

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับความสนับสนุนจากทุนพัฒนานักวิจัย ฝ่ายวิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณคณาจารย์และบุคลากรของหน่วยประสิทธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือทางห้องปฏิบัติการ รวมทั้งขอขอบคุณ ดร.อุษาวดี ถาวรระ และทีมงานจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง รวมทั้งขอขอบคุณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาสำหรับการศึกษานี้ และขอขอบคุณนิตระดับปริญญาบัณฑิตและบัณฑิตศึกษา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มีส่วนร่วมในโครงการศึกษานี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA5680030

ชื่อโครงการ: ความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารและศักยภาพของยุงในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สนธยา เตียวศิริทรัพย์

หน่วยประสิทธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ระยะเวลาโครงการ: วันที่ 17 มิถุนายน 2556 ถึงวันที่ 16 มิถุนายน 2559

ศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงและศักยภาพของยุงในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ทำการศึกษาแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวนที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและยุงที่จับมาจากพื้นที่จังหวัดต่าง ๆ โดยวิธีทางแบคทีเรียและอณูชีววิทยา แบคทีเรียที่พบในยุงลายสวนที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ *Agrobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pandora*, *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* สำหรับแบคทีเรียที่พบในยุงที่จับมาจากพื้นที่จังหวัดต่าง ๆ ได้แก่ *Singh*, *Chum* และ *Yella* นั้นก็พบว่ามีจำนวนและความหลากหลายเช่นเดียวกับยุงที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และทำการศึกษการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในยุงลายสวน โดยพบว่าร้อยละของการติดเชื้อในตัวยุง (infection) ในช่องว่างของร่างกายยุง (dissemination) และในน้ำลายของยุง (transmission) เป็น 83%, 71% และ 42% หลังจากได้รับเชื้อในปริมาณ 10^2 CID₅₀/ml ร้อยละของการติดเชื้อในตัวยุง ช่องว่างของร่างกายยุง และน้ำลายของยุง เป็น 90%, 87% และ 70% หลังจากได้รับเชื้อในปริมาณ 10^3 CID₅₀/ml ร้อยละของการติดเชื้อในตัวยุง ช่องว่างของร่างกายยุง และน้ำลายของยุง เป็น 100%, 100% และ 100% หลังจากได้รับเชื้อในปริมาณ 10^4 CID₅₀/ml ร้อยละของการติดเชื้อในตัวยุง ช่องว่างของร่างกายยุง และน้ำลายของยุง เป็น 100%, 90% และ 90% หลังจากได้รับเชื้อในปริมาณ 10^5 CID₅₀/ml และร้อยละของการติดเชื้อในตัวยุง ช่องว่างของร่างกายยุง และน้ำลายของยุง เป็น 100%, 100% และ 100% หลังจากได้รับเชื้อในปริมาณ 10^6 CID₅₀/ml และได้ทำการศึกษาความแตกต่างของแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อภายหลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในปริมาณที่แตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่าหลังจากที่ยุงได้รับเชื้อในปริมาณ 10^2 CID₅₀/ml นั้นพบว่ายุงที่มีการติดเชื้อไวรัสจะพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Arthrobacter*, *Corynebacterium* และ *Staphylococcus* ส่วนยุงที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสนั้นจะพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ในยุงได้รับเชื้อในปริมาณ 10^3 CID₅₀/ml นั้นพบว่ายุงที่มีการติดเชื้อไวรัสจะพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Acinetobacter* ส่วนยุงที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสนั้นไม่พบว่ามีแบคทีเรีย ในยุงได้รับเชื้อในปริมาณ 10^4 CID₅₀/ml นั้นพบว่ายุงที่มีการติดเชื้อไวรัสจะพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ส่วนยุงที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสนั้นไม่พบว่ามีแบคทีเรีย ในยุงได้รับเชื้อในปริมาณ 10^5 CID₅₀/ml นั้นพบว่ายุงที่มีการติดเชื้อไวรัสนั้นไม่พบว่ามีแบคทีเรีย ส่วนยุงที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสนั้น

พบว่าแบคทีเรียสกุล *Corynebacterium* และ *Staphylococcus* ในยุงได้รับเชื้อในปริมาณ 10^6 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ นั้นพบว่ายุงมีการติดเชื้อไวรัสจะพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Moraxella*, *Sinomonas* และ *Staphylococcus* ส่วนยุงที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสนั้นจะพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Actinomyces*, *Brachybacterium* และ *Staphylococcus*.

