนขาและมีเกล็ดสีขาวเรียงตัวกันเห็นเป็นลวดลายคล้ายฟันเฟืองบริเวณด้านหลังอก



รูปที่ 2 ยุงลายสวน , *Aedes albopictus* ลักษณะคล้ายยุงลาย *Ae. aegypti*. ต่างกันที่บนด้านหลังของส่วนอก มีเกล็ดสีขาวเป็นเส้นตรง

7.2 กีฏวิทยาขุบกัณปล้อง (Anopheles)

ยุงพาหะนำเชื้อมาลาเรีย

ไข้มาลาเรียมีขุบกัณปล้องเป็นพาหะนำเชื้อ จำแนกกลุ่มตามความสำคัญในการเป็นพาหะดังนี้

1. **ยุงพาหะหลัก (primary vectors)** ประกอบด้วยยุงก้นปล่องชนิดไครัส (*Anopheles dirus*), ยุงก้นปล่องชนิดมินิมัส (*Anopheles minimus*) และยุงก้นปล่องชนิดแมคคูลาตัส (*Anopheles maculatus*) ยุงในกลุ่มนี้มีบทบาทสูงในการแพร่เชื้อไข้มาลาเรียในท้องที่ป่าเขา สวนยางและสวนผลไม้

- **ยุงก้นปล่องชนิดไครัส (*Anopheles dirus*)** เป็นยุงพาหะที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการแพร่เชื้อมาลาเรียในประเทศไทย อาศัยบริเวณป่าทึบ ชอบวางไข่ตามแหล่งน้ำขังที่มีร่มเงา โพรงหิน แอ่งน้ำ มีนิสัยชอบกินเลือดคนและชอบเกาะพักนอกบ้าน เวลากลางวันชอบเกาะพักตามพุ่มไม้ โพรงไม้ที่เงียบสงบ มีดและมีความชื้นสูง ใกล้แหล่งเพาะพันธุ์ เวลาพลบค่ำจะบินเข้าใกล้ที่อยู่อาศัยของคนมักเข้ากัดเวลา 18.00-04.00 น. มีรายงานว่า ในป่าทึบที่มีด ยุงชนิดนี้ออกกัดคนตอนกลางวันได้

- **ยุงก้นปล่องชนิดมินิมัส (*Anopheles minimus*)** เป็นยุงพาหะที่สำคัญพบได้ทั่วไปทั้งประเทศ มีการกระจายตัวกว้างขวางมาก ในท้องที่ป่าเชิงเขา ชายป่า เิงเขาที่มีการบุกเบิกทำการเกษตร ชอบเพาะพันธุ์ในลำธารน้ำไหลช้าๆ บริเวณเชิงเขา และแหล่งน้ำขัง ชอบเลือดคน เดิมพบว่ากัดคนและเกาะพักฝาบ้านหลังกินเลือด แต่ปัจจุบันพบว่ายุงชนิดนี้กัดคนนอกบ้าน และเข้ากัดตั้งแต่หัวค่ำ โดยหากินเวลา 18.00-22.00 น. สามารถนำเชื้อมาลาเรียได้ดีทั้งชนิดฟัลซิพารัมและไวเวกซ์

- **ยุงก้นปล่องชนิดแมคคูลาตัส (*Anopheles maculatus*)** คล้ายคลึงกับยุงก้นปล่องชนิดมินิมัส พบทั่วประเทศ แต่เป็นพาหะสำคัญเฉพาะในภาคใต้ของประเทศไทย เช่น ยะลา สตูล ปัตตานี นราธิวาส และต่อไปถึงชายแดนไทย-มาเลเซีย พบทั่วไปในท้องที่ป่าเขาทั่วประเทศ เพาะพันธุ์ในลำธารน้ำไหลที่มีแสงแดดส่องถึง มีนิสัยชอบกัดสัตว์และชอบกัดคนนอกบ้าน จะเข้ากัดคนมากในช่วงระหว่างเวลา 18.00-21.00 น.

