

รายงานฉบับสมบูรณ์
(1 ธันวาคม 2537-30 พฤศจิกายน 2540)

เรื่อง

การศึกษาทางด้านอนุวิทยาเพื่อพัฒนาการใช้เดนโซไวรัส
สายพันธุ์เมืองไทยในการควบคุมพาหะนำโรคไขเลือดออก

โดย

ดร. ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

รายงานฉบับสมบูรณ์
(1 ธันวาคม 2537-30 พฤศจิกายน 2540)

เรื่อง

การศึกษาทางด้านอณูวิทยาเพื่อพัฒนาการใช้เดนโซไวรัส
สายพันธุ์เมืองไทยในการควบคุมพาหะนำโรคไขเลือดออก

โดย

ดร. ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

การศึกษาทางด้านอนุวิทยาเพื่อพัฒนาการใช้เดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทย ในการควบคุมพาหะนำโรคไข้เลือดออก

โดย ดร. ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

เดนโซไวรัสจัดอยู่ใน family Parvoviridae เป็นไวรัสที่ประกอบด้วย DNA มีขนาดเล็กประมาณ 4 kb ทำให้เกิดโรคเฉพาะในแมลง สามารถแบ่งตามคุณสมบัติเฉพาะได้เป็น 3 กลุ่มด้วยกัน เดนโซไวรัสกลุ่มสุดท้ายซึ่งพบในยุงลายและ cell line ของยุงหลายชนิด เพิ่งจะมีการศึกษากันอย่างจริงจังเมื่อไม่นานมานี้ เนื่องจากมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ในการควบคุมยุง โดยเฉพาะยุงลายซึ่งเป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออก

เดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยพบครั้งแรกจาก colony ของยุงลาย *Aedes aegypti* จากจังหวัดฉะเชิงเทราและยุงลาย *Aedes albopictus* จากจังหวัดกระบี่ โดยอาศัย primer จำเพาะในการตรวจโดยวิธี PCR จากการศึกษาการติดเชื้อในยุงลายทั้งสองชนิดพบว่าอัตราการติดเชื้อใน *Aedes aegypti* จะสูงกว่า *Aedes albopictus* (80% vs 25.71%) ในขณะที่อัตราการตายของ *Aedes albopictus* จะสูงกว่า *Aedes aegypti* (82% vs 51%) นอกจากนี้ความแตกต่างของอัตราการติดเชื้อยังขึ้นอยู่กับแหล่งที่ให้เชื้ออีกด้วย เดนโซไวรัสที่เลี้ยงไว้ใน cell line ของยุงจะมีประสิทธิภาพในการทำให้ยุงลายทั้งสองชนิดติดเชื้อได้ต่ำกว่าเดนโซไวรัสที่อาศัยอยู่ในลูกน้ำยุงลาย จากการทดลองนี้ยังพบว่าอัตราการติดเชื้อระหว่างยุงลายต่างสายพันธุ์กันหรือระหว่างยุงตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียจะไม่แตกต่างกัน

การศึกษากการถ่ายทอดเชื้อเดนโซไวรัสจากยุงลายรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งใน colony ของยุงลายติดเชื้อ พบว่าเชื้อเดนโซไวรัสสามารถถ่ายทอดไปในยุงลาย *Aedes aegypti* ได้ประมาณ 5-6 รุ่น แสดงว่าไวรัสชนิดนี้สามารถที่จะอาศัยอยู่ร่วมกับยุงลายในธรรมชาติได้ดี จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้เป็นพาหะในการถ่ายทอดยีน (expression vector) ไปในประชากรธรรมชาติของยุงพาหะในการควบคุมโดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม จากการทดลองฉีดเชื้อเดนโซไวรัสเข้าไปในยุงลาย *Aedes aegypti* ตัวเต็มวัยโดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อต่าง ๆ กัน พบว่ายุงลายส่วนใหญ่จะตายในช่วงเดือนแรก อัตราการอยู่รอดหลัง 1 เดือนอยู่ระหว่าง 23.53% ถึง 52.03% อัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสแตกต่างกันมาก (0% ถึง 100%) และไม่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเชื้อเดนโซไวรัส

ที่ใช้ในการฉีด อย่างไรก็ตามการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเราสามารถทำให้ยุงลายติดเชื้อได้ทั้งโดยวิธี oral infection ผ่านทางลูกน้ำ หรือโดยวิธี intrathoracic inoculation ผ่านทางยุงตัวเต็มวัย

จากการทดลองเลี้ยงยุงลายที่ติดเชื้อจำนวน 10 สายพันธุ์ พบว่ายุงลายที่สามารถถ่ายทอดไปได้ถึง 6 รุ่นมี 4 สายพันธุ์ด้วยกัน เมื่อนำเดนโซไวรัสสายพันธุ์ที่มีการถ่ายทอดไปได้มาเพิ่มจำนวนและหาลำดับ DNA พบว่าลำดับ DNA นั้นไม่แตกต่างจากเดนโซไวรัสสายพันธุ์ดั้งเดิม สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นไปได้ในการใช้เดนโซไวรัสเป็นตัวควบคุมยุงพาหะ (control agent) พบว่าถ้าใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสระดับหนึ่งคิดเป็นอัตราส่วนลูกน้ำติดเชื้อประมาณ 50 ตัวต่อลูกน้ำยุงลาย 100 ตัว ลูกน้ำยุงลายส่วนใหญ่จะเริ่มตายลงเมื่อเข้าสู่ระยะที่ 3-4 และมีอัตราการตายสะสมสูงขึ้นเรื่อย ๆ หลังจาก 1 สัปดาห์ จนกระทั่งคงที่อยู่ระหว่าง 70% ถึง 80% ในช่วงระยะเวลาประมาณ 1 เดือน

จากการหาลำดับ DNA ของผลผลิต PCR ของเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยพบว่าเดนโซไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเดนโซไวรัสสายพันธุ์จากประเทศรัสเซีย (AeDNV) ซึ่งแยกได้จากลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* แต่แตกต่างจากเดนโซไวรัสของยุงสายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งแยกได้จาก cell line ของยุงชนิดต่าง ๆ (AaPV, TaDNV และ HeDNV)

จากการทดลองสุ่มจับยุงลาย *Aedes aegypti* ในพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทราซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของ colony ยุงลายที่ติดเชื้อเดนโซไวรัส พบว่าอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสตามธรรมชาติมีความผันแปรในแต่ละเดือน และมีอัตราการติดเชื้อโดยเฉลี่ยเป็น 22.39% จากการสำรวจหาเดนโซไวรัสในยุงกลุ่ม culicine จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ซึ่งสามารถแยกออกเป็น 4 genus และ 30 species พบว่ายุงลายชนิด *Aedes aegypti* และยุงรำคาญชนิด *Culex quinquefasciatus* มีเชื้อเดนโซไวรัสอยู่ตามธรรมชาติ โดยมีความถี่ในการติดเชื้อแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค จากการสำรวจนี้ทำให้สันนิษฐานได้ว่ายุงลายชนิด *Aedes aegypti* หรือยุงรำคาญชนิด *Culex quinquefasciatus* อาจจะเป็น natural host ของเดนโซไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคไข้เลือดออกยังเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขในปัจจุบัน โรคนี้พบมากในเด็กวัยเรียน และมีแนวโน้มที่จะพบมากขึ้นในผู้ใหญ่ จากรายงานการเกิดโรคไข้เลือดออกในประเทศไทยพบว่าอัตราการระบาดของโรคนี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่เริ่มเกิดการระบาดครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2501 ไข้เลือดออกมักมีการระบาดแบบปีเว้นปี โดยมีการระบาดมากขึ้นในปี พ.ศ. 2530 ซึ่งมีผู้ป่วยถึง 171, 630 ราย และผู้เสียชีวิต 896 ราย (MOPH, 1987) เมื่อศึกษาจากอัตราการเกิดโรคนี้ในอดีตพบว่าการระบาดของโรคมีความสัมพันธ์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับการขยายตัวของประชากรและความเจริญเติบโตทางด้านสาธารณูปโภคและการคมนาคม ซึ่งทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลายซึ่งเป็นพาหะนำโรคในชุมชนต่าง ๆ เป็นที่คาดหมายว่าถ้าการควบคุมโรคไข้เลือดออกยังไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ผู้ป่วยเป็นโรคนี้โดยเฉลี่ยในช่วงปี พ.ศ. 2531 ถึง พ.ศ. 2540 จะเพิ่มขึ้นเป็น 124 คนต่อประชากร 100,000 คน (Ungchusak & Kunasol, 1988)

ในปัจจุบันการควบคุมโรคไข้เลือดออกโดยกระทรวงสาธารณสุขทำได้โดยวิธีเดียว คือ การควบคุมยุงลายซึ่งเป็นพาหะนำโรคโดยเน้นการใช้สารเคมีเป็นหลัก การควบคุมยุงลายดังกล่าวแบ่งได้เป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ การควบคุมลูกน้ำยุงลายตามแหล่งเพาะพันธุ์โดยใช้สารเคมีชนิด Temophos หรือ Abate ซึ่งชาวบ้านนิยมเรียกกันว่า “ทรายอะเบท” และการควบคุมยุงลายตัวเต็มวัยในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคโดยใช้การฉีดพ่นสารเคมีชนิด Malation หรือ Fenothion การควบคุมยุงลายด้วยวิธีดังกล่าวนี้จะได้ผลดีเมื่อมีการควบคุมอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในช่วงที่มีการระบาดของโรคในฤดูฝน การใช้สารเคมีเหล่านี้ต้องใช้งบประมาณสูงมากจนทำให้รัฐไม่สามารถให้การสนับสนุนได้อย่างทั่วถึงทุกชุมชน และไม่สามารถทำการควบคุมได้อย่างต่อเนื่อง จากการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นพบว่าชาวบ้านไม่นิยมใช้ทรายอะเบทเนื่องจากมีกลิ่นเหม็น นอกจากนั้นการใช้น้ำและเติมน้ำอย่างรวดเร็วของชาวบ้านทำให้ทรายอะเบทไม่สามารถจะฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ดีเท่าที่ควร (Kittayapong et al., unpublished data) สำหรับวิธีการพ่นหมอกควันโดยใช้สารเคมีมักจะกระทำในช่วงก่อนฤดูฝนหรือก่อนการระบาด ซึ่งจะช่วยลดความชุมชุมของยุงลายในช่วงนั้น แต่ตามความเป็นจริงแล้วความชุมชุมของยุงลายจะเพิ่มขึ้นเท่าเดิมภายในระยะเวลาอันสั้น (Strickman et al., unpublished data) ส่วนมาตรการการพ่นหมอกควันในแหล่งที่มีการระบาดหรือแหล่งที่มีผู้ป่วยเป็นไข้เลือดออกมักจะไม่ได้ผล เนื่องจากผู้ป่วยจะมีอาการเป็นไข้เลือดออกภายหลังจากยุงลายมีเชื้อไข้เลือดออกกัดเป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ยุงลายจึงทำการแพร่เชื้อไข้เลือดออกไปแล้วในช่วงระยะหนึ่ง และอาจจะตายไปก่อนการพ่นหมอกควัน ดังนั้นการป้องกันโรคไข้เลือดออกโดยการควบคุมยุงลายโดยวิธีที่ใช้อยู่ในปัจจุบันจึงยังไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร

สำหรับแนวทางการควบคุมไข้เลือดออกโดยการฉีดวัคซีนในกลุ่มประชากรที่มีอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคสูง ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งซึ่งน่าจะให้ผลดี แต่ในขณะนี้การพัฒนาวัคซีนไข้เลือดออกยังอยู่ในขั้นการทดลอง เนื่องจากเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้เลือดออกมีอยู่ถึง 4 ชนิด คือ ชนิดที่ 1, 2, 3 และ 4 การพัฒนาวัคซีนเพื่อจะสามารถป้องกันเชื้อไข้เลือดออกทั้ง 4 ชนิด จึงต้องใช้เวลานานจึงจะประสบผลสำเร็จ นอกจากนี้เมื่อประสบผลสำเร็จแล้วก็ยังเป็นการยากที่รัฐจะมีงบประมาณเพียงพอที่จะฉีดวัคซีนครอบคลุมกลุ่มประชากรที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้อย่างทั่วถึง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนาอย่างเช่น ประเทศไทย