คำหลัก: ยุงพาหะนำโรค แบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร เชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

Abstract

Project Code: RSA5680030

Project Title: Correlation between mosquito midgut microbiota and mosquito vector competence for Chikungunya virus

Investigator: Associate Professor Dr. Sonthaya Tiawsirisup

Parasitology Unit, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

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

Project Period: 17 June 2013 - 16 June 2016

The correlation between mosquito midgut microbiota and mosquito vector competence for Chikungunya virus (CHIKV) were investigated. Midgut microbiota of laboratory rearing and field collected *Aedes albopictus* were identified by using bacteriological and molecular techniques. *Agrobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*, and *Staphylococcus* were identified from laboratory rearing *Ae. albopictus*. Different bacterial genera were also identified from field collected mosquitoes from Singha, Chumphon, and Yala province. CHIKV infection in *Ae. albopictus* were conducted in this study. Percent infection, dissemination, and transmission in *Ae. albopictus* were 83, 71, and 42%, respectively after taking the blood meal with 10^2 CID₅₀/ml of CHIKV. Percent infection, dissemination, and transmission in *Ae. albopictus* were 90, 87, and 70%, respectively after taking the blood meal with 10^3 CID₅₀/ml of CHIKV. Percent infection, dissemination, and transmission in *Ae. albopictus* were 100, 100, and 100%, respectively after taking the blood meal with 10^4 CID₅₀/ml of CHIKV. Percent infection, dissemination, and transmission in *Ae. albopictus* were 100, 90, and 90%, respectively after taking the blood meal with 10^5 CID₅₀/ml of CHIKV. Percent infection, dissemination, and transmission in *Ae. albopictus* were 100, 100, and 100%, respectively after taking the blood meal with 10^6 CID₅₀/ml of CHIKV. The differences of bacteria diversity between infected and non-infected *Ae. albopictus* were studied. After taking the blood meal with 10^2 CID₅₀/ml of CHIKV, the midgut bacteria found in infected mosquitoes were *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, and *Staphylococcus* and the midgut bacteria found in non-infected mosquitoes was *Staphylococcus*. After taking the blood meal with 10^3 CID₅₀/ml of CHIKV, the midgut bacteria found in infected mosquitoes was *Acinetobacter* and no midgut bacteria was found in non-infected mosquitoes. After taking the blood meal with 10^4 CID₅₀/ml of CHIKV, the midgut bacteria found in infected mosquitoes was *Staphylococcus* and no midgut bacteria was found in non-infected mosquitoes. After taking the blood meal with 10^5 CID₅₀/ml of CHIKV, no midgut

bacteria was found in infected mosquitoes and the midgut bacteria found in non-infected mosquitoes were *Corynebacterium* and *Staphylococcus*. After taking the blood meal with 10^6 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ of CHIKV, the midgut bacteria found in infected mosquitoes were *Moraxella*, *Sinomonas*, and *Staphylococcus* and the midgut bacteria found in non-infected mosquitoes were *Actinomyces*, *Brachybacterium*, and *Staphylococcus*.