2. **ยุงพาหะรอง (secondary vectors)** ประกอบด้วยยุงก้นปล่อง 3 ชนิดคือ ยุงก้นปล่องชนิดซันไดคัส (*Anopheles sundaicus*), ยุงก้นปล่องชนิดอโคไนตัส (*Anopheles aconitus*) และยุงก้นปล่องชนิดชูโดวิโมไร (*Anopheles pseudowillmori*)

- **ยุงก้นปล่องชนิดซันไดคัส (*Anopheles sundaicus*)** เป็นพาหะมาลาเรียในท้องที่ชายทะเลและเกาะแก่งทางภาคตะวันออกและภาคใต้ ชอบกัดคนนอกบ้านและเพาะพันธุ์ในแอ่งหินซึ่งมีน้ำกร่อยตามริมทะเล นาุ้งที่เลิกใช้ เกาะแก่งต่างๆ

- **ยุงก้นปล่องชนิดอโคไนตัส (*Anopheles aconitus*)** พบได้ทั่วไปในท้องที่ป่าเขาและที่ราบทุ่งนาทั่วประเทศ เพาะพันธุ์ในลำธารน้ำไหล น้ำขัง น้ำซึม และทุ่งนา มีนิสัยชอบกัดสัตว์และกัดคนนอกบ้าน ชุกชุมสูงในช่วงฤดูฝน

- **ยุงก้นปล่องชนิดชูโดวิโมไร (*Anopheles pseudowillmori*)** เป็นยุงที่พบอยู่ตามบริเวณป่าเขาตอนเหนือของประเทศ ลักษณะนิสัยคล้ายยุงก้นปล่องชนิดมินิมัส

นอกจากนี้แล้วการที่ยุงชนิดใดๆ มีความสามารถในการนำหรือแพร่เชื้อได้หรือไม่นั้น ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ความไวต่อเชื้อของยุงแต่ละชนิดที่ไม่เท่ากัน และแม้ยุงชนิดเดียวกัน ยังอาจมีสายพันธุ์ซึ่งไวต่อการติดเชื้อไม่เท่ากันด้วย อายุขัยของยุงเพราะเชื้อมาลาเรียใช้เวลาเจริญในตัวยุงอย่างน้อย 10 วัน หากยุงมีอายุยืนยาวกว่านั้นก็จะสามารถเป็นพาหะที่ดี อุปนิสัยในการดูดเลือดของยุง หากกัดบ่อยและเข้ากัดในคนก็เป็นพาหะที่ดีเช่นกัน และความหนาแน่นของยุง พาหะที่มีมาก เมื่อเทียบกับความหนาแน่นของประชากรคนบริเวณนั้น

7.3 กีฏวิทยาของรำคาญ (Culex)

- **Culex quiquefasciatus**
 - พบมากในแอฟริกาและเอเชีย วางไข่เป็นแพในน้ำเน่าเสีย แหล่งเพาะพันธุ์มักอยู่ใกล้บ้าน ไข่แพหนึ่ง มีประมาณ 200-250 ฟอง ไข่ฟักภายใน 30 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 24-30 องศาเซลเซียส ออกหากินกลางคืน ชอบกินเลือดคน ในประเทศพม่า อินเดีย อินโดนีเซีย ยุงชนิดนี้เป็นตัวการสำคัญในการนำ โรคฟิลาเรีย สำหรับประเทศไทยพบว่ายุงชนิดนี้สามารถนำเชื้อฟิลาเรียได้เช่นกันแต่ยังมี ข้อมูลน้อย นอกจากนี้อาจทำให้มีอาการคันแพ้ และเกิดเป็นแผลพุพองได้
- **Culex Tritaeniorhynchus**
 - ยุงชนิดนี้เป็นตัวนำเชื้อไวรัส Japanese encephalitis ซึ่งทำให้เกิดโรคไข้สมองอักเสบทั่วไป ในประเทศไทย แต่พบมากในจังหวัดภาคเหนือ เช่น เชียงใหม่ เชียงราย อุดรดิตถ์ น่าน แหล่งเพาะพันธุ์อยู่ตามท้องนา แหล่งน้ำที่เกิดจากรอยเท้าสัตว์ บ่อน้ำเล็กๆ ที่มีพืชน้ำ ลำธาร ชอบกินเลือดวัวควาย หมูมากกว่าเลือดคนและนก ออกหากินตั้งแต่พลบค่ำจนตลอดคืน ส่วนมากหากินนอกบ้าน
- **Culex Gelidus**
 - เป็นตัวนำเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้สมองอักเสบ เช่นเดียวกับ Cx. Tritaeniorhynchus แหล่ง เพาะพันธุ์ได้แก่ สระน้ำ บ่อ หนองน้ำ น้ำล้างคอกสัตว์ ลำธารเล็กๆ ชอบอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่มีพืชน้ำ หากินกลางคืน ชอบกินเลือดสัตว์
- **Culex Fuscocephala**
 - เป็นตัวนำเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้สมองอักเสบ พบตามหนองน้ำ บึงน้ำขาว หากินกลางคืน ชอบ กินเลือดสัตว์ เช่น วัว ควาย หมู นก และคน