เนื่องจากเหตุผลดังกล่าวและความก้าวหน้าทางวิทยาการอนุชีววิทยาในปัจจุบันผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะศึกษาความเป็นไปได้ของแนวใหม่ในการควบคุมพาหะนำโรคโดยมีเป้าหมายระยะไกลในการสร้างภูมิคุ้มกันเชื้อให้แก่พาหะนำโรค เพื่อไม่ให้พาหะนำโรคมาสู่คน ในการดำเนินการเพื่อให้บรรลุเป้าหมายดังกล่าวนี้จะต้องพัฒนายีนที่จะสร้างภูมิคุ้มกันเชื้อและพัฒนาระบบการถ่ายทอดยีนดังกล่าวไปในกลุ่มประชากรของพาหะนำโรค สำหรับการวิจัยนี้จะเน้นการพัฒนา ระบบการถ่ายทอดยีนโดยอาศัยเดนโซไวรัสซึ่งมีในยุงลายอยู่แล้วตามธรรมชาติเพื่อไม่ให้เสียสมดุลทางธรรมชาติ เดนโซไวรัสของยุงลายสายพันธุ์นี้เพิ่งจะค้นพบในเมืองไทยเป็นครั้งแรกเมื่อไม่นานมานี้ (Kittayapong et al., 1993) มีความสามารถในการถ่ายทอดตัวเองจากยุงลายรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง (transovarial transmission) ซึ่งเมื่อการพัฒนายีนที่จะสร้างภูมิคุ้มกันเชื้อเป็นที่ได้ผลแล้ว จะได้นำมารวมกับไวรัสชนิดนี้โดยวิธีการทางอนุชีววิทยาเพื่อจะสามารถถ่ายทอดไปในยุงลายได้ตามธรรมชาติ นอกจากนี้ผู้วิจัยจะศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เดนโซไวรัสสายพันธุ์นี้เป็นตัวควบคุมยุงลายโดยชีววิธี (biological control agent) อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาการติดเชื้อ (infectivity) และการถ่ายทอดเชื้อ (transovarial transmission) เดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยในยุงลายชนิด *Aedes aegypti* และ *Aedes albopictus*
2. เพื่อคัดเลือกเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายทอดเชื้อจากยุงลายรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง
3. เพื่อคัดเลือกเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าลูกน้ำยุงลายเพื่อนำไปพัฒนาเป็น viral insecticide ในการควบคุมแบบชีววิธี
4. เพื่อเพิ่มจำนวน (cloning) และศึกษาลำดับ DNA (DNA sequencing) ของเดนโซไวรัสสายพันธุ์ที่พบในเมืองไทยและเปรียบเทียบกับเดนโซไวรัสสายพันธุ์อื่น

5. เพื่อตรวจหาเดนโซไวรัสของยุงชนิดอื่น ๆ ในเมืองไทยโดยอาศัยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction)

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและเอกสารอ้างอิง

เดนโซไวรัส (Densovirus) จัดอยู่ใน Family Parvoviridae ซึ่งแบ่งเป็น 3 genus คือ Parvovirus, Dependovirus และ Densovirus (Siegl, 1991) ไวรัสที่จัดอยู่ใน 2 genus แรกจะทำให้เกิดโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่ทำให้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง สำหรับไวรัสที่อยู่ใน genus Densovirus จะทำให้เกิดโรคเฉพาะในแมลงจึงทำให้มีการศึกษาน้อยมาก เดนโซไวรัสเป็นไวรัสที่ประกอบด้วย DNA และมีขนาดเล็ก มีคุณสมบัติเฉพาะกลุ่มคือมีลำดับการเรียงตัวของ DNA ที่ส่วนปลายแบบ inverted terminal repeat sequences และ complementary single stranded DNA มีปลอกหุ้มแยกต่างหาก เดนโซไวรัส genus นี้ยังแบ่งออกเป็น subgroup ใหญ่ ๆ โดยอาศัยข้อมูลจากการศึกษาเดนโซไวรัสที่พบในพวกผีเสื้อ (Tijssen & Arella, 1991) เดนโซไวรัสกลุ่มที่ I จะมีความยาวของ DNA 6 kb และมีการสร้างโปรตีนแบบที่มีโครงสร้างและไม่มีโครงสร้าง (structural & non-structural protein) โดยอาศัย DNA คนละสาย ไวรัสกลุ่มนี้จะมีความสามารถทำให้เกิดโรคโดยเข้าไปอยู่ในเซลล์ของแมลงทุกชนิดยกเว้นทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) เดนโซไวรัสกลุ่มที่ II จะมีขนาดเล็กกว่าคือมีความยาวของ DNA 4.9 kb และมีการสร้างโปรตีนทั้งสองแบบที่กล่าวมาแล้วโดยอาศัย DNA สายเดียว ไวรัสกลุ่มนี้จะมีความสามารถทำให้เกิดโรคโดยเข้าไปอยู่ในเซลล์ของทางเดินอาหารส่วนกลางเท่านั้น เดนโซไวรัสทั้งสองกลุ่มจะมีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดโรคเฉพาะชนิดของแมลง (narrow host range) (Buchatsky, 1989)

เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการค้นพบเดนโซไวรัสในยุงทั้งหมด 3 สายพันธุ์ด้วยกัน สายพันธุ์แรกเรียกย่อว่า ADNV หรือ AeDNV พบในรัสเซียโดยแยกได้จากลูกน้ำของยุง *Aedes aegypti* (Afanasiev et al., 1991; Lebedeva et al., 1973) สายพันธุ์ที่ 2 เรียกย่อว่า AaPV พบในฝรั่งเศสโดยแยกได้จาก cell line ของ *Aedes albopictus* (C6/36) (Barreau et al., 1992; Boublik et al., 1994; Boublik et al., 1992) เดนโซไวรัสสายพันธุ์ที่ 3 ซึ่งไม่เป็นที่ยืนยันพบใน cell line ของ *Aedes pseudoscutellaris* (AP-61) โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอน (Gorziglia et al., 1980) จากการศึกษาลำดับของ DNA ในไวรัสชนิด AeDNV และ AaPV พบว่ามีลำดับ DNA เหมือนกันถึง 77% (Afanasiev et al., 1991; Boublik et al., 1994) และต่างจากลำดับ DNA ของเดนโซไวรัสซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ I และกลุ่มที่ II คือมีความยาวของ DNA 4kb และสามารถทำให้เกิดโรคโดยเข้าไปอยู่ในเซลล์ของยุงได้ทุกชนิด จึงสมควรจัดให้อยู่ในกลุ่มใหม่เนื่องจากไม่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดย Tijssen & Arella (1991) (O'Neill, pers. comm.)

เนื่องจากลำดับ DNA ของเดนโซไวรัสชนิด AeDNV และ AaPV มีความคล้ายคลึงกันจึงสามารถสร้าง oligonucleotides จาก ORF3 และใช้เป็น primer ที่สามารถตรวจเชื้อเดนโซไวรัสในยุงหรือใน cell line ของยุงโดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยสามารถขยาย DNA ของเดนโซไวรัสจำนวน 350 bp ได้ (O'Neill et al., 1992) จากผลการตรวจหาเชื้อเดนโซไวรัสใน Cell line ของยุงพบว่า Cell line ของ *Ae. albopictus*, *Cx. theileri*, *He. Equinus* และ *Tx. Amboinensis* มีเชื้อเดนโซไวรัสอยู่ (O' Neill et al., 1994)

จากการตรวจเชื้อเดนโซไวรัสใน colony ของยุงลายตัวเต็มวัยชนิด *Ae. aegypti* จากจังหวัดฉะเชิงเทรา และ *Ae. albopictus* จากจังหวัดกระบี่พบว่ามีเชื้อเดนโซไวรัสชนิดใหม่อยู่ จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยซึ่งเรียกว่า AeDNV มีลำดับ DNA ใกล้เคียงกับ AeDNV ซึ่งพบในรัสเซีย มีความสามารถในการถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งได้ดี แต่มีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำต่ำกว่า (Kittayapong et al., 1993) เนื่องจากเดนโซไวรัสของยุงเพิ่งจะค้นพบและมีการศึกษาค้นคว้าในห้วงปฏิบัติการเพียงไม่กี่แห่งทั่วโลกจึงยังไม่มีเอกสารอ้างอิงมากนัก

เอกสารอ้างอิง

- Afanasiev, B.N., E.E. Galyov, L.P. Buchatsky and Y.V. Kozlov. 1991. Nucleotide Sequence and Genomic Organization of *Aedes Densonucleosis* Virus. *Virology*, 185: 323-336.
- Barreau, C., F.X. Jousset and M. Cornet. 1992. Interactions between an Invertebrate Parvovirus and *Aedes aegypti* Mosquitoes. Heidelberg, Aug. 16-21, p. 263: Abstr. 25th Annu. Meeting Soc. Invertebr. Pathol.
- Boublik, Y., F. Jousset and M. Bergoin. 1994. Complete Nucleotide Sequence and Genomic Organization of the *Aedes albopictus* Larvae. *Virology*, 200: 752-763.
- Boublik, Y., F. Jousset and M. Bergoin. 1992. Molecular Cloning, Nucleotide Sequence and Genome Organization of *Aedes albopictus* Parvovirus (AaPV). Heidelberg, Aug. 16-21, p. 260: Abstr. 25th Annu. Meeting Soc. Invertebr. Pathol.
- Buchatsky, L.P. 1989. Densonucleosis of Blood Sucking Mosquitoes. *Disease of Aquatic Organisms*. 6: 145-150.
- Gorziglia, M., L. Botero, F. Gil and J. Esparza. 1980. Preliminary Characterization of Virus-Like Particles in a Mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) Cell Line (AP-61). *Intervirology* 13: 232-240.

- Kittayapong, P., R.B. Tesh, H.R. Braig, J.P. Gonzalez and S.L. O'Neill. 1993. Natural Populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Thailand are Persistently Infected with an Inherited Group III Denguevirus. Suppl. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49: 372.
- Lebedeva, O.P., M.A. Kuznetsova, A. P. Zelenko and A. P. Gudz-Gorban. 1973. Investigation of a Virus Disease of the Densonucleosis Type in a Laboratory Culture of *Aedes aegypti*. Acta Virology. 17: 253-256.
- MOPH. 1987. Preliminary Report of Dengue Haemorrhagic Fever. 1987. Division of Epidemiology, Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand.
- O'Neill, S. L., R. Giordano, A.M.E. Colbert, T.L. Karr and H.M. Robertson. 1992. 16S rRNA Phylogenetic Analysis of the Bacterial Endosymbionts Associated With Cytoplasmic Incompatibility in Insects. Proc. National Academy of Sciences U.S.A. 89: 2699-2702.
- O'Neill, S.L., P. Kittayapong, H.R. Braig, T. Andreadis, J.P. Gonzalez and R.B. Tesh. 1994. Insect Dengueviruses may be Widespread in Mosquito Cell lines. J. Gen. Virol. 76: 2067-2074.
- Siegl, G. 1991. Parvoviridae. In Classification and Nomenclature of Viruses, pp. 167-172. Edited by R.I.B. Francki, C.M. Fauquet, D.L. Knudson and F. Brown, New York: Springer-Verlag.
- Tijssen, P. and M. Arella. 1991. Parvoviridae. Structure and Reproduction of Densonucleosis Viruses. In Atlas of Invertebrate Viruses, Edited by J.R. Adams and J.R. Bonami, Boca Raton: CRC Press.
- Ungchusak, K. and P. Kunasol. 1988. Dengue Haemorrhagic Fever in Thailand, 1987. SE Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth. 19: 487-490.

วัตถุประสงค์ที่ 1: เพื่อศึกษาการติดเชื้อ (infectivity) และการถ่ายทอดเชื้อ (transovarial transmission) เดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยในยุงลาย ชนิด *Aedes aegypti* และ *Aedes albopictus*

1. การศึกษาการติดเชื้อเดนโซไวรัสในยุงลายต่างชนิด

ระเบียบวิธีการวิจัย

สายพันธุ์ยุงที่ใช้ในการวิจัย

1. ยุงลายชนิด *Aedes aegypti* สายพันธุ์จะเข้เกราะ: เป็นยุงลายปลอดเชื้อที่เลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลงของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเริ่ม

จากลูกน้ำที่สุ่มดักได้จากหนุม 2 ตำบลหัวสำโรง อำเภอแปลงยาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ตั้งแต่ พ.ศ. 2536 การสร้าง colony ยุงลายที่ปลอดเชื้อเดนโซไวรัสทำได้โดยให้ยุงลายตัวเมียกินเลือดหนู hamster แล้วจึงแยกยุงตัวเมียแต่ละตัวเพื่อให้วางไข่ก่อนที่จะนำยุงตัวแม่ไปตรวจเชื้อเดนโซไวรัสโดยวิธี PCR จากนั้นจึงนำไข่ของยุงตัวเมียที่ปลอดเชื้อมาเลี้ยงรวมกันเป็น colony

2. ยุงลายชนิด *Aedes albopictus* สายพันธุ์กระบี่: เป็นยุงลายปลอดเชื้อที่เริ่มจาก colony ที่เลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลงของแผนกกีฏวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารฝ่ายอเมริกัน ซึ่งเริ่มจากลูกน้ำที่สุ่มดักได้จากอำเภอเมือง จังหวัดกระบี่ ตั้งแต่ พ.ศ. 2535 การสร้าง colony ยุงลายที่ปลอดเชื้อเดนโซไวรัสเพื่อการทดลองนี้ทำได้เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในข้อ 1