Keywords: Mosquito vector, Midgut microbiota, Chikungunya virus

เนื้อหาทางวิจัย

บทนำ

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya virus) เป็นเชื้อที่มีอยู่เป็นแมลงพาหะนำโรคโดยจัดว่าเป็นโรคอุบัติซ้ำ (re-emerging infectious disease) สำหรับประเทศไทยเนื่องจากโรคนี้เคยมีการระบาดมาก่อนในประเทศไทยและได้กลับมาระบาดอีกครั้งในปัจจุบัน โดยพบว่าในบางพื้นที่นั้นโรคมีความรุนแรงมากขึ้นกว่าในอดีต เชื้อไวรัสสามารถพบได้ในประเทศต่างๆ ในทวีปแอฟริกาและเอเชีย วัฏจักรการถ่ายทอดของเชื้อนี้เกี่ยวข้องกับคนติดเชื้อ สัตว์ติดเชื้อ และยุงพาหะนำโรค ยุงที่ทำหน้าที่เป็นพาหะนำโรคและเอื้อให้เชื้อมีการเพิ่มจำนวนที่สำคัญคือยุงลาย อย่างไรก็ตามยุงชนิดอื่นก็อาจจะทำหน้าที่เป็นพาหะนำโรคและเอื้อให้เชื้อมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อได้เช่นกัน การศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพของยุงชนิดต่างๆ ในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสนี้ยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาก่อให้เกิดอัตราการตายต่ำแต่อัตราการติดเชื้อสูงในคน อาการที่พบในผู้ป่วยติดเชื้อ ได้แก่ การมีผื่นแดง ไข้ และการปวดตามข้อต่างๆ ซึ่งส่งผลต่อการดำเนินชีวิตของผู้ป่วยสามารถพบเชื้อนี้ในกระแสเลือดของผู้ป่วยประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากที่ได้รับเชื้อ แต่เชื้อในกระแสเลือดของผู้ป่วยนั้นมีปริมาณที่สูงมากพอที่จะก่อให้เกิดการติดเชื้อในยุงหลังจากที่ยุงมาดูดเลือดจากผู้ป่วยได้ และทำให้ยุงกลายเป็นพาหะที่สามารถนำเชื้อได้ เชื้อไวรัสนี้ไม่ได้รับความสนใจมาเป็นเวลานาน แต่เชื้อนี้ได้กลับมาระบาดใหม่ในหลายพื้นที่ในหลายประเทศตั้งแต่ประมาณปี พ.ศ. 2543 การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเชื้อ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของนิเวศวิทยาของยุงอาจจะเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการระบาดของเชื่อนี้มากขึ้น เชื้อไวรัสชิคุนกุนยานี้ได้เกิดการอุบัติซ้ำในประเทศไทยโดยที่ได้เกิดการระบาดของเชื่อนี้ในเขตพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยในระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2551 และได้เกิดการระบาดของเชื่อนี้ไปยังพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2551 พบว่ามีผู้ป่วยเป็นจำนวนประมาณ 2,433 คน ในปี พ.ศ. 2552 พบว่ามีผู้ป่วยเป็นจำนวนประมาณ 49,069 คน และในปี พ.ศ. 2553 พบว่ามีผู้ป่วยเป็นจำนวนประมาณ 1,533 คน

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่ได้เกิดการระบาดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2551 นั้นมีลักษณะและคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับเชื้อได้เกิดการระบาดในประเทศอินเดียในปี พ.ศ. 2550 และเชื้อที่ได้เกิดการระบาดในประเทศสิงคโปร์ในปี พ.ศ. 2551 นอกเหนือไปจากคนติดเชื้อแล้วนั้น ยังพบว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอาจจะมีบทบาทที่สำคัญในนิเวศวิทยาของเชื่อนี้ในธรรมชาติ และเนื่องจากในปัจจุบันนี้การเดินทางระหว่างประเทศต่างๆ สามารถเกิดขึ้นได้ในระยะเวลาอันสั้นซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการระบาดของเชื้อต่างๆ ได้ในระยะเวลาอันสั้น แม้ว่าสถานการณ์ของการระบาดของเชื่อนี้ในประเทศไทยได้เบาบางลงแต่อย่างไรก็ตามประชาชนและเจ้าหน้าที่ทางสาธารณสุขยังคงต้องให้ความสำคัญกับเชื่อนี้ซึ่งอาจจะเกิดการระบาดขึ้นอีกครั้งในอนาคต