7.4 กีฏวิทยาของเห็บ (Mansonia)

ยุง ในตระกูลนี้ที่สำคัญและเป็นตัวการนำโรคฟิลาเรีย Filariasis ซึ่งเกิดจากเชื้อ Brugia malayi ทางภาคใต้ของประเทศไทย ชนิดที่พบแพร่หลายได้แก่

- *Mansonia uniformis* ระวังคปาก (Maxillary palpi) สั้น ส่วนปลายอก (Scutellum) มีรอยหยักเห็นแบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนอกด้านข้างมีขนที่ Postspiracular area และมีเกล็ดบนปีกกว้างและไม่เหมือนกันทั้งสองข้าง สันหลังอก (Scutum) จะมีแถบยาวลงมาสีเขียว 1 คู่ แต่เห็นไม่ค่อยชัดนัก เป็นยุงขนาดกลางมีสีน้ำตาลอ่อน
- *Mansonia annulifera* รูปร่างคล้าย Mn. uniformis แต่สันหลังอก จะมีจุดสีขาวเงิน 4 จุด เห็นชัดเจน Scutellum ตรงกลางจะมีเกล็ดสีขาวใหญ่ เป็นยุงขนาดเล็กจนถึงขนาดกลางมีสีซีด
- *Mansonia annulata* คล้าย Mn. uniformis แต่สันขาหูล้าง (Femur) มีแถบขาวขวาง 3 แถบ สันหลังอกมีแถบสีขาวอยู่ข้างๆ ขาวมาจรดส่วนปลาย

วงจรชีวิตของ ยุง *Mansonia* เป็นแบบสมบูรณ์ complete metamorphosis เช่นเดียวกับ ยุงอื่นๆ ระยะเวลาการเจริญเติบโตค่อนข้าง ยาว จากไข่จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 23-30 วัน มี 4 ระยะ คือ

1. ระยะไข่ - ไข่จะถูกวางติดกับด้านใต้ของใบพืชน้ำ มีสีคล้ำ เกาะกันอยู่เป็นกระจกรูปร่างคล้ายกลีบดอกไม้อ กลุ่มหนึ่งประกอบด้วยไข่ประมาณ 75-200 ฟอง ไข่ใช้เวลา 2-3 วัน จึงฟักเป็นตัวลูกน้ำ
2. ระยะลูกน้ำ - มีลักษณะพิเศษอยู่ที่ท่อหายใจ siphon มีลักษณะรูปกรวยสั้น ปลายแหลมหยักคล้ายใบเลื่อยใช้เจาะติดกับต้นหรือรากพืชน้ำ มีลิ้น ปิดเปิดแข็งแรงมาก หายใจโดยได้รับออกซิเจนจากเซลล์ของพืชน้ำ ใช้เวลาเจริญเติบโต 16-20 วัน
3. ระยะตัวโม่ง - ท่อหายใจดัดแปลงรูปร่างเพื่อแทงเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชน้ำใช้เวลา 5-7 วัน
4. ระยะตัวเต็มวัย - ยุงชนิดนี้แตกต่างจากยุงชนิดอื่นๆ ตรงที่เกล็ด Scale บนปีกมีสีน้ำตาลคลาเปลี่ยนโดยมากเป็นสีน้ำตาล โดยเฉพาะที่เกล็ด มีลักษณะกลมและใหญ่กว่ายุงชนิดอื่น ยุงชนิดนี้หากินกลางคืน เมื่อผสมพันธุ์และกินเลือดแล้วมักจะเกาะพักบริเวณยอดหญ้า ร่อนไข่สู่ก้นน้ำ วางไข่ในแหล่งเพาะพันธุ์ตามบึง หรือหนองน้ำที่มีพืชน้ำ เช่น พวกจอก และผักตบชวา ยุงตัวเมียหากินนอกบ้าน ชอบกินเลือดวัว สุนัข แพะ สัตว์ปีก และคน

7.5 การสกัดสารพันธุกรรม

อาศัยชุดสกัด PureLink™ Viral RNA/DNA Kits ของบริษัท Invitrogen ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. Preparing lysate
2. Binding and washing
3. Elution

1. ขั้นตอน preparing lysate

1.1 Add 25 microlites (μl) Proteinase K (included with the kit) into a sterile microcentrifuge tube.

1.2 Add 200 μl of cell-free sample (equilibrated to room temperature) into the microcentrifuge tube.

Note: If you are processing <200 μl sample, adjust final volume of the sample to 200 μl using PBS or 0.9% NaCl.

1.3 Add 200 μl Lysis Buffer (containing 5.6 μg Carrier RNA). Close the tube lid and mix by vortexing for 15 seconds.

1.4 Incubate at 56 °C for 15 minutes.

1.5 Briefly centrifuge the tube to remove any drops from the inside of the lid.

1.6 Proceed immediately to Binding and Washing Step.

2. ขั้นตอน Binding and washing

2.1 Add 250 μl 96-100% ethanol to the lysate tube to obtain a final ethanol concentration of 37%, close the lid, and mix by vortexing for 15 seconds.

Note: If you are processing up to 10 samples, you may add ethanol to all tubes and then vortex each tube.

2.2 Incubate the lysate with ethanol for 5 minutes at room temperature.

2.3 Briefly centrifuge the tube to remove any drops from the inside of the lid.

2.4 Transfer the above lysate with ethanol (~675 μl) onto the Viral Spin Column.

2.5 Close the lid and centrifuge the column at ~6,800 x g for 1 minute. Discard the collection tube with the flowthrough.

Note: If you are processing >200 μl starting material, you need to perform multiple loading of the lysate by transferring any remaining lysate to the same Viral Spin Column (above) and centrifuge at 6,800 x g for 1 minute.

2.6 Place the spin column in a clean Wash Tube (2 ml) included with the kit and add 500 µl Wash Buffer (W5) with ethanol to the spin column.

2.7 Close the lid and centrifuge the column at ~6,800 x g for 1 minute. Discard the flow-through and place the spin column back into the Wash Tube.

Note: Additional Wash Tubes are available separately, if you do not wish to reuse the Wash Tube.

2.8 Add 500 µl Wash Buffer (W5) with ethanol into the spin column.

2.9 Close the lid, centrifuge at ~6,800 x g for 1 minute. Discard the Wash Tube containing the flow-through.

2.10 Place the spin column in another clean, Wash Tube (2 ml) included with the kit.

2.11 Centrifuge the column at maximum speed in a microcentrifuge for 1 minute to dry the membrane completely. Discard the Wash Tube with the flow through.

2.12 Proceed to the Elution Step.

3. ขั้นตอน Elution

3.1 Place the Viral Spin Column in a clean 1.5-ml Recovery Tube supplied with the kit.

3.2 Add 10-50 µl of Sterile, RNase-free water (E3) to the center of the column. Close the lid.

Note: You may use an elution volume of up to 150 µl for elution.

3.3 Incubate at room temperature for 1 minute.

3.4 Centrifuge the column at maximum speed for 1 minute. The Recovery Tube contains purified viral nucleic acids. Remove and discard the spin column.

3.5 Store the purified RNA/DNA at -80°C or use the RNA/DNA for the desired downstream application.

7.6 การตรวจสอบเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์

อาศัยชุดตรวจสอบ West Nile Virus Antigen Assay ของ Medical Analysis Systems, Inc.
มีรายละเอียดดังนี้

The VecTest® West Nile Virus (WNV) Antigen Assay is a rapid immuno-chromatographic assay intended for the qualitative determination of WNV antigen in infected mosquitoes. Results from this assay can enable public health teams to:

- Continuously monitor mosquito vectors
- Focus vector control and eradication efforts

- Deliver cost-effective prevention of disease

Summary

Assays which detect the disease-causing agents and pathogens in field populations of arthropods, such as mosquitoes, make it possible to monitor the spread of disease, to identify areas where there is risk of humans and other domestic animals contracting disease, and to more efficiently target arthropod control measures. The recent emergence of West Nile Virus (WNV) in the Western Hemisphere has prompted the development of several assays for the detection of West Nile antigen in vector species.

Growth of the virus in cell culture and PCR-based molecular methods remain the standard for virus identification. These methods require many reagents and multiple steps in a lengthy procedure that must be performed using specialized instruments within the laboratory.

The VecTest® WNV Antigen Assay uses monoclonal antibodies against WNV and the Flavivirus group to identify the presence or absence of viral antigen specific to WNV in mosquitoes. The VecTest® WNV Antigen assay is a rapid, one step wicking assay providing rapid results, ambient storage and requiring no specialized equipment.

Lack of a vaccine and the many unknowns concerning the transmission rate and involved vectors necessitate mosquito control measures as the only means of controlling the spread of the disease in human populations. The VecTest® WNV Antigen Assay provides a time-efficient and cost-effective method of controlling the spread of West Nile Virus.

Principle

The VecTest® WNV Antigen Assay is based on the dual monoclonal antibody “sandwich” principle. The test is initiated by placing one VecTest® WNV dipstick into 250 µl (0.25 ml) of ground mosquito extract. Antigen present in the solution binds to the specific antibody with a gold sol particle label. As the antigen-antibody-gold complexes migrate through the test zone containing immobilized WNV antibody, they bind to the immobilized antibody forming a “sandwich”. The unbound dye complexes migrate out of the test zone and can be captured later in the control zone. A reddish-purple line develops on the specific area of the test zone when antigen is present. The control line, farthest from the sample, should always develop provided the test has been carried out correctly.

Reagents

VecTest® WNV Antigen Assay is available as a unit of 50 single-use dipsticks. Each VecTest® WNV Antigen Assay kit contains the following:

50 VecTest® WNV Antigen Assay dipsticks in canisters with desiccant cap Test Zone:

§ Monoclonal antibodies to WNV immobilized on a membrane

Control Zone:

§ Polyclonal goat antibody to mouse immunoglobulins immobilized on a membrane

Conjugate Pad:

§ Gold complexed to monoclonal antibodies to flavivirus Grinding Solution (3 x 44 mL)

Storage and Stability

The VecTest® WNV Antigen Assay dipsticks and unopened Grinding Solution are stable up to the expiration date when stored at room temperature (10-30°C or 50-86°F). To obtain good test results, dipsticks should be kept tightly closed in the provided container until ready for use.

Specimen Collection and Preparation

Mosquitoes: Use mosquitoes captured using the method(s), which best support(s) the sampling of West Nile fever vectors in the geographic area in which testing is to be done.

Storage: Mosquitoes should be used immediately or dried for later use. Mosquito homogenate should be used immediately or stored at -20°C.

Procedure Materials Provided

§ VecTest® WNV Antigen Assay dipsticks (total of

50) in two canisters with desiccant cap

§ 3 bottles of Grinding Solution (44 ml each)

§ 50 culture tubes

§ 200 copper coated BBs in a container

§ 50 conical tubes

§ 5 ten-hole tube racks

§ Instructional insert

Materials Required (but not provided)

§ Timing device

§ Pipette

§ Vortex machine

§ Centrifuge (optional)

§ Motorized grinder (optional)

Guidelines for Handling the Grinding Solution

Before use, the Grinding Solution should be mixed by gently inverting the bottle five times. Procedure Outline 5. Determine the test results by removing the test strip and comparing it to the pictorial sample provided on the back of this insert.

WNV NEGATIVE POSITIVE

1. Place up to 50 female mosquitoes into a plastic culture tube provided in the kit.
 2. Dispense 2.5 mL of Grinding Solution onto the mosquitoes and add four copper-coated BBs provided in the kit.
 3. Vortex the capped tube for 1 minute at high speed until the mosquito pool is homogenized into a slurry. (A centrifugation step may be performed to remove excess mosquito debris before running the test.)
 4. Dispense 250 ml of mosquito homogenate into a conical tube provided, place the tube into the tube stand provided, and insert a test strip from the canister with the arrows pointing down. (Replace the desiccant cap on the canister to protect the remaining strips from moisture.)
- Wait 15 minutes for the test to be completed.

Results

The presence of only a control line on the dipstick indicates a negative test result. The presence of two lines indicates the presence of West Nile virus antigen. Results should be read within 30 minutes of performing the assay.

Limitations

It is not recommended to test more than 50 mosquitoes per 2.5 mL of grinding solution with one VecTest® WNV dipstick. The testing volume of the homogenized solution should be 250 ml +/- 25 ml. The amount of mosquito debris in larger quantities may interfere with the interpretation of results. The amount of foam remaining in the solution after homogenization should be minimized.

The VecTest® WNV dipstick detects the presence of West Nile Antigen in many vector species. *Aedes albopictus*, *Ae. atropalpus*, *Ae. japonicus*, *Ae. sollicitans* and *Culex pipiens* have been the most common carrier for West Nile Virus in the eastern United States. Other species of *Aedes* and *Culex* will also act as vectors

Precautions

1. When handling the dipsticks, use care to contact them only on the top labeled portion. Do not touch the middle (membrane) section, as this may damage or contaminate the control and test lines. Follow specific local, State and Federal (CDC recommended) guidelines in handling of samples and conducting any laboratory or field procedures on any material associated with infectious pathogens.
2. Do not use the test beyond expiration date.
3. Leave the test strips in the strip container, tightly closed until just before use.
4. Follow package insert instructions to ensure optimum test performance.
5. The grinding solution included in the kit contain sodium azide as a preservative, which may react with lead or copper in plumbing to form potentially explosive metal azides.
6. Upon disposal, always flush with a large volume of water to prevent azide buildup.

Specific Performance Characteristics

Sensitivity/specificity studies were performed during assay development in a laboratory setting. The WNV assay sensitivity is 103 fold dilution of a culture antigen, and 5-6 Log₁₀ PFU/ml WNV in laboratory infected mosquito pools when individual WNV assay was tested. No cross-reactivity was seen between the WNV and SLE antigens. One infected mosquito could be detected in a pool of 50 mosquitoes ground in a 2.5 ml sample according to results from CDC (Fort Collins,CO).