สายพันธุ์เดนโซไวรัสที่ใช้ในการวิจัย

เดนโซไวรัสที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยที่แยกได้จาก colony ยุงลาย *Aedes albopictus* สายพันธุ์กระบี่ สำหรับการทดลองแรกจะใช้เดนโซไวรัสที่เลี้ยงไว้ใน cell line ของยุง *Aedes albopictus* (C6/36) สำหรับการทดลองที่ 2 จะใช้เดนโซไวรัสจากลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* ที่ติดเชื้อและเพิ่งตายลงใน colony ของยุง *Aedes aegypti* ที่ติดเชื้อเดนโซไวรัส ซึ่งเลี้ยงอยู่ในห้องเลี้ยงแมลงของแผนกกีฏวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารฝ่ายอเมริกัน

วิธีการศึกษาการติดเชื้อเดนโซไวรัสจาก cell line ของยุง *Aedes albopictus* (C6/36)

การศึกษากการติดเชื้อเดนโซไวรัสจาก cell line ของยุง *Aedes albopictus* (C 6/36) ทำได้โดยการเลี้ยงลูกน้ำยุงลายระยะที่ 1 แต่ละชนิดในขวดเลี้ยงเชื้อซึ่งมี cell line ที่ติดเชื้อเดนโซไวรัสอยู่ ไข่ของยุงลายที่ใช้ในการทดลองควรเป็นไข่ยุงที่เก็บแห้งไว้ไม่เกิน 3 เดือน เพื่อให้อัตราการฟักตัวของไข่เป็นไปตามปกติ ก่อนที่จะนำไข่ยุงลายลงน้ำจะต้องทำให้ผิวภายนอกของไข่ยุงลายปลอดเชื้อโดยนำไปแช่ในสารละลาย 1.25% sodium hyperchloride จากนั้นจึงนำไข่ยุงลายที่ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วไปใส่ในขวดเลี้ยงแมลงซึ่งมีอุณหภูมิ 26°C ถึง 28°C และความชื้นระหว่าง 50% ถึง 80% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำลูกน้ำยุงลายระยะที่ 1 ที่ฟักเป็นตัวอยู่ในขวดเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงในถาดเลี้ยงลูกน้ำ ระหว่างที่เป็นลูกน้ำจะต้องเลี้ยงด้วยอาหารปลาเม็ดจนกระทั่งเจริญเป็นตัวไม่ ระหว่างที่เลี้ยงลูกน้ำจะต้องบันทึกจำนวนที่ตายทุกวันเพื่อดูประสิทธิภาพในการฆ่ายุงลายของเดนโซไวรัสสายพันธุ์นี้ ยุงลายที่เป็นตัวเต็มวัยทั้งตัวผู้และตัวเมียจะถูกนำมาตรวจเชื้อเดนโซไวรัสโดยวิธี PCR เพื่อเปรียบเทียบอัตราการติดเชื้อระหว่างยุงลาย 2 ชนิด

วิธีการศึกษาการติดเชื้อเดนโซไวรัสจากลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* ที่มีเชื้ออยู่

การศึกษากการติดเชื้อเดนโซไวรัสโดยใช้ลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* ที่มีเชื้อ ทำได้โดยนำลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* จาก colony ที่มีเชื้อเดนโซไวรัสอยู่มาตรวจว่ามีเชื้ออยู่จริงโดยวิธี PCR ส่วนหัวของลูกน้ำ จากนั้นจึงนำลูกน้ำส่วนที่เหลือซึ่งได้ตรวจส่วนหัวแล้วว่ามีเชื้ออยู่มาบดในน้ำกลั่น 1 ml แล้วนำไปใส่ในภาดเลี้ยงลูกน้ำที่มีลูกน้ำระยะที่ 1 อยู่ภาดละ 100 ตัว จำนวนลูกน้ำติดเชื้อที่บดประมาณ 20-25 ตัวต่อลูกน้ำ 100 ตัวต่อ 1 ภาด ลูกน้ำยุงลายเหล่านี้จะถูกเลี้ยงด้วยอาหารปลาเม็ดจนเจริญเป็นตัวโม่ง จึงนำไปใส่กรงเลี้ยงยุงจนเป็นตัวเต็มวัย จากนั้นจึงนำยุงตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียไปตรวจเชื้อเดนโซไวรัสโดยวิธี PCR

การตรวจเชื้อเดนโซไวรัสโดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction)

การตรวจสอบว่ายุงลายแต่ละตัวมีเชื้อเดนโซไวรัสหรือไม่ ทำได้โดยการนำยุงลายแต่ละตัวมาบดให้ละเอียด (homogenize) ใน STE buffer โดยใช้ pestle ที่ปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นโดยใช้ความเร็ว 14,000 g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ตกตะกอน จากนั้นจึงนำส่วนที่เป็น supernatant ปริมาณ 1 µl ไปตรวจหาเชื้อโดยวิธี PCR โดยใช้ Primer จำเพาะ จำนวนตัวอย่างที่ใส่ในปฏิกิริยา PCR คือ 20 µl ต่อยุง 1 ตัว อุณหภูมิที่ใช้คือ 95°C เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 50°C เป็นเวลา 1 นาที และ 72°C เป็นเวลา 1 นาที รวมทั้งสิ้นจำนวน 35 รอบ จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ได้จากปฏิกิริยามาทำ DNA Electrophoresis โดยใช้ agarose gel 1.2% และใส่สาร ethidium bromide เพื่อให้สามารถใช้แสง UV อ่าน band ของเดนโซไวรัส ซึ่งจะมีขนาดประมาณ 350 bp ได้ (รูปที่ 1)

ผลการวิจัย

ผลที่ได้จากการศึกษาการติดเชื้อเดนโซไวรัสโดย oral infection ในยุงลายชนิด *Aedes aegypti* และ *Aedes albopictus* ได้สรุปไว้ในตารางที่ 1 ผลการวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสในยุงลายทั้งสองชนิดนี้แตกต่างกัน นอกจากนี้อัตราการติดเชืวยังแตกต่างกันเนื่องจากแหล่งของเดนโซไวรัสที่ใช้ในการทดลองด้วย อัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสจะสูงถึง 80% ในยุงลายชนิด *Aedes aegypti* ถ้าใช้ลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* ที่ติดเชื้อเป็นแหล่งให้เชื้อเดนโซไวรัส แต่อัตราการติดเชื้อจะลดลงเป็น 25.71% เมื่อใช้เชื้อเดนโซไวรัสที่เลี้ยงอยู่ใน cell line ของยุง *Aedes albopictus* (C6/36) ผลการทดลองในยุงลายชนิด *Aedes albopictus* จะเหมือนกับในยุงลายชนิด *Aedes aegypti* อัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสในยุงลายชนิด *Aedes albopictus* เป็น 33.33%

ถ้าใช้ลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* ที่ติดเชื้อเป็นแหล่งให้เชื้อเดนโซไวรัสและลดลงเป็น 4% ถ้าใช้เชื้อเดนโซไวรัสที่เลี้ยงอยู่ใน cell line ของยุง *Aedes albopictus* (C6/36)

ถ้าเปรียบเทียบอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสระหว่างยุงลายทั้งสองชนิด จะเห็นว่ายุงลายชนิด *Aedes aegypti* จะมีอัตราการติดเชื้อสูงกว่ายุงลายชนิด *Aedes albopictus* แต่ในทางกลับกัน อัตราการตายในยุงลายชนิด *Aedes albopictus* จะสูงกว่าในยุงลายชนิด *Aedes aegypti* โดยที่อัตราการตายของยุงลายชนิด *Aedes albopictus* เป็น 82% ในขณะที่อัตราการตายของยุงลายชนิด *Aedes aegypti* เป็น 51%

จากผลการวิจัยนั้นพอสรุปได้ว่ายุงลายต่างชนิดกันจะมีอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสแตกต่างกัน นอกจากนี้ความแตกต่างของอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัวยังขึ้นอยู่กับแหล่งที่ให้เชื้ออีกด้วย เดนโซไวรัสที่เลี้ยงไว้ใน cell line ของยุงจะมีประสิทธิภาพในการทำให้ยุงลายติดเชื้อต่ำกว่าเดนโซไวรัสที่อาศัยอยู่ในลูกน้ำยุงลายจาก colony ยุงลายที่ติดเชื้อ

2. การศึกษาการติดเชื้อเดนโซไวรัสในยุงลายต่างสายพันธุ์

ระเบียบวิธีวิจัย

สายพันธุ์ยุงที่ใช้ในการวิจัย

1. ยุงลาย *Aedes aegypti* สายพันธุ์อะเซิงเทรา I: เป็นสายพันธุ์ยุงลายที่เริ่มจากลูกน้ำที่สุ่มตกได้จากหมู่ 12 ตำบลหัวสำโรง อำเภอแปลงยาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ตั้งแต่ พ.ศ. 2537
2. ยุงลาย *Aedes aegypti* สายพันธุ์อะเซิงเทรา II: เป็นสายพันธุ์ยุงลายที่เริ่มจากลูกน้ำที่สุ่มตกได้จากหมู่ 6 ตำบลหัวสำโรง อำเภอแปลงยาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ตั้งแต่พ.ศ. 2537
3. ยุงลาย *Aedes aegypti* สายพันธุ์สงขลา I: เป็นสายพันธุ์ยุงลายที่เริ่มจากไข่ยุงที่ได้จาก ovitrap ซึ่งไปวางไว้ในบริเวณศูนย์วิจัยพันธุ์ยาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
4. ยุงลาย *Aedes aegypti* สายพันธุ์สงขลา II: เป็นสายพันธุ์ยุงลายที่เริ่มจากไข่ยุงที่ได้จาก ovitrap ซึ่งไปวางไว้ในบริเวณตึกคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

สายพันธุ์ยุงลายทั้งหมดนี้ได้ตั้งขึ้นชั่วคราวเพื่อการทดลองนี้ และได้ทำให้ colony ปลอดเชื้อเดนโซไวรัสก่อนนำมาทำการทดลอง โดยวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้ว

สายพันธุ์เดนโซไวรัสที่ใช้ในการวิจัย

เดนโซไวรัสที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยที่อยู่ใน colony ของยุงลาย *Aedes aegypti* ที่ติดเชื้อเดนโซไวรัส ซึ่งเลี้ยงอยู่ที่ห้องเลี้ยงแมลงของแผนกกีฏวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารฝ่ายอเมริกัน การทดลองนี้ใช้ลูกน้ำยุงลายที่ติดเชื้อจาก colony ดังกล่าวเป็นแหล่งให้เชื้อเดนโซไวรัส

วิธีการศึกษาการติดเชื้อเดนโซไวรัสในยุงลายต่างสายพันธุ์

วิธีการศึกษาการติดเชื้อเดนโซไวรัสโดยใช้ลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* ที่มีเชื้ออยู่เป็นแหล่งให้เชื้อเดนโซไวรัสจะทำเช่นเดียวกับการทดลองที่กล่าวแล้วในเบื้องต้น แต่ลูกน้ำยุงลายจะใช้จำนวน 5 ตัวต่อลูกน้ำ 100 ตัว เพื่อลดจำนวนยุงที่ตายระหว่างการทดลองลง

ผลการวิจัย

ผลที่ได้จากการศึกษาการติดเชื้อเดนโซไวรัสโดย oral infection ในยุงลาย *Aedes aegypti* ต่างสายพันธุ์ได้สรุปไว้ในตารางที่ 2 จากผลการวิจัยจะเห็นว่าอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสในยุงลาย *Aedes aegypti* จะอยู่ระหว่าง 62% ถึง 83.33% อัตราการติดเชื้อโดยเฉลี่ยของยุงลาย *Aedes aegypti* สายพันธุ์จากจังหวัดฉะเชิงเทราคือ 78.21% ในขณะที่อัตราการติดเชื้อโดยเฉลี่ยของยุงลาย *Aedes aegypti* สายพันธุ์จังหวัดสงขลาคือ 71% ถ้าเปรียบเทียบอัตราการติดเชื้อระหว่างยุงลายตัวผู้และตัวเมียจะเห็นว่ายุงลายตัวผู้จะมีอัตราการติดเชื้อตั้งแต่ 66.67% ถึง 80.00% ส่วนยุงลายตัวเมียจะมีอัตราการติดเชื้อตั้งแต่ 60.98% ถึง 86.36% อัตราการติดเชื้อโดยเฉลี่ยของยุงลายตัวผู้เป็น 74.65% ในขณะที่อัตราการติดเชื้อโดยเฉลี่ยของยุงลายตัวเมียเป็น 74.38% ซึ่งไม่แตกต่างกันเลย

จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสในยุงลาย *Aedes aegypti* ต่างสายพันธุ์กัน ซึ่งมีถิ่นกำเนิดมาจากภูมิภาคที่ต่างกันไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้อัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสในยุงลาย *Aedes aegypti* ตัวผู้และตัวเมียก็ไม่มีความแตกต่างเช่นเดียวกัน

3. การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อเดนโซไวรัสจากยุงลายรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งใน colony ของยุงลายติดเชื้อ