ปัจจัยที่มีผลต่อการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในยุงนั้นมีหลายปัจจัยด้วยกัน ปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายในของยุงล้วนส่งผลต่อศักยภาพของยุงในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ศักยภาพของยุงในการเป็นพาหะของเชื้อยังขึ้นถึงความสามารถของยุงพาหะในการได้รับเชื้อ เอื้อให้เชื้อเกิดการพัฒนา

และสามารถส่งผ่านเชื้อจากโฮสต์หนึ่งไปสู่อีกโฮสต์หนึ่งได้ ศักยภาพของยุงในการเป็นพาหะของเชื้อจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของยุง รวมทั้งยังอาจแตกต่างกันระหว่างยุงของพื้นที่ต่างๆ อีกด้วย นอกจากนี้ปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อศักยภาพของยุงในการเป็นพาหะของเชื้อคือปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ความถี่ของของโฮสต์และยุงที่จะมีโอกาสได้มาเจอกัน และปริมาณของยุงในแต่ละพื้นที่

ยุงแต่ละชนิดจะมีศักยภาพในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่แตกต่างกัน และยุงบางชนิดเท่านั้นที่มีศักยภาพในการเป็นพาหะของเชื้อ การติดเชื้อในยุงจะเกิดขึ้นเมื่อยุงไปดูดเลือดจากคนหรือสัตว์ติดเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งคนติดเชื้อที่มีระดับของเชื้อในกระแสเลือดที่สูง เชื้อจะเข้าไปเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุง และเชื้อจะเคลื่อนที่และไปเพิ่มจำนวนอีกครั้งในต่อมน้ำลายของยุง โดยจะพบเชื้อเป็นจำนวนมากในต่อมน้ำลายของยุงและยุงจะถ่ายทอดเชื้อในระหว่างที่ไปดูดเลือดจากโฮสต์ถัดไป แม้ว่ายุงแต่ละตัวจะได้รับเชื้อในปริมาณที่เท่ากันแต่การพัฒนาและเพิ่มจำนวนของเชื้อในยุงแต่ละตัวนั้นจะแตกต่างกันไป รวมทั้งยุงแต่ละตัวก็จะมีปริมาณของเชื้อในน้ำลายที่แตกต่างกันและจะมีความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อที่แตกต่างกัน

การติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในยุงแต่ละชนิดและจากแต่ละพื้นที่ของประเทศไทยอาจจะแตกต่างกันซึ่งมีความจำเป็นอย่างยิ่งต้องทำการศึกษาและต้องทำความเข้าใจเพื่อก่อให้เกิดความเข้าใจในนิเวศวิทยาของเชื้อนี้ รวมทั้งปัจจัยต่างๆ ที่จะมีผลต่อศักยภาพของยุงในการเป็นพาหะของเชื้อนี้ในประเทศไทย ความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของยุงและศักยภาพของยุงในการเป็นพาหะของเชื้อในประเทศไทยมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการศึกษา การติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาและเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของยุงของประเทศไทยได้ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้ ผลผลิตที่ได้จากการศึกษานี้จะมีบทบาทที่สำคัญในการอธิบายถึงการระบาดของเชื้อนี้ในประเทศไทย รวมถึงการวางแผนในการป้องกันและควบคุมโรคเพื่อลดอัตราการติดเชื้อในคนรวมทั้งลดอัตราการสูญเสียทางเศรษฐกิจในอนาคต ผลผลิตที่ได้จากการศึกษานี้ไม่เพียงแต่จะสามารถอธิบายถึงนิเวศวิทยาของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาเท่านั้นแต่ยังสามารถช่วยอธิบายถึงนิเวศวิทยาของเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่มียุงเป็นพาหะในการนำโรคอีกด้วย