Bibliography

1. J. Ryan, K. Dave, E. Emmerich, B. Fernandez, M. Turell, J. Johnson, K. Gottfried, K. Burkhalter, A. Kerst, A. Hunt, R. Wirtz and R. Nasci (2003) Wicking Assays for the Rapid Detection of West Nile and St. Louis Encephalitis Viral Antigens in Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. of Med. Ento.* 40(1): 95-99.
2. Lanciotti, R.S., Kerst, A.J., Nasci, R.S., Godsey, M.S., Mitchell, C.J., Savage, H.M., Komar, N., Panella, N.A., Allen, B.C., Volpe, K.E., Davis, B.S., Roehring, J.T. (2000) Rapid detection of West Nile Virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by TaqMan Reverse Transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 38(11):4066-4071
3. Lindsay, R, Barker, I, Nayar, G, Drebot, M, Calvin, S, Scammell, C, Sachvie, C, Scammell-

- LaFleur, T, Dibernardo, A, Andonova, M, and Artsob, H. (2003) Rapid Antigen-Capture Assay to Detect West Nile Virus in Dead Corvids. *Emerg Infect Dis*, Vol 9, No 11, pp 1406-1410.
4. Gubler, D.J., Campbell, G.L., Nasci, R.S., Komar, N., Petersen, L., Roehring, J.T (2000) West Nile virus in the United States: guidelines for detection, prevention and control. *Viral Immunol.* 13(4): 469-475.
5. Anderson, et al. (1999) Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows and a cooper's hawk in Connecticut. *Science* 286:2331-2333.
6. Lanciotti, et al. (1999) Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the Northeastern United States. (1999) *Science* 286:2333-2337.
7. Kuno, F., Chang, G.J., Tsuchiya, K.R., Karabatsos, N., Cropp, C.B. (1998) Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J. Virol.* 72:73-83.
8. Nasci, R.S., Mitchell, C.J. (1996) Arbovirus titer variation in field-collected mosquitoes. *J. Am Mosq. Control Assoc.* 12(2Pt1):167-171.
9. Tsai, T.F., and Mitchel, C.J. (1988) St. Louis encephalitis, p. 113-143. In T.P. Monath (ed.), *Arboviruses: epidemiology and ecology*, vol. 4. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
10. Voller, A., Bidwell, D., and Bartlett, A. (1976) Microplate immunoassay for the immunodiagnosis of virus infections. In *Handbook of Clinical Immunology*, pp. 506-512. Edited by N.R. Rose & H.H. Friedman, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

<http://www.jcc2u.com/jcc2006/contentdetail.asp?content=C53>

http://careplusthai.com/wizContent.asp?wizConID=89&txtmMenu_ID=7

http://www.siamhealth.net/public_html/Disease/infectious/dhf/vector.htm

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ อยู่ระหว่างดำเนินการ
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เจริญพาณิชย์

ข้อมูลเบื้องต้นในการสำรวจเชื้อเวสต์ไนล์ในยุง สามารถนำไปประยุกต์
สำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยา และ/หรือการพัฒนาชุดตรวจสอบเพื่อการพาณิชย์
ต่อไป

- เจริญนโยบาย

ข้อมูลเบื้องต้นในการสำรวจเชื้อเวสต์ไนล์ในยุง สามารถนำไปประกอบการ
วางแผนในการเฝ้าระวังการเกิดโรคเวสต์ไนล์ โดยเฉพาะในพื้นที่เสี่ยงที่เอื้อต่อการเกิด
วงจรการเกิดโรคเวสต์ไนล์

- เจริญสาธารณะ

ข้อมูลเบื้องต้นในการสำรวจเชื้อเวสต์ไนล์ในยุง สามารถนำไปประกอบการ
วางแผนในการเฝ้าระวังการเกิดโรคเวสต์ไนล์ โดยเฉพาะในพื้นที่เสี่ยงที่เอื้อต่อการเกิด
วงจรการเกิดโรคเวสต์ไนล์

- เจริญวิชาการ

ข้อมูลเบื้องต้นในการสำรวจเชื้อเวสต์ไนล์ในยุง สามารถนำไปประกอบการ
เตรียมเนื้อหาการเรียนการสอนของนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- อื่นๆ

นำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการทางการเกษตร ครั้งที่ 7 “ก้าวอย่างพอ
สานต่อการศึกษา พัฒนาอย่างไทย” ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
กำแพงแสน