ระเบียบวิธีวิจัย

สายพันธุ์ยุงและเดนโซไวรัสที่ใช้ในการวิจัย

ยุงลายชนิด *Aedes aegypti* สายพันธุ์อะเจิงเทราที่มีเชื้อเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยซึ่งเลี้ยงอยู่ในห้องเลี้ยงแมลงที่แผนกกีฏวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารฝ่ายอเมริกัน colony นี้เริ่มมาจากลูกน้ำยุงลายที่สุ่มตกได้จากหมู 2 ตัวบลหัวสำโรง อำเภอแปลงยาว จังหวัดอะเจิงเทรา ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536

วิธีการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อเดนโซไวรัสจากยุงลายรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งใน colony ของยุงลายติดเชื้อ

การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อเดนโซไวรัสจากยุงลายรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งทำได้โดยนำยุงลายตัวเมียจำนวน 30 ตัวจาก colony ของยุงลาย *Aedes aegypti* ที่ติดเชื้อเดนโซไวรัสมาแยกใส่กรงยุงแล้วให้กินเลือดหนู hamster โดยการนำหนู hamster ไปใส่ในกรงขนาดจำกัดแล้วนำไปทิ้งไว้ในกรงยุงเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกยุงลายตัวเมียที่กินเลือดแล้วแต่ละตัวใส่หลอดแก้วที่มีกระดาษกรองอยู่ ส่วนบนของหลอดปิดด้วยผ้ามุงตาถี่เพื่อให้มีอากาศถ่ายเทได้ และสามารถให้อาหารซึ่งเป็นน้ำหวานความเข้มข้น 10% ได้ เมื่อแยกยุงลายตัวเมียใส่หลอดแก้วแล้วจึงเติมน้ำกลั่นในหลอดแต่ละหลอดประมาณ 1 ใน 4 ส่วน จากนั้นจึงนำหลอดแก้วที่มียุงลายตัวเมียอยู่ไปวางในห้องเลี้ยงแมลงที่อุณหภูมิประมาณ 26°C ถึง 28°C และความชื้นประมาณ 50% ถึง 80% เพื่อคอยให้ยุงลายตัวเมียวางไข่ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน เมื่อยุงลายตัวเมียแต่ละตัววางไข่แล้วยุงลายตัวเมียจะถูกนำไปฆ่าโดยใส่ในตู้เย็นซึ่งมีอุณหภูมิ -20°C แล้วจึงนำไปตรวจเชื้อเดนโซไวรัสโดยวิธี PCR ไข่ยุงในหลอดแก้วแต่ละหลอดซึ่งได้เขียนเบอร์ตรงกับหลอดที่ใส่ยุงตัวเมียจะถูกทิ้งไว้ให้แห้งและเก็บไว้ในห้องเลี้ยงแมลง เมื่อทราบผลการตรวจเชื้อเดนโซไวรัสในยุงตัวเมียแล้ว ไข่ยุงที่ติดเชื้อแต่ละหลอดจะถูกนำมาลงน้ำแยกกันโดยใช้ถาดเลี้ยงยุงอูมิเนียมซึ่งสามารถอบฆ่าเชื้อได้ระหว่างที่เป็นลูกน้ำจะต้องให้อาหารปลาเม็ดจนกว่าจะเจริญเป็นตัวโม่ง จึงนำไปใส่กรงเลี้ยงยุงเพื่อให้เจริญเป็นตัวเต็มวัยและผสมพันธุ์กัน หลังจากให้ยุงตัวเมียรุ่น F1 กินเลือดแล้วจะถูกนำมาแยกเลี้ยงในหลอดแก้วแต่ละหลอดเพื่อให้วางไข่แยกกัน ไข่ของยุงตัวเมียรุ่น F1 ที่ติดเชื้อเดนโซไวรัสจะถูกนำลงน้ำและเลี้ยงให้เจริญเป็นยุงตัวเต็มวัย และนำไปตรวจเชื้อเดนโซไวรัสตามวิธีที่ได้บรรยายไปแล้ว เพื่อดูการถ่ายทอดเชื้อในรุ่น F2 และรุ่นต่อ ๆ ไปจนถึงรุ่น F10 ยุงลายตัวผู้และตัวเมียในแต่ละรุ่นจะถูกสุ่มมาตรวจเชื้อเดนโซไวรัสรุ่นละประมาณ 10-20 ตัวเพื่อดูอัตราการถ่ายทอดเชื้อเดนโซไวรัส

ผลการวิจัย

จากผลการศึกษา ยุงลาย *Aedes aegypti* ตัวเมียจำนวน 20 ตัวจาก 30 ตัววางไข่บน กระดาษกรองในหลอดแก้ว และจากการตรวจเชื้อเดโนโซไวรัสด้วยวิธี PCR พบว่ายุงลายตัวเมีย จำนวน 18 ตัวจาก 20 ตัวมีเชื้ออยู่ ดังนั้นอัตราการติดเชื้อของยุงลายรุ่นพ่อแม่เป็น 90% เมื่อนำไข่ ยุงรุ่นแรกมาลงน้ำเพื่อให้ฟักเป็นตัว ปรากฏว่าไข่จากยุงลายตัวเมียจำนวน 14 ตัวจากทั้งหมด 18 ตัวสามารถฟักเป็นตัวได้ ไข่จากยุงลายตัวเมียจำนวน 4 ตัวไม่สามารถฟักเป็นตัวได้ จากการ ตรวจเชื้อในไข่ที่ไม่ฟักเป็นตัวพบว่ามีเชื้อเดโนโซไวรัสอยู่ จำนวนยุงลายตัวเมียที่ออกไข่ซึ่ง สามารถฟักเป็นตัวได้จะเพิ่มขึ้นจาก 77.78% ในลูกรุ่นที่ 1 และ 78.57% ในลูกรุ่นที่ 2 เป็น 90.91% ในลูกรุ่นที่ 3 ยุงลายตัวเมียในลูกรุ่น 4 ถึง 10 จะสามารถออกไข่ที่ฟักเป็นตัวได้ทั้งหมด ผลของเดโน โซไวรัสที่มีต่ออัตราการฟักไข่ของยุงลาย *Aedes aegypti* ในแต่ละรุ่นได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 4 แสดงผลการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อเดโนโซไวรัสในยุงลาย *Aedes aegypti* จาก รุ่นที่ 1 ถึงรุ่นที่ 10 อัตราการถ่ายทอดเชื้อเดโนโซไวรัสไปในยุงลายรุ่นที่ 1 จะสูงถึง 57.49% ส่วน อัตราการถ่ายทอดเชื้อเดโนโซไวรัสไปยังรุ่น 2 ถึง 4 จะไม่แตกต่างกันคือมีอัตราการถ่ายทอดเชื้อใน รุ่นที่ 2, 3, และ 4 เป็น 50%, 52.21%, และ 54.17% ตามลำดับ อัตราการถ่ายทอดเชื้อในรุ่นต่อไปจะลด ต่ำลงเป็น 20.83% ในรุ่นที่ 5 และ 14.58% ในรุ่นที่ 6 เชื้อเดโนโซไวรัสไม่สามารถถ่ายทอดต่อจาก รุ่นที่ 6 ไปรุ่นที่ 7 ได้ และจากการตรวจเชื้อเดโนโซไวรัสด้วยวิธี PCR ตั้งแต่รุ่นที่ 6 ถึงรุ่นที่ 10 ไม่พบ เชื้ออีกเลย

จากการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อเดโนโซไวรัสในยุงลาย *Aedes aegypti* จากรุ่นหนึ่งไปยังอีก รุ่นหนึ่งสรุปได้ว่าเชื้อเดโนโซไวรัสสามารถถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งได้ การถ่ายทอดเชื้อ โดยวิธีนี้ซึ่งเรียกว่า transovarial หรือ vertical transmission สามารถทำได้ในยุงลายประมาณ 6 รุ่น โดยไม่ต้องมีการถ่ายทอดเชื้อในระหว่างรุ่นเดียวกันซึ่งเรียกว่า horizontal transmission

4. การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อเดโนโซไวรัสจากยุงลายรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งภายหลังการ จัดเชื้อเข้ายุงตัวเต็มวัย

ระเบียบวิธีวิจัย

สายพันธุ์ยุงที่ใช้ในการวิจัย

ยุงลายชนิด *Aedes aegypti* สายพันธุ์จะเชิงเทราซึ่งปลอดเชื้อเดโนโซไวรัสจากภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สายพันธุ์เดนโซไวรัสที่ใช้ในการวิจัย

เดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยที่ใช้ในการทดลองได้แยกออกจาก colony ของยุงลาย *Aedes albopictus* สายพันธุ์กระปี่ซึ่งเลี้ยงอยู่ที่แผนกกีฏวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ฝ่ายอเมริกัน เดนโซไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าวได้เลี้ยงไว้ใน cell line ของยุง *Aedes albopictus* (C6/36)

วิธีการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อเดนโซไวรัสจากยุงลายรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งภายหลังการฉีดเชื้อเข้ายุงตัวเต็มวัย

ยุงลาย *Aedes aegypti* ที่ใช้ในการศึกษาซึ่งมีอายุระหว่าง 3-7 วันจะถูกแยกเป็นกลุ่ม ๆ กลุ่มละ 20 ตัวใส่ในถ้วยกระดาษที่มีผ้ามุงปิด ยุงแต่ละกลุ่มจะถูกนำไปฉีดเชื้อเดนโซไวรัสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 10 ระดับ โดยเริ่มจากเชื้อเดนโซไวรัสจากขวดเลี้ยงเชื้อที่มี C6/36 cell line อยู่และเชื้อเดนโซไวรัสที่ความเข้มข้นต่ำลงมาเรื่อย ๆ โดยทำให้เจือจางในสารละลาย PBS buffer ระดับละ 100 เท่า ดังนี้: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} และ 10^{-9} ดังนั้นจะได้สารละลายที่มีเดนโซไวรัสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 10 ระดับ สำหรับฉีดเข้ายุงลายตัวเต็มวัย ในกรณีฉีดเชื้อเดนโซไวรัสเข้าไปในยุงลายตัวเต็มวัยจะใช้วิธีการของ Rozeboom et al. (1974) ครั้งแรกต้องทำให้ยุงลายสลบโดยใช้ ether แล้วนำไปวางบน chilled plate ซึ่งอยู่ใต้กล้องจุลทรรศน์ การฉีดเชื้อจะฉีดเข้าบริเวณส่วนอกของยุงลายโดย syringe ครั้งละ 0.02 μ l ต่อยุงลาย 1 ตัว แต่ละระดับความเข้มข้นจะใช้ยุงลายจำนวน 20 ตัว หลังจากฉีดเชื้อเดนโซไวรัสแล้วจะนำยุงลายใส่กลับเข้าไปในถ้วยกระดาษที่มีผ้ามุงปิด ให้อาหารซึ่งเป็นสารละลายน้ำตาล 10% โดยชุปสำลีวางไว้บนผ้ามุงแล้วจึงนำถ้วยกระดาษที่มียุงลายที่ฉีดเชื้อเดนโซไวรัสแล้วไปทิ้งไว้ในห้องเลี้ยงแมลง หลังจาก 24 ชั่วโมง จะทำการบันทึกจำนวนยุงที่ตาย ยุงลายที่เหลืออยู่จะถ่ายใส่กรงเลี้ยงยุงโดยแยกกลุ่มตามระดับความเข้มข้นของเดนโซไวรัสที่ใช้ฉีด ยุงลายแต่ละกรงจะถูกให้กินเลือดหนู hamster เพื่อให้วางไข่ ยุงที่ตายในแต่ละวันจะถูกนับจำนวนและเก็บไว้ในตู้ -70°C หลังจาก 1 เดือนยุงลายที่ถูกฉีดเชื้อเดนโซไวรัสเข้าไปและยังมีชีวิตอยู่จะถูกนำไปตรวจว่ามีเชื้ออยู่หรือไม่โดยวิธี PCR

ไข่ยุงลายจากตัวแม่ที่ฉีดเชื้อเดนโซไวรัสจะถูกนำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยงแมลงที่อุณหภูมิ 26°C ถึง 28°C และความชื้นที่ 50% ถึง 80% จนเป็นตัวโม่งจึงนำไปใส่ในกรงเลี้ยงยุง หลังจากตัวโม่งกลายเป็นยุงตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียมันจะผสมพันธุ์กันเอง จากนั้น 1-2 วันจึงให้ยุงตัวเมียกินเลือดหนู hamster ส่วนยุงตัวผู้เลี้ยงด้วยน้ำหวาน 10% นำด้วยบดด้วยกระดาษกรองใส่น้ำกลั่นประมาณ 1 ใน 3 ไปวางไว้ในกรงยุงเพื่อให้ยุงตัวเมียวางไข่ เมื่อยุงตัวเมียวางไข่รวมกันในตัววางไข่แล้ว จึงนำยุงลายรุ่นที่ 1 ไปตรวจเชื้อเดนโซไวรัสโดยวิธี PCR ไข่ของยุงลายรุ่นที่ 2 จะถูกนำไปลงน้ำและเลี้ยงเป็นยุงตัวเต็มวัย หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจเชื้อเดนโซไวรัสเมื่อยุงตัวเมียวางไข่แล้ว