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน ยุงลายบ้าน และยุงรำคาญ

1.1 ตัวอย่างยุง

ยุงลายสวน

ทำการศึกษแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ที่จับมาจากจังหวัดสิงห์บุรี 10 ตัวอย่าง อำเภอบะพือ จังหวัดชุมพร 16 ตัวอย่าง อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร 18 ตัวอย่าง จังหวัดยะลา 28 ตัวอย่าง และยุงลายสวนที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ 28 ตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างยุงจากพื้นที่นั้นทำโดยใช้กับดักยุงชนิด BG-Sentinel mosquito trap (Biogents®, Germany)

ยุงลายบ้าน

ทำการศึกษแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) โดยประกอบไปด้วยยุงจำนวน 2 กลุ่ม คือยุงที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และยุงที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ การเก็บตัวอย่างยุงจากพื้นที่นั้นทำโดยใช้กับดักยุงชนิด BG-Sentinel mosquito trap (Biogents®, Germany) โดยเก็บยุงจาก 2 พื้นที่ในกรุงเทพมหานคร คือ เขตสวนหลวงและเขตหลักสี่ ซึ่งจำนวนตัวอย่างยุงที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้ ยุงลายบ้านที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ 16 ตัวอย่าง ยุงลายบ้านจากพื้นที่เขตสวนหลวง 5 ตัวอย่าง ยุงลายบ้านจากพื้นที่เขตหลักสี่ 7 ตัวอย่าง ยุงลายจากอำเภอบะพือ จังหวัดชุมพร จำนวน 2 ตัวอย่าง และจากอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร จำนวน 4 ตัวอย่าง

ยุงรำคาญ

ทำการศึกษแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) โดยประกอบไปด้วยยุงจำนวน 2 กลุ่ม คือยุงที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และยุงที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ การเก็บตัวอย่างยุงจากพื้นที่นั้นทำโดยใช้กับดักยุงชนิด BG-Sentinel mosquito trap (Biogents®, Germany) โดยเก็บยุงจาก 2 พื้นที่ในกรุงเทพมหานคร คือ เขตสวนหลวงและเขตหลักสี่ ซึ่งจำนวนตัวอย่างยุงที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้ ยุงรำคาญที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ 11 ตัวอย่าง ยุงรำคาญจากพื้นที่เขตสวนหลวง 10 ตัวอย่าง และยุงรำคาญจากพื้นที่เขตหลักสี่ 11 ตัวอย่าง

1.2 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางแบคทีเรียวิทยาในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยูง

นำตัวอย่างยูงมาศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางด้วยวิธีทางแบคทีเรียวิทยา โดยการทำให้ยูงตายโดยใช้ความเย็น แล้วนำยูงที่ได้มาล้างในอัลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 5 นาที และนำมาล้างด้วย phosphate buffer saline (pH 7.0) (Gonzalez-Ceron et al., 2003) หลังจากนั้นทำการฆ่าและเอาส่วนของระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยูงออกมาและนำมาบดในสารละลาย glycerol ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 60 จำนวน 300 ไมโครลิตร และเก็บตัวอย่างที่ได้ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำตัวอย่างที่ได้มาทำการศึกษาต่อไป

นำตัวอย่างทางเดินอาหารของยูงจำนวน 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA ที่ผสมด้วยเลือดแกะร้อยละ 5 และจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด McConkey แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นศึกษาลักษณะและจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งทำการย้อมเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ออกมาย้อมสีเพื่อศึกษาชนิดแกรมของเชื้อแบคทีเรีย (gram staining)

ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ได้โดยการ cấyจากโคโลนีเดี่ยวๆ แล้วนำไปป้ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียอีกครั้งเพื่อเตรียมไปสกัดสารพันธุกรรม (DNA) โดยการ cấyโคโลนีเดี่ยวๆ จำนวน 1 โคโลนีใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB broth) จำนวน 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้เขย่า (shaker incubator) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อดังกล่าวไปสกัดสารพันธุกรรม และเพิ่มจำนวนด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา (PCR) