

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5980101

ชื่อโครงการ: การจำแนกชนิดหนอนพยาธิฟิลาเรียและแมลงริ้นดำพาหะในประเทศไทยโดยวิธีทางโมเลกุล

ื่อนักวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติพร แซ่อึ้ง
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address: atisaeung.noi@gmail.com; atiporn.s@cmu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 24 เดือน (ตั้งแต่วันที่ 2 พฤษภาคม พ.ศ. 2559 ถึง วันที่ 1 พฤษภาคม พ.ศ. 2561)

บทนำ: แมลงริ้นดำเป็นแมลงขนาดเล็ก จัดอยู่ในวงศ์ซิมูลิอิดี อันดับดิพเทอร่า ที่มีความสำคัญด้านการแพทย์และสัตวแพทย์ การกัดของแมลงริ้นดำเพศเมียนั้น เป็นปัญหาอย่างมากแก่คนและสัตว์เลี้ยง แมลงริ้นดำบางชนิดเป็นพาหะนำหนอนพยาธิฟิลาเรียมาสู่คนและสัตว์ โรคโปรโตซัวในเลือด ไวรส์และแบคทีเรียในสัตว์ นอกจากนี้ มีรายงานพบผู้ป่วยโรค zoonotic onchocerciasis ในหลายประเทศ ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อหนอนพยาธิฟิลาเรียที่พบในสัตว์เลี้ยง และติดต่อมาสู่คนโดยมีแมลงริ้นดำเป็นพาหะนำโรค อย่างไรก็ตาม องค์ความรู้เกี่ยวกับการติดเชื้อหนอนพยาธิฟิลาเรียในแมลงริ้นดำในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยมาก ทั้งยังไม่มีการศึกษาวิจัยอย่างเป็นระบบและจริงจัง

วิธีการทดลอง: ทำการเก็บตัวอย่างแมลงริ้นดำในระยะตัวหนอนวัยสุดท้าย และระยะดักแด้ จากแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวน 14 แหล่ง ใน 10 จังหวัด ซึ่งเป็นตัวแทนของ 4 ภูมิภาคของประเทศไทย ในระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2559 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561 และจับแมลงริ้นดำตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีพฤติกรรมบินเข้ามาหาคน โดยใช้สวิงโฉบจับ ในช่วงเวลาตั้งแต่ 06.00 น. ถึง 18.00 น. ที่บ้านแม่กลองคี อำเภออุ้มผาง จังหวัดตาก ภาคตะวันตกของประเทศไทย (ระดับความสูง 1,237 เมตร จากระดับน้ำทะเลปานกลาง) จากนั้นทำการผ่าตัวอย่างแมลงริ้นดำที่จำแนกชนิดแล้ว เพื่อตรวจหาการติดเชื้อหนอนพยาธิฟิลาเรีย จำแนกชนิดและวัดขนาดหนอนพยาธิฟิลาเรียตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (ยีน COI และ 12S rRNA) นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของแมลงริ้นดำตัวเต็มวัยเพศเมียนชนิด *Simulium* (*Simulium*) *nigrogilvum* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และการใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล (ยีน COI, COII และ ECP1) เพื่อทำการยืนยันความแตกต่างระดับชนิดของแมลงริ้นดำชนิดนี้กับชนิด *S. (S.) umphangense* ซึ่งเป็นชนิดที่มีความคล้ายคลึงกันเป็นอย่างมาก ทั้งในด้านลักษณะทางสัณฐานและนิสัยการเข้ากัดคน ทั้งนี้ยังได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการรูปต้นไม้ของกลุ่มแมลงริ้นดำและหนอนพยาธิฟิลาเรียที่พบในการศึกษานี้กับชนิดอื่นๆ

ผลการทดลอง: ในช่วงระยะเวลา 2 ปี การศึกษาได้ค้นพบแมลงร้นดำชนิดใหม่ของโลก จำนวน 14 ชนิด ที่จัดอยู่ใน 3 สกุลย่อยของแมลงร้นดำสกุล *Simulium* นอกจากนี้ ยังได้เขียนอธิบาย ลักษณะตัวเต็มวัยเพศผู้ของแมลงร้นดำชนิด *Simulium (Simulium) suchariti* และตัวเต็มวัยเพศเมียและระยะตัวหนอนของ *Simulium (Gomphostibia) udomi* เป็นครั้งแรกอีกด้วย ผลการศึกษา อวัยวะรับรู้สีกบนหนวดแมลงร้นดำตัวเต็มวัยเพศเมีย *S. (S.) nigrogilvum* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่ามีจำนวน 4 แบบ ได้แก่ chaetica sensilla, trichoid sensilla, basiconic sensilla และ coeloconic sensilla ในการศึกษา พบการติดเชื้อหนอนพยาธิฟิลาเรียตัวอ่อนระยะที่ 3 (ระยะติดต่อ) ในทรวงอกของแมลงร้นดำ *S. (S.) nigrogilvum* จำนวน 4 ตัว จากแมลงร้นดำทั้งหมดที่จับได้จำนวน 494 ตัว (คิดเป็นร้อยละ 0.81) โดยพบตัวอ่อนหนอนพยาธิระยะที่ 3 จำนวน 6 ตัว มีลำตัวขนาดใหญ่ (ยาว 1,100-1,300 μm กว้าง 24-26 μm) และหลุดอาหารเรียวยาวและมีขนาดสั้นกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวของลำตัว ผลการจำแนกชนิดตัวอ่อนระยะที่ 3 ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล พบว่าตัวอ่อนพยาธิทั้งหมดเป็นชนิด *Onchocerca* sp. type A ซึ่งตรงกับพยาธิฟิลาเรียที่พบในโคของประเทศไทย

สรุปผลการทดลอง: ค้นพบและรายงานแมลงร้นดำชนิดใหม่ของโลกจากประเทศไทยแล้วจำนวน 14 ชนิด ซึ่งทำให้จำนวนชนิดของแมลงร้นดำในประเทศไทยมีเพิ่มมากขึ้น โดยมีรายงานการค้นพบแล้วขณะนี้จำนวนทั้งสิ้น 107 ชนิด และเป็นครั้งแรกที่มีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกในระดับโครงสร้างที่มีความละเอียดมากยิ่งขึ้นในแมลงร้นดำตัวเต็มวัยเพศเมียชนิด *S. (S.) nigrogilvum* ทำให้เข้าใจชีววิทยาของแมลงร้นดำชนิดนี้ได้ดียิ่งขึ้น ทั้งยังทำให้ข้อมูลด้านอนุกรมวิธานของแมลงร้นดำชนิดนี้มีความสมบูรณ์มากขึ้น แมลงร้นดำ *S. (S.) nigrogilvum* มีพฤติกรรมชอบกัดกินเลือดคน และพบเป็นจำนวนมากที่สุดในพื้นที่ของหมู่บ้านแม่กลองดี อำเภออุ้มผาง จังหวัดตาก ซึ่งจากผลการตรวจพบการติดเชื้อหนอนพยาธิฟิลาเรียระยะติดต่อ ทำให้ประชาชนที่อาศัยในหมู่บ้านนี้ มีแนวโน้มที่จะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อหนอนพยาธิฟิลาเรียจากสัตว์

คำหลัก: แมลงร้นดำ หนอนพยาธิฟิลาเรีย ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

Abstract

Project Code: MRG5980101

Project Title: Molecular identification of filariae larvae and their black fly vectors in Thailand

Investigator: Assistant Professor Dr. Atiporn Saeung

Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

E-mail Address: atisaeung.noi@gmail.com; atiporn.s@cmu.ac.th

Project Period: 24 months (From 2 May 2016 to 1 May 2018)

Background: Black flies belonging to the family Simuliidae of the order Diptera, are a group of small bloodsucking insects of medical and veterinary importance. Due to the biting habit, females of certain simuliid species can transmit viruses, protozoans and filarial parasites. Numerous cases of zoonotic onchocerciasis have been caused by *Onchocerca* spp. of animal origin, as reported from several countries, but little is known about the transmission of zoonotic filarial parasites by black flies in Thailand.

Materials and Methods: Black fly larvae and pupae were collected from 14 stream sites in 10 provinces in four regions across Thailand during May 2016 to May 2018. Female adult flies flying around a human were collected at Mae Klong Kee village, Um-phang District, Tak Province, western Thailand (elevation 1,237 m) during the daytime from 06.00 to 18.00 hours. Adult female black flies were dissected and examined for filarial larvae. The filarial larvae were identified based on morphological and morphometric characters and analysis of sequences of mitochondrial COI and 12S rRNA gene regions. Furthermore, the external morphology of the adult female *Simulium* (*Simulium*) *nigrogilvum* was examined using scanning electron microscopy (SEM) and DNA-based assays [multi-locus approaches: mitochondrial genes (COI, COII) and nuclear gene (elongation complex protein 1, ECP1)] for species identification of *S. (S.) nigrogilvum* and its closely *S. (S.) umphangense*. The phylogenetic trees were constructed in order to determine the relationships among these black fly species as well as *Onchocerca* species.

Results: Fourteen new species of black flies belonging to three subgenera of the genus *Simulium* were discovered and described during 2 year periods. In addition, this study was the first to describe the male of *S. (S.) suchariti* and the female and larva of *S. (G.) udomi*. Using SEM, four types of antennal sensilla, including chaetica sensilla, trichoid sensilla, basiconic sensilla and coeloconic sensilla, were observed on flagellum of *S. (S.) nigrogilvum*. Four of 494 *S. (S.) nigrogilvum* females dissected were naturally infected with

six third-stage larvae (infective stage) (0.81%). All these infective larvae are characterized by their large body size (1,100-1,300 μm long by 24-26 μm wide), and elongate esophagus, which was shorter than half of the body length. All L3 were morphologically and molecularly identified as type A of *Onchocerca* sp., a parasite of cattle in Japan.

Conclusions: Fourteen new black fly species were discovered in our recent surveys, which led to a total 107 black-fly species in Thailand. External morphological characters of adult female *S. (S.) nigrogilvum* were studied by SEM for the first time, providing a better understanding of biological behaviours of this species, and greatly assisting in species identification. *Simulium (S.) nigrogilvum* is a main human-biter in Mae Klong Kee village, Um-phang District, Tak Province. People in this village are likely to be exposed to the risk of infection with zoonotic filariae.

Keywords: Black fly, Filarial worm, Mitochondrial DNA