การเลี้ยงยุงลายรุ่นลูกหลานที่มาจากยุงลายรุ่นพ่อแม่ที่ถูกฉีดเชื้อเดนโซไวรัสนี้จะกระทำไป 10 รุ่น เพื่อดูความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อเดนโซไวรัสจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง

ผลการวิจัย

ตารางที่ 5 แสดงอัตราการตายและอัตราการรอดของยุงลายตัวเต็มวัยรุ่นพ่อแม่ที่ถูกฉีดเชื้อเดนโซไวรัสเข้าไปที่บริเวณส่วนนอกหลังการฉีดเชื้อ 1 เดือน อัตราการรอดหลังจาก 1 เดือนจะอยู่ระหว่าง 23.53% ถึง 52.03% ยกเว้นแต่กลุ่มของยุงลายที่ถูกฉีดเชื้อที่มีความเข้มข้นเป็น 10^3 เท่าของเชื้อเดนโซไวรัสจาก C6/36 cell line ซึ่งมีอัตราการรอดต่ำมาก (5.56%) ถ้าเปรียบเทียบดูอัตราการตายเป็นรายสัปดาห์จะพบว่ายุงลายที่ถูกฉีดเชื้อเหล่านี้จะตายมากที่สุดในสัปดาห์แรก ($n=92$) จำนวนยุงลายที่ตายในสัปดาห์ที่ 2, 3 และ 4 จะลดลงตามลำดับ ($n=9, 6$ และ 5 ในสัปดาห์ที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ)

ตารางที่ 6 แสดงอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสของยุงลายตัวเต็มวัยเพศเมียหลังจากถูกฉีดเชื้อเข้าไปที่บริเวณส่วนนอกตั้งแต่สัปดาห์แรกจนถึง 1 เดือน จากผลที่ได้จะเห็นว่าอัตราการติดเชื้อของยุงลายที่ตายระหว่างเดือนแรกจะต่ำกว่าอัตราการติดเชื้อของยุงลายที่รอดหลังจาก 1 เดือน (25% vs 65.63%) อัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสหลังจากการฉีดเชื้อเข้าไปที่บริเวณส่วนนอกของยุงลายที่ตายระหว่าง 1 เดือนจะอยู่ระหว่าง 0% (0/9) ถึง 41.67% (5/12) ในขณะที่อัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสในยุงลายที่รอดหลังจาก 1 เดือนจะอยู่ระหว่าง 0% (0/1) ถึง 100% (6/6)

ตารางที่ 7 แสดงการถ่ายทอดการติดเชื้อเดนโซไวรัสจากยุงลายรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง หลังจากที่ยุงลายตัวเต็มวัยรุ่นพ่อแม่ถูกฉีดเชื้อเข้าไปที่บริเวณส่วนนอก ผลการวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นว่าอัตราการถ่ายทอดเชื้อจะสูงในลูกรุ่นที่ 1 (83.15%) หลังจากนั้นอัตราการถ่ายทอดเชื้อจะลดลงมาเป็น 73% และ 76% ตามลำดับในลูกรุ่นที่ 2 และ 3 อัตราการถ่ายทอดเชื้อจากลูกรุ่นที่ 3 ไปยังลูกรุ่นที่ 4 จะลดลงเป็น 50% และลดลงเหลือเพียง 3% ในการถ่ายทอดเชื้อจากลูกรุ่นที่ 4 ไปยังรุ่นที่ 5 หลังจากลูกรุ่นที่ 5 จะไม่มีการถ่ายทอดเชื้อต่อไปยังลูกรุ่นที่ 6 และไม่พบเชื้อเดนโซไวรัสอีกเลยจากการตรวจเชื้อโดยวิธี PCR ของลูกรุ่นที่ 6 ถึงลูกรุ่นที่ 10

วัตถุประสงค์ที่ 2: เพื่อคัดเลือกเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายทอดเชื้อจากยุงลายรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง

ระเบียบวิธีวิจัย

การคัดเลือกเดนโซไวรัสสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อสูง ทำได้โดยการเลี้ยงลูกน้ำยุงลายที่ติดเชื้อเดนโซไวรัสจนเป็นยุงตัวเต็มวัย หลังจากที่ยุงตัวเมียกินเลือดแล้วจะ

ต้องแยกยุงตัวเมียแต่ละตัวใส่หลอดแก้วซึ่งมีกระดาษกรองบุทั้งส่วนก้นและส่วนข้าง ส่วนบนของหลอดปิดด้วยผ้ามุงตาข่ายเพื่อให้มีอากาศถ่ายเทได้ และสามารถให้อาหารซึ่งเป็นน้ำหวานที่มีความเข้มข้น 10% ได้ เมื่อแยกยุงตัวเมียใส่หลอดแล้วจึงเติมน้ำกลั่นในหลอดแต่ละหลอดประมาณ 1 ใน 4 ส่วน จากนั้นจึงนำหลอดใส่ยุงทั้งหมดไปไว้ในห้องเลี้ยงแมลง ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 26°C ถึง 28°C และความชื้นประมาณ 50% ถึง 80% เป็นเวลา 2 วัน เมื่อยุงลายตัวเมียแต่ละตัววางไข่แล้ว ยุงลายตัวเมียจะถูกนำไปตรวจเชื้อเดนิโซไวรัสโดยวิธี PCR ไข่ยุงในแต่ละหลอดซึ่งได้เขียนเบอร์ตรงกับหลอดใส่ยุงตัวเมียจะถูกตากให้แห้งและเก็บไว้ในห้องเลี้ยงแมลง เมื่อทราบผลการตรวจเชื้อเดนิโซไวรัสในยุงตัวเมียแล้ว ไข่ยุงที่ติดเชื้อแต่ละหลอดจะถูกนำมาลงน้ำแยกกันโดยใช้ภาชนะที่ยุงที่สามารถบดฆ่าเชื้อได้ ระหว่างที่เป็นลูกน้ำจะต้องให้อาหารจนกว่าจะเจริญเป็นตัวไม่จึงนำไปใส่กรงเพื่อให้เจริญเป็นตัวเต็มวัยและผสมพันธุ์กัน หลังจากให้ยุงตัวเมียรุ่น F1 กินเลือดแล้วจะถูกนำมาแยกเลี้ยงในหลอดแต่ละหลอดเพื่อให้วางไข่แยกกัน ไข่ของยุงตัวเมียรุ่น F1 ที่ติดเชื้อเดนิโซไวรัสจะถูกนำลงน้ำและเลี้ยงให้เจริญเป็นยุงตัวเต็มวัย และนำไปตรวจเชื้อเดนิโซไวรัสตามวิธีที่ได้บรรยายไปแล้ว เพื่อดูการถ่ายทอดเชื้อในรุ่น F2 และรุ่นต่อ ๆ ไป ชิ้นส่วนของเชื้อเดนิโซไวรัสสายพันธุ์ที่สามารถถ่ายทอดไปได้หลายรุ่นจะถูกนำมาเพิ่มจำนวน (cloning) และหาลำดับ DNA (sequencing) ตามวิธีการที่จะกล่าวถึงต่อไป เพื่อดูว่าเชื้อเดนิโซไวรัสดังกล่าวแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิมหรือไม่ ถ้าลำดับ DNA มีความแตกต่างกัน จึงจะทำการแยกเชื้อเดนิโซไวรัสสายพันธุ์ใหม่โดยเลี้ยงใน cell line ของยุงชนิด *Aedes albopictus* (C6/36)

ผลการวิจัย

จากผลการศึกษาได้ colony ของสายพันธุ์ยุงลายชนิด *Aedes aegypti* ที่ติดเชื้อเดนิโซไวรัสซึ่งเริ่มจากยุงตัวเมียที่ติดเชื้อเพียงตัวเดียวจำนวน 10 สายพันธุ์ด้วยกัน คือ สายพันธุ์ที่ 1, 2, 3, 4, 5, 13, 15, 16, 17 และ 18 รูปที่ 2 ถึง 11 แสดงอัตราการรอดของยุงลาย *Aedes aegypti* ในแต่ละรุ่น จากลูกรุ่นที่ 1 ถึงรุ่นที่ 10 ของสายพันธุ์ที่ 1, 2, 3, 4, 5, 13, 15, 16, 17 และ 18 ตามลำดับ จากผลที่ได้จะเห็นว่าอัตราการรอดของยุงลายในแต่ละสายพันธุ์จะมีความผันแปรแตกต่างกัน นอกจากนี้อัตราการรอดของยุงลายสายพันธุ์เดียวกันจะมีความแตกต่างกันในแต่ละรุ่นอีกด้วย ถ้ากล่าวโดยสรุปจะเห็นว่าอัตราการรอดของลูกรุ่นแรก ๆ ส่วนใหญ่จะต่ำกว่าในรุ่นต่อ ๆ มา ซึ่งอาจจะมีผลเนื่องมาจากการติดเชื้อเดนิโซไวรัสที่มีความรุนแรงในการฆ่าลูกน้ำยุงลายหลังจาก oral infection และเชื้อเดนิโซไวรัสอาจจะลดความรุนแรงในการฆ่าลูกน้ำยุงลายหลังจากผ่านไปในช่วงหลายรุ่น ซึ่งอาจจะเป็นผลจากการที่ยุงลายปรับตัวด้านทานต่อเชื้อเดนิโซไวรัส

รูปที่ 12 ถึง 21 แสดงความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อเดนิโซไวรัสจากยุงลายรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งจนถึงรุ่นสุดท้ายที่สามารถถ่ายทอดไปได้ของยุงตัวผู้และตัวเมียจากสายพันธุ์ที่ 1, 2, 3,

4, 5, 13, 15, 16, 17 และ 18 ตามลำดับ จากผลที่ได้จะเห็นว่าสายพันธุ์ที่ 1, 2 และ 3 สามารถถ่ายทอดเชื้อเดนโซไวรัสไปได้ 4 รุ่น สายพันธุ์ที่ 4, 16 และ 18 สามารถถ่ายทอดเชื้อเดนโซไวรัสไปได้ 5 รุ่น สายพันธุ์ที่สามารถถ่ายทอดเชื้อเดนโซไวรัสไปได้ถึง 6 รุ่น มี 4 สายพันธุ์ด้วยกันคือสายพันธุ์ที่ 5, 13, 15 และ 17 อัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสของยุงลายในแต่ละสายพันธุ์และในแต่ละรุ่นจะมีความผันแปรสูง แต่อัตราการติดเชื้อในยุงลายตัวผู้และตัวเมียในแต่ละสายพันธุ์และในแต่ละรุ่นจะไม่แตกต่างกันมากนัก

จากผลการหาลำดับ DNA (DNA sequencing) ของผลผลิต PCR ของเชื้อเดนโซไวรัสจากยุงลายสายพันธุ์ที่ 15 ซึ่งมีอัตราการถ่ายทอดเชื้อค่อนข้างสูงมากในแต่ละรุ่น พบว่าลำดับ DNA ของผลผลิต PCR ที่ได้จากยุงลายสายพันธุ์ที่ 15 ไม่แตกต่างจากลำดับ DNA ของผลผลิต PCR ของเชื้อเดนโซไวรัสที่ได้จากยุงลายที่ติดเชื้อมาเดิม ดังนั้นจึงไม่ได้ทำการเลี้ยงเชื้อเดนโซไวรัสของยุงลายสายพันธุ์เหล่านี้ใน cell line ของ *Aedes albopictus* (C6/36)

วัตถุประสงค์ที่ 3: การคัดเลือกเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย เพื่อนำไปพัฒนาเป็น viral insecticide ในการควบคุมแบบชีววิธี

ระเบียบวิธีวิจัย

จากการศึกษาในวัตถุประสงค์ที่ 2 สรุปได้ว่าการคัดเลือกสายพันธุ์เดนโซไวรัสโดยผ่านไปในยุงลายซึ่งเป็น host หลายรุ่นนั้นไม่สามารถทำได้ เนื่องจากเดนโซไวรัสสายพันธุ์นี้มีความผันแปรต่ำมาก ดังนั้นจุดประสงค์ที่ 3 นี้จะศึกษาประสิทธิภาพและความเป็นไปได้ของเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทย เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมทางชีววิธี (biological control agent)

การศึกษาประสิทธิภาพของเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยในการฆ่าลูกน้ำยุงลายทำได้โดยการทำให้ลูกน้ำยุงลายติดเชื้อเดนโซไวรัสโดยวิธีการที่กล่าวถึงแล้ว เมื่อลูกน้ำระยะที่ 4 หรือตัวไม่ตายลงจะต้องนำมาตรวจเชื้อเดนโซไวรัสโดยวิธี PCR เชื้อเดนโซไวรัสที่ใช้ในการทำให้ลูกน้ำยุงลายติดเชื้อได้จากการนำลูกน้ำยุงลายที่ติดเชื้อไปบดรวมกันในน้ำกลั่นจำนวน 1 ml แล้วจึงนำไปใส่ในภาดเลี้ยงลูกน้ำซึ่งมีน้ำกลั่นอยู่ภาดละ 1 ลิตรและมีลูกน้ำระยะที่ 1 อยู่เป็นจำนวนภาดละ 100 ตัว ลูกน้ำยุงลายที่ติดเชื้อที่ใช้ในการทดลองจะต้องยืนยันการติดเชื้อ โดยการตรวจส่วนหัวด้วยวิธี PCR

การเตรียมเชื้อเดนโซไวรัสจากลูกน้ำที่ตายจะกระทำเป็น 2 ชุดด้วยกัน ชุดแรกมีความเข้มข้นของเดนโซไวรัสต่ำกว่าโดยใช้ลูกน้ำจำนวน 50 ตัวรวมกันในน้ำกลั่น 1 ml ชุดที่ 2 จะมีความเข้มข้นของเดนโซไวรัสสูงกว่าโดยเพิ่มจำนวนลูกน้ำที่บดรวมกันเป็น 500 ตัวในน้ำกลั่น 1 ml ในการทดลองจะใช้สารละลายที่มีเดนโซไวรัสอยู่จำนวน 100 μ l ต่อลูกน้ำ 100 ตัวต่อภาดเลี้ยงลูกน้ำ 1

ถาด ในแต่ละการทดลองจะมีการเลี้ยงลูกน้ำจำนวนเท่ากันแต่ไม่มีเชื้อเดนโซไวรัสควบคุมไปด้วย และจะมีการทำซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละการทดลอง

ผลการวิจัย

ประสิทธิภาพและความเป็นไปได้ในการใช้เดนโซไวรัสควบคุมยุงลาย *Aedes aegypti*

ตารางที่ 8 แสดงอัตราการตายของยุงลาย *Aedes aegypti* โดยแยกระยะที่เป็นลูกน้ำ ตัวไม่เต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย เมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสต่ำ คือใช้สารละลายที่มีเชื้อเดนโซไวรัส 100 μl จากลูกน้ำที่ติดเชื้อเพียง 50 ตัวต่อลูกน้ำยุงลาย 100 ตัว จากผลที่ได้จะเห็นว่าอัตราการตายของยุงลายชนิดนี้ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการติดเชื้อเดนโซไวรัสที่ความเข้มข้นต่ำจะไม่แตกต่างกับอัตราการตายของกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ติดเชื้อเดนโซไวรัส คือมีอัตราการตายรวมทุกระยะโดยเฉลี่ยเป็น 23.50% สำหรับกลุ่มที่ติดเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการตายโดยเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมซึ่งเท่ากับ 20% นอกจากนี้จะเห็นว่าจำนวนของยุงลายที่ตายในแต่ละระยะจะไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อและกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 9 แสดงอัตราการตายของยุงลาย *Aedes aegypti* โดยระยะที่เป็นลูกน้ำ ตัวไม่เต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย เมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสสูง คือใช้สารละลายที่มีเชื้อเดนโซไวรัส 100 μl จากลูกน้ำที่ติดเชื้อ 500 ตัวต่อลูกน้ำยุงลาย 100 ตัว จากผลที่ได้จะเห็นว่าอัตราการตายของยุงลายชนิดนี้จะสูงขึ้นมากเมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสสูง โดยมีอัตราการตายรวมทุกระยะโดยเฉลี่ยเป็น 65% สำหรับกลุ่มที่ติดเชื้อ ในขณะที่กลุ่มควบคุมจะมีอัตราการตายโดยเฉลี่ยเป็น 20%

ตารางที่ 10 แสดงอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสของยุงลาย *Aedes aegypti* ในระยะที่เป็นลูกน้ำ ตัวไม่เต็มวัยเพศผู้และเพศเมียเมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสต่างกัน จากผลที่ได้พบว่าอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสรวมทุกระยะของยุงลายชนิดนี้เป็น 60.50% เมื่อใช้ความเข้มข้นต่ำ และ 49.64% เมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสสูง สาเหตุที่อัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสของยุงลายต่ำลงเมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสสูง อาจจะเนื่องมาจากมีลูกน้ำที่ตายลงในระยะแรกๆ จำนวนมากและไม่สามารถนำมาตรวจโดยวิธี PCR ได้ นอกจากนี้ลูกน้ำที่อยู่รอดจนเป็นตัวเต็มวัยส่วนใหญ่อาจจะมีความต้านทานต่อเชื้อเดนโซไวรัส

รูปที่ 22 และ 23 แสดงอัตราการตายสะสมของยุงลาย *Aedes aegypti* เนื่องจากการติดเชื้อเดนโซไวรัสในแต่ละวันในช่วงระยะเวลาประมาณ 1 เดือน โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสต่ำ และกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสสูง จากรูปจะเห็นว่ากลุ่มควบคุมจะมีอัตราการตายสะสมคงที่อยู่ในช่วงประมาณ 10% ส่วนกลุ่มที่ใช้ความ

เข้มข้นของเดนโซไวรัสต่ำจะมีอัตราการตายสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ หลัง 1 สัปดาห์ และเริ่มจะคงที่ อยู่ในช่วงระหว่าง 20% ถึง 30% ภายหลังจาก 3 สัปดาห์ ในขณะที่กลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของเดนโซ ไวรัสสูงจะมีอัตราการตายสะสมสูงขึ้นอย่างเฉียบพลันหลังจาก 1 สัปดาห์ และจะคงที่อยู่ระหว่าง 60% ถึง 70% ภายหลังจาก 2 สัปดาห์

ประสิทธิภาพและความเป็นไปได้ในการใช้เดนโซไวรัสควบคุมยุงลาย *Aedes albopictus*

ตารางที่ 11 แสดงอัตราการตายของยุงลาย *Aedes albopictus* โดยแยกระยะที่เป็นลูกน้ำ ตัวไม่เต็มวัย เพศผู้และเพศเมีย เมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสต่ำ ผลที่ได้จากการทดลอง นี้จะใกล้เคียงกับการทดลองโดยใช้ยุงลาย *Aedes aegypti* นั่นคือ อัตราการตายของยุงลายชนิดนี้ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการติดเชื้อเดนโซไวรัสที่มีความเข้มข้นต่ำจะไม่แตกต่างจากอัตราการตาย ของกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ติดเชื้อเดนโซไวรัส อัตราการตายรวมทุกระยะโดยเฉลี่ยเป็น 14% สำหรับ กลุ่มที่ติดเชื้อ ในขณะที่อัตราการตายของกลุ่มควบคุมเป็น 11.50%

ตารางที่ 12 แสดงอัตราการตายของยุงลาย *Aedes albopictus* โดยแยกระยะที่เป็นลูกน้ำ ตัวไม่เต็มวัย เพศผู้และเพศเมีย เมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสสูง อัตราการตายของยุง ลายชนิดนี้จะเพิ่มสูงขึ้นโดยเฉลี่ยเป็น 71% เมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสสูง ซึ่งค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับ 11.50% ของกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 13 แสดงอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสของยุงลาย *Aedes albopictus* ในระยะที่เป็น ลูกน้ำ ตัวไม่เต็มวัย เพศผู้และเพศเมีย เมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสต่างกัน อัตราการ ติดเชื้อเดนโซไวรัสโดยรวมทุกระยะของยุงลายชนิดนี้จะใกล้เคียงกับยุงลาย *Aedes aegypti* คือมี อัตราการติดเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำเป็น 65.98% และอัตราการติดเชื้อที่ความเข้มข้นสูงเป็น 40.74% ซึ่งอาจจะเกิดจากสาเหตุเดียวกับการทดลองแรก คือการประเมินอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสในลูก น้ำระยะแรกจะทำได้ ในขณะที่ลูกน้ำซึ่งตายในระยะแรกจะมีมากกว่าสำหรับการทดลองที่ใช้ ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสสูง เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสต่ำ นอกจากนี้น้ำลูกน้ำที่สามารถอยู่รอดจนเป็นตัวเต็มวัยอาจมีความต้านทานต่อเชื้อเดนโซไวรัส

รูปที่ 24 และ 25 แสดงอัตราการตายของยุงลาย *Aedes albopictus* เนื่องจากติดเชื้อเดนโซ ไวรัสในแต่ละวันในช่วงระยะเวลาประมาณ 1 เดือน โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ ใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสต่ำ และกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสสูง จากรูปจะเห็นว่า กลุ่มควบคุมจะมีอัตราการตายสะสมคงที่อยู่ระหว่าง 5% ส่วนกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของเดนโซ ไวรัสต่ำจะมีอัตราการตายสะสมอยู่ในช่วงระหว่าง 10% ถึง 15% ภายหลังจาก 2 สัปดาห์ จนกระทั่ง คงที่อยู่ระหว่าง 70% ถึง 80% ในช่วงระยะเวลา 1 เดือน

จากการทดลองดูอัตราการตายของยุงลาย *Aedes aegypti* และ *Aedes albopictus* โดยใช้ความเข้มข้นที่ต่างกัน สามารถสรุปได้ว่าเดนโซไวรัสนั้นสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมยุงลายทั้งสองชนิดได้ แต่จะต้องปรับปริมาณหรือความเข้มข้นของเดนโซไวรัสที่ใช้ในการควบคุมให้พอเหมาะเพื่อให้สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ที่ 4: เพื่อเพิ่มจำนวน (cloning) และศึกษาลำดับ DNA (DNA Sequencing) ของเดนโซไวรัสสายพันธุ์ที่พบในเมืองไทยและเปรียบเทียบกับเดนโซไวรัสสายพันธุ์อื่น ๆ

ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาลำดับ DNA (DNA Sequencing) ของเดนโซไวรัสทำได้โดยการเพิ่มจำนวน (cloning) ผลผลิต PCR ที่ได้จากตัวอย่างของยุงที่มีเชื้อเดนโซไวรัส วิธีการเพิ่มจำนวนทำได้โดยการนำผลผลิต PCR ดังกล่าวปริมาณ 300 µl มาทำให้ตกตะกอนโดยใช้ sodium acetate ในปริมาณ 1 ต่อ 10 ส่วนของผลผลิต PCR และ absolute ethanol ในปริมาณ 2 เท่าของผลผลิต PCR จากนั้นนำมาเชื่อมต่อ (ligate) กับ bluescript - KS phagemid vector ซึ่งถูกตัดให้ขาดออกจากกันโดยใช้ enzyme EcoR V และทำให้ส่วนปลายมีประสิทธิภาพในการเชื่อมกับ DNA Plasmid ของเดนโซไวรัส (T-tailed) โดยใช้วิธีของ Holton และ Graham (1991) การเชื่อมต่อ (ligation) ทำได้โดยใช้ enzyme T4 DNA ligase ที่อุณหภูมิ 15°C หลังจากนั้นจึงนำ bluescript - KS phagemid vector ซึ่งมี DNA plasmid ของเดนโซไวรัสอยู่ด้วยไปใส่ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ชนิด DH 5α เพื่อการแปลงแบคทีเรียชนิดนี้ (transformation) หลังจากนั้นจะนำผลผลิตที่ได้มาหาลำดับของ DNA โดยใช้ Sequenase (version 2.0) (ISB)

สำหรับเดนโซไวรัสที่ตรวจพบในยุงจากท้องที่โดยวิธี PCR จะต้องทดสอบให้แน่ใจก่อนที่จะทำการศึกษาลำดับ DNA โดยนำผลผลิตจาก PCR ที่คาดว่าจะมีเดนโซไวรัสอยู่มาตัดด้วย enzyme Ava II ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำไปทำ DNA eletrophoresis โดยใช้ agarose gel 1.2% ถ้า enzyme Ava II สามารถตัดชิ้นส่วนของเดนโซไวรัสได้จะเห็นเป็น 2 band เมื่อแน่ใจแล้วจึงจะทำการหาลำดับ DNA ต่อไป (รูปที่ 26)

หลังจากที่ได้ลำดับ DNA ของเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยแล้ว จะนำลำดับ DNA เหล่านี้มาหาความสัมพันธ์เปรียบเทียบกับสายวิวัฒนาการกับเดนโซไวรัสของยุงลายสายพันธุ์อื่น ๆ โดยใช้ PAUP (version 3.0)

ผลการวิจัย

ผลจากการหาลำดับ DNA ของเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยซึ่งแยกได้จากยุง *Aedes albopictus* จากจังหวัดกระบี่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 27 เมื่อเปรียบเทียบกับเดนโซไวรัสสายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งมีลำดับ DNA อยู่ใน GenBank ปรากฏว่าเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยมีลำดับ DNA ใกล้เคียงกับเดนโซไวรัสของยุงลายสายพันธุ์อื่น ๆ โดยจะมีลำดับ DNA เหมือนกับเดนโซไวรัสสายพันธุ์จากประเทศรัสเซีย (AeDNV) 76% และเหมือนกับเดนโซไวรัสสายพันธุ์จากประเทศฝรั่งเศส (AaPV) 70% ข้อมูลเปรียบเทียบลำดับ DNA ระหว่างเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยกับสายพันธุ์จากประเทศรัสเซีย (AeDNV) และสายพันธุ์จากประเทศฝรั่งเศส (AaPV) ได้แสดงไว้ในรูปที่ 28 และ 29 ตามลำดับ

รูปที่ 30 แสดงความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการของเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยเมื่อเปรียบเทียบกับเดนโซไวรัสของยุงสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีการรายงานลำดับ DNA ไว้แล้วโดยอาศัย PAUP (version 3.0) จากผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับ DNA นี้พบว่าเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเดนโซไวรัสจากประเทศรัสเซีย (AeDNV) มากกว่าเดนโซไวรัสของยุงสายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งแยกออกมาจาก cell line ของยุงทั้งหมด ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่าเดนโซไวรัสสายพันธุ์ซึ่งแยกมาจาก cell line อาจจะมีการวิวัฒนาการแยกออกไปจากเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยและเดนโซไวรัสสายพันธุ์จากประเทศรัสเซีย (AeDNV) เดนโซไวรัสทั้งสองสายพันธุ์นี้ถูกแยกออกมาจากยุงลายโดยตรงเหมือนกัน จึงมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ

วัตถุประสงค์ที่ 5: เพื่อสำรวจหาเดนโซไวรัสจากยุงชนิดอื่น ๆ ในเมืองไทย โดยอาศัยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction)

ระเบียบวิธีการวิจัย

การสำรวจหาเดนโซไวรัสอย่างต่อเนื่องในพื้นที่พบสายพันธุ์เมืองไทยครั้งแรก

การสำรวจหาเดนโซไวรัสในประชากรธรรมชาติของยุงลายชนิด *Aedes aegypti* กระทำในบริเวณพื้นที่หมู่ 2 ตำบลหัวสำโรง อำเภอแปลงยาว จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยใช้กล่องดักยุงวางในบ้านจำนวน 12 หลังซึ่งกระจายอยู่ทั่วทั้งหมู่บ้าน การสุ่มจับยุงลายในกล่องดักยุงทำได้โดยใช้เครื่องดูดยุงไฟฟ้าดูดยุงจากกล่องดักยุง แล้วถ่ายใส่ในหลอดพลาสติกซึ่งจะส่งมายังห้องปฏิบัติการโดยแช่ในน้ำแข็ง เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการจะต้องแยกยุงลายออกจากยุงชนิดอื่น แล้วจึงนำไปสกัด DNA เพื่อตรวจหาเชื้อเดนโซไวรัสตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

การสำรวจหาเดนโซไวรัสในยุงกลุ่ม Culicine จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

การสำรวจหาเดนโซไวรัสในยุงชนิดอื่น ๆ ทำได้โดยการใช้วิธี PCR ตรวจยุงที่จับได้จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย วิธีการจับยุงตัวเต็มวัยในท้องที่ทำได้โดยการใช้เหยื่อล่อ (human or cow biting) หรือใช้เครื่องดูดยุงเคลื่อนที่ (backpack aspirator) หรือใช้กับดักยุง (CDC light trap) ยุงตัวเต็มวัยที่จับได้จะแยกใส่หลอดขนาดเล็ก เขียนเบอร์ วันที่จับและสถานที่จับ จากนั้นจึงส่งกลับมายังห้องปฏิบัติการโดยใส่ในน้ำแข็งแห้ง ยุงเหล่านี้จะถูกจำแนกชนิดโดยผู้เชี่ยวชาญด้านการจำแนกชนิดยุงที่ AFRIMS ก่อนที่จะนำมาตรวจหาเชื้อเดนโซไวรัส พื้นที่ในการสำรวจคือพื้นที่ 8 แห่งในแต่ละภาคของประเทศไทย

ผลการวิจัย

ตารางที่ 14 แสดงผลการสำรวจหาเดนโซไวรัสในประชากรธรรมชาติของยุงลาย *Aedes aegypti* จากพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งพบสายพันธุ์เมืองไทย (AaDNV) เป็นครั้งแรก จากการสำรวจใช้กับดักยุงในช่วงเดือนเมษายนถึงกันยายน 2538 สามารถสุ่มจับยุงลายจำนวนทั้งหมด 844 ตัว ในจำนวนนี้พบยุงลายที่มีเชื้อเดนโซไวรัสจำนวน 189 ตัว (22.39%) ในช่วงเดือนสิงหาคมและกันยายนจะมีอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสต่ำกว่าเดือนอื่น ๆ คือมีอัตราการติดเชื้อเป็น 6.45% และ 7.97% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับอัตราการติดเชื้อในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนกรกฎาคมซึ่งจะอยู่ระหว่าง 16.29% ถึง 35.06% ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสและจำนวนยุงลายที่สุ่มจับได้ในช่วงนั้นจะแสดงไว้ในรูปที่ 31

การสำรวจหาเดนโซไวรัสในยุงกลุ่ม Culicine ชนิดต่าง ๆ จากต่างภูมิภาคในประเทศไทย จำแนกเป็น 4 genus และ 30 species พบว่ามียุงเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่มีเชื้อเดนโซไวรัสอยู่ตามธรรมชาติ คือ ยุงลายชนิด *Aedes aegypti* และยุงรำคาญชนิด *Culex quinquefasciatus* ตารางที่ 15 แสดงผลการตรวจเชื้อเดนโซไวรัสโดยวิธี PCR ในยุงกลุ่ม Culicine ชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย ตารางที่ 16 แสดงผลการเปรียบเทียบการสำรวจหาเดนโซไวรัสในยุงลายชนิด *Aedes aegypti* และ *Aedes albopictus* จากจังหวัดในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย จากผลที่ได้จะเห็นว่ายุงลายชนิด *Aedes albopictus* ไม่มีเชื้อเดนโซไวรัสอยู่ร่วมด้วยตามธรรมชาติ ในขณะที่ความถี่ในการติดเชื้อเดนโซไวรัสโดยรวมของยุงลาย *Aedes aegypti* จาก 11 จังหวัดจะสูงถึง 44.33% ความถี่ในการตรวจพบเชื้อเดนโซไวรัสในประชากรธรรมชาติของยุง *Culex quinquefasciatus* จากแต่ละภูมิภาคของประเทศไทยได้แสดงไว้ในตารางที่ 17 ความถี่ในการติดเชื้อเดนโซไวรัสโดยรวมของยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* จาก 9 จังหวัดเป็น 21.15%

ถ้าเปรียบเทียบความถี่ในการติดเชื้อเดนโซไวรัสจากแต่ละภูมิภาค พบว่ายุงลาย *Aedes aegypti* มีความถี่ในการติดเชื้อในภาคใต้สูงซึ่งมีความถี่ในการติดเชื้อโดยรวมเป็น 68.97% สำหรับยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* จะมีความถี่ในการติดเชื้อสูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีความถี่โดยรวมเป็น 88% จากผลการสำรวจนี้ทำให้สามารถสันนิษฐานได้ว่ายุงลาย *Aedes aegypti* หรือยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* อาจจะเป็น natural host ของเดนโซไวรัสสายพันธุ์ใหม่

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปสั้น ๆ ได้ดังนี้

1. การติดเชื้อเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทยสามารถกระทำได้ทั้งโดยวิธี oral infection โดยผ่านทางลูกน้ำหรือโดยวิธี intrathoracic inoculation โดยผ่านทางยุงตัวเต็มวัย
2. เมื่อเปรียบเทียบระหว่างยุงลาย 2 ชนิด คือ *Aedes aegypti* และ *Aedes albopictus* พบว่าอัตราการติดเชื้อในยุงลาย *Aedes aegypti* จะสูงกว่ายุงลาย *Aedes albopictus* (80% vs 33.33% และ 25.71% vs 4%) แต่อัตราการตายในยุงลาย *Aedes albopictus* จะสูงกว่ายุงลาย *Aedes aegypti* (82% vs 51%) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการติดเชื้อจะลดลงในยุงลายทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำเชื้อเดนโซไวรัสที่เลี้ยงไว้ใน cell line ของยุงมาใช้ในการทดลอง
3. อัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสในยุงลาย *Aedes aegypti* ต่างสายพันธุ์กันจะไม่แตกต่างกัน อัตราการติดเชื้อโดยเฉลี่ยในยุงลายจากจังหวัดฉะเชิงเทราเป็น 78.21% ในขณะที่อัตราการติดเชื้อโดยเฉลี่ยในยุงลายจากจังหวัดสงขลาเป็น 71% นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการติดเชื้อโดยเฉลี่ยระหว่างยุงลายตัวผู้และตัวเมียก็ไม่แตกต่างกัน (74.65% vs 74.38%)
4. เชื้อเดนโซไวรัสสามารถถ่ายทอดไปในยุงลาย *Aedes aegypti* จากลูกรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งได้ จากการทดลองพบว่าถ้ายุงลายรุ่นพ่อแม่ติดเชื้อโดยวิธี oral infection จะถ่ายทอดไปถึงรุ่นที่ 6 และถ้ายุงลายรุ่นพ่อแม่ติดเชื้อโดยวิธี intrathoracic inoculation จะถ่ายทอดไปถึงรุ่นที่ 5

5. จากการหาลำดับ DNA ของเดนโซไวรัสที่สามารถผ่านไปในยุงลาย *Aedes aegypti* จนถึงรุ่นที่ 6 พบว่าไม่แตกต่างกับลำดับ DNA ของเดนโซไวรัสในรุ่นพ่อแม่ จึงไม่สามารถทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของเดนโซไวรัสที่สามารถผ่านไปในยุงลายหลายรุ่นได้
6. จากการทดลองทำให้ยุงลาย *Aedes aegypti* และยุงลาย *Aedes albopictus* ติดเชื้อเดนโซไวรัสในปริมาณต่ำ พบว่าอัตราการตายจะต่ำ (23.50% ใน *Aedes aegypti* และ 14% ใน *Aedes albopictus*) อัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสจะสูงในรุ่นลูก (60.50% ใน *Aedes aegypti* และ 65.98% ใน *Aedes albopictus*) ซึ่งอาจจะเป็นผลให้มีการถ่ายทอดเชื้อไปได้หลายรุ่นในยุงทั้ง 2 ชนิด
7. จากการทดลองทำให้ยุงลาย *Aedes aegypti* และยุงลาย *Aedes albopictus* ติดเชื้อเดนโซไวรัสในปริมาณสูง พบว่าอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสจะต่ำลงในรุ่นลูก (49.64% ใน *Aedes aegypti* และ 48.74% ใน *Aedes albopictus*) แต่อัตราการตายจะสูง (65% ใน *Aedes aegypti* และ 71% ใน *Aedes albopictus*) จึงมีความเป็นไปได้ในการที่จะนำเดนโซไวรัสไปใช้เป็น biological control agent ของยุงลายทั้ง 2 ชนิด
8. จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธี cloning และการหาลำดับ DNA ของเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทย พบว่ามีลำดับ DNA ใกล้เคียงกับลำดับ DNA ของเดนโซไวรัสสายพันธุ์จากประเทศรัสเซียถึง 76% และจากการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการโดยใช้ PAUP program พบว่ามีสายวิวัฒนาการของลำดับ DNA ใกล้เคียงกันมากกว่าเดนโซไวรัสของยุงสายพันธุ์อื่น ๆ
9. จากการสำรวจหาเดนโซไวรัสในยุงลาย *Aedes aegypti* จากจังหวัดฉะเชิงเทราซึ่งเป็นพื้นที่ที่ได้สุ่มจับยุงลายที่ติดเชื้อเป็นครั้งแรก พบว่าอัตราการติดเชื้อในธรรมชาติโดยเฉลี่ยระหว่างเดือนเมษายนถึงกันยายน 2538 เป็น 22.39% และจากการสำรวจยุงในกลุ่ม culicine จำนวน 30 ชนิด จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่ามียุงที่ติดเชื้อในธรรมชาติเพียง 2 ชนิดคือ ยุงลาย *Aedes aegypti* และยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* โดยที่ยุงลายจะมีอัตราการติดเชื้อสูงในภาคใต้ (68.97%) และยุงรำคาญจะมีอัตราการติดเชื้อสูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (88%) เมื่อเปรียบเทียบกับภาคอื่น ๆ ของประเทศไทย

ตารางที่ 1: แสดงผลเปรียบเทียบการติดเชื้อเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทย (AaDNV) โดยวิธี oral infection ในยุงลายชนิด *Aedes aegypti* และ *Aedes albopictus*

Mosquito Species	Sources of AaDNV	% (No.) Infection of Emerged Adults	% (No.) Mortality
<i>Ae. aegypti</i>	Infected Larvae	80.00 (20/25)	51 (51/100)
<i>Ae. aegypti</i>	Infected Cell Lines	25.71 (9/35)	*
<i>Ae. albopictus</i>	Infected Larvae	33.33 (6/18)	82 (82/100)
<i>Ae. albopictus</i>	Infected Cell Lines	4.00 (2/50)	*

ตารางที่ 2: แสดงผลเปรียบเทียบการติดเชื้อเดนโซไวรัสสายพันธุ์เมืองไทย (AaDNV) ในยุงลายชนิด *Aedes aegypti* ระหว่างเพศผู้และเพศเมียและระหว่างสายพันธุ์ที่ต่างกัน

Mosquito Strains	% (No.) AaDNV Infection		
	Total	Female	Male
Chachoengsao I	73.08 (19/26)	69.23 (9/13)	76.92 (10/13)
Chachoengsao II	83.33 (35/42)	86.36 (19/22)	80.00 (16/20)
Songkha I	62.00 (31/50)	60.98 (25/41)	66.67 (6/9)
Songkha II	80.00 (40/50)	80.95 (34/42)	75.00 (6/8)

ตารางที่ 3: แสดงจำนวนยุงลายชนิด *Aedes aegypti* ตัวแม่ที่ติดเชื้อเดนโซไวรัสซึ่งสามารถออกไข่ที่ฟักได้ตามปกติในแต่ละรุ่นตั้งแต่รุ่นที่ 1 จนถึงรุ่นที่ 10

Generation	Egg-Hatching Female Lines	
	Total No.	Percent
1	18	77.78
2	14	78.57
3	11	90.91
4	10	100.00
5	10	100.00
6	10	100.00
7	10	100.00
8	10	100.00
9	10	100.00
10	10	100.00

ตารางที่ 4: แสดงผลการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อเดนโซไวรัสใน colony ของยุงลาย *Aedes aegypti* ที่ติดเชื้อจากลูกรุ่นที่ 1 และรุ่นต่อ ๆ ไปจนถึงรุ่นที่ 10

Generation	No. of Female Line	% (No.) Transovarial Transmission		
		Total	Female	Male
1	18	57.49 (96/167)	59.78 (55/92)	54.67 (41/75)
2	14	50.00 (90/180)	55.41 (41/74)	46.23 (49/106)
3	11	52.21 (130/249)	48.13 (77/160)	59.55 (53/89)
4	10	54.17 (78/144)	56.94 (41/72)	51.39 (37/72)
5	10	20.83 (30/144)	13.89 (10/72)	27.78 (20/72)
6	10	14.58 (21/144)	13.89 (10/72)	15.28 (11/72)
7	10	0.00 (0/144)	0.00 (0/72)	0.00 (0/72)
8	10	0.00 (0/144)	0.00 (0/72)	0.00 (0/72)
9	10	0.00 (0/144)	0.00 (0/72)	0.00 (0/72)
10	10	0.00 (0/144)	0.00 (0/72)	0.00 (0/72)
Total		27.74 (445/1604)	28.19 (234/830)	27.26 (211/774)

ตารางที่ 5: แสดงอัตราการตายและอัตราการอยู่รอดของยุงลาย *Aedes aegypti* ตัวเต็มวัยเพศเมียหลังจากถูกฉีดเชื้อเดนโรไวรัสความเข้มข้นต่าง ๆ กันเข้าไปที่บริเวณส่วนอกเป็นเวลา 1 เดือน

Virus Concentration	Adult Mortality					% (No.) Survival
	Wk1	Wk2	Wk3	Wk4	Total	
Undiluted Stock	8	0	1	2	11	35.29 (6/17)
10 ⁻¹ Dilution	11	0	1	1	13	23.53 (4/17)
10 ⁻² Dilution	6	3	1	2	12	33.33 (6/18)
10 ⁻³ Dilution	16	1	0	0	17	5.56 (1/18)
10 ⁻⁴ Dilution	6	2	2	0	10	44.44 (8/18)
10 ⁻⁵ Dilution	6	1	0	0	7	46.15 (6/13)
10 ⁻⁶ Dilution	14	0	0	0	14	30.00 (6/20)
10 ⁻⁷ Dilution	10	0	0	0	10	44.44 (8/18)
10 ⁻⁸ Dilution	6	2	1	0	9	50.00 (9/18)
10 ⁻⁹ Dilution	9	0	0	0	9	52.63 (10/19)
Total	92	9	6	5	112	36.78 (64/174)

ตารางที่ 6: แสดงอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสของยุงลาย *Aedes aegypti* ตัวเต็มวัยเพศเมียหลังจากถูกฉีดเชื้อเดนโซไวรัสเข้าไปที่บริเวณส่วนอกเป็นเวลา 1 เดือนโดยใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสต่าง ๆ กัน

Virus Concentration	Adult Infectivity after Virus Innoculation					
	Dead					Survival
	Wk1	Wk2	Wk3	Wk4	% (No.)	% (No.)
Undiluted Stock	2	0	1	1	36.36 (4/11)	100.00 (6/6)
10 ⁻¹ Dilution	2	0	1	0	23.08 (3/13)	50.00 (2/4)
10 ⁻² Dilution	1	2	0	2	41.67 (5/12)	33.33 (2/6)
10 ⁻³ Dilution	4	0	0	0	23.53 (4/17)	0.00 (0/1)
10 ⁻⁴ Dilution	1	1	2	0	40.00 (4/10)	12.50 (1/18)
10 ⁻⁵ Dilution	1	1	0	0	28.57 (2/7)	33.33 (2/6)
10 ⁻⁶ Dilution	1	0	0	0	7.14 (1/14)	100.00 (6/6)
10 ⁻⁷ Dilution	10	0	0	0	20.00 (2/10)	62.50 (5/8)
10 ⁻⁸ Dilution	3	0	0	0	33.33 (3/9)	88.89 (8/9)
10 ⁻⁹ Dilution	0	0	0	0	0.00 (0/9)	52.63 (10/19)
Total	17	4	4	3	25.00 (28/112)	65.63 (42/64)

ตารางที่ 7: แสดงการถ่ายทอดเชื้อเดนโซไวรัสจากยุงลาย *Aedes aegypti* จากลูกรุ่นที่ 1 ไปยังรุ่นต่อ ๆ ไปจนถึงลูกรุ่นที่ 10 หลังจากที่ยุงลายตัวเต็มวัยรุ่นพ่อแม่ถูกฉีดเชื้อเข้าไปที่บริเวณส่วนอก

Generation	No. Tested	% Positive for Densovirus
1	89	83.15
2	100	73.00
3	100	76.00
4	100	26.00
5	100	3.00
6	100	0.00
7	100	0.00
8	100	0.00
9	100	0.00
10	100	0.00

ตารางที่ 8: แสดงอัตราการตายของยุงลาย *Aedes aegypti* โดยแยกระยะที่เป็นลูกน้ำ ตัวโม่ง ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย เมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสดำ (100 μ l ของ สารละลาย 1 ml. ที่มีเชื้อเดนโซไวรัสจากลูกน้ำติดเชื้อ 50 ตัว ต่อลูกน้ำยุงลายระยะ แรก 100 ตัว)

Stages	Control			Treatment		
	Rep. I	Rep. II	Average	Rep. I	Rep. II	Average
No. of Larvae	100	100	100.00	100	100	100.00
Dead Larvae	7	8	7.50	8	11	9.50
No. of Pupae	93	92	92.50	92	89	90.50
Dead Pupae	5	12	8.50	9	9	9.00
Emerged Males	43	29	36.00	34	28	31.00
Dead Males	4	0	2.00	2	0	1.00
Emerged Females	37	51	44.00	39	0	19.50
Dead Females	4	0	2.00	8	0	4.00
Total No. of Dead Mosquitoes	20	20	20.00	27	20	23.50
Total No. of Survived Mosquitoes	80	80	80.00	73	80	76.50

ตารางที่ 9: แสดงอัตราการตายของยุงลาย *Aedes aegypti* โดยแยกระยะที่เป็นลูกน้ำ ตัวโม่ง ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย เมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสสูง (100 μ l ของ สารละลาย 1 ml. ที่มีเชื้อเดนโซไวรัสจากลูกน้ำติดเชื้อ 500 ตัว ต่อลูกน้ำยุงลาย ระยะแรก 100 ตัว)

Stages	Control			Treatment		
	Rep. I	Rep. II	Average	Rep. I	Rep. II	Average
No. of Larvae	100	100	100.00	100	100	100.00
Dead Larvae	7	8	7.50	41	34	37.50
No. of Pupae	93	92	92.50	59	66	62.50
Dead Pupae	5	12	8.50	14	23	18.50
Emerged Males	43	29	36.00	14	17	15.50
Dead Males	4	0	2.00	5	3	4.00
Emerged Females	37	51	44.00	18	21	19.50
Dead Females	4	0	2.00	8	2	5.00
Total No. of Dead Mosquitoes	20	20	20.00	68	62	65.00
Total No. of Survived Mosquitoes	80	80	80.00	32	38	35.00

ตารางที่ 10: แสดงอัตราการติดเชื้อไวรัสของยุงลาย *Aedes aegypti* ในระยะที่เป็นลูกน้ำ ตัวไม่ง ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย เมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสต่างกัน

Stages	Low Concentration*		High Concentration**	
	No. Tested	% (No.) Infection	No. Tested	% (No.) Infection
Dead Larvae	19	94.74 (18)	65	47.69 (31)
Dead Pupae	18	72.22 (13)	39	51.28 (20)
Dead Males	59	42.37 (25)	16	56.25 (9)
Dead Females	61	63.93 (39)	17	42.11 (8)
Total	157	60.50 (95)	137	49.64 (68)

* Low Concentration: approx. 5 infected larvae/100 normal larvae

** High Concentration: approx. 50 infected larvae/100 normal larvae

ตารางที่ 11: แสดงอัตราการตายของยุงลาย *Aedes albopictus* โดยแยกระยะที่เป็นลูกน้ำ ตัวไม่ม้วนตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย เมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสต่ำ (100 μ l ของสารละลาย 1 ml. ที่มีเชื้อเดนโซไวรัสจากลูกน้ำติดเชื้อ 50 ตัว ต่อลูกน้ำยุงลายระยะแรก 100 ตัว)

Stages	Control			Treatment		
	Rep. I	Rep. II	Average	Rep. I	Rep. II	Average
No. of Larvae	100	100	100.00	100	100	100.00
Dead Larvae	1	2	1.50	6	5	5.50
No. of Pupae	99	98	98.50	94	95	94.50
Dead Pupae	7	2	4.50	4	4	4.00
Emerged Males	46	48	47.00	46	41	43.50
Dead Males	3	4	3.50	2	4	3.00
Emerged Females	42	41	41.50	39	46	42.50
Dead Females	1	3	2.00	3	0	1.50
Total No. of Dead Mosquitoes	12	11	11.50	15	13	14.00
Total No. of Survived Mosquitoes	88	89	88.50	85	87	86.00

ตารางที่ 12: แสดงอัตราการตายของยุงลาย *Aedes albopictus* โดยแยกระยะที่เป็นลูกน้ำ ตัวไม่มอดตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย เมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสสูง (100 μ l ของสารละลาย 1 ml. ที่มีเชื้อเดนโซไวรัสจากลูกน้ำติดเชื้อ 500 ตัว ต่อลูกน้ำยุงลายระยะแรก 100 ตัว)

Stages	Control			Treatment		
	Rep. I	Rep. II	Average	Rep. I	Rep. II	Average
No. of Larvae	100	100	100.00	100	100	100.00
Dead Larvae	1	2	1.50	44	50	47.00
No. of Pupae	99	98	98.50	56	50	53.00
Dead Pupae	7	2	4.50	20	11	15.50
Emerged Males	46	48	47.00	11	21	16.00
Dead Males	3	4	3.50	3	4	3.50
Emerged Females	42	41	41.50	15	11	13.00
Dead Females	1	3	2.00	7	3	5.00
Total No. of Dead Mosquitoes	12	11	11.50	74	68	71.00
Total No. of Survived Mosquitoes	88	89	88.50	26	32	29.00

ตารางที่ 13: แสดงอัตราการติดเชื้อเดนโซไวรัสของยุงลาย *Aedes albopictus* ในระยะที่เป็นลูกน้ำ ตัวไม่ ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย เมื่อใช้ความเข้มข้นของเดนโซไวรัสต่างกัน

Stages	Low Concentration*		High Concentration**	
	No. Tested	% (No.) Infection	No. Tested	% (No.) Infection
Dead Larvae	11	36.36 (4)	95	40.00 (38)
Dead Pupae	8	47.50 (7)	22	27.27 (6)
Dead Males	34	64.71 (22)	11	54.54 (6)
Dead Females	44	70.45 (31)	7	71.43 (5)
Total	97	65.98 (64)	135	40.74 (55)

* Low Concentration: approx. 5 infected larvae/100 normal larvae

** High Concentration: approx. 50 infected larvae/100 normal larvae

ตารางที่ 14: แสดงผลการสำรวจหาเดนโซไวรัสในประชากรธรรมชาติของยุงลาย *Aedes aegypti* จากพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทราซึ่งพบสายพันธุ์เมืองไทย (AaDNV) ครั้งแรกระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนกันยายน 2538

Month	% (No.) Natural AaDNV Infection		
	Total	Female	Male
April	22.41 (13/58)	20.00 (3/15)	23.26 (10/43)
May	21.59 (19/88)	11.63 (5/43)	31.11 (14/45)
June	16.29 (36/221)	20.25 (16/79)	14.08 (16/79)
July	35.06 (108/308)	34.44 (31/90)	35.32 (77/218)
August	6.45 (2/31)	0.00 (0/7)	8.33 (2/24)
September	7.97 (11/138)	0.00 (0/39)	11.11 (11/99)
Total	22.39 (189/844)	20.15 (55/273)	25.59 (130/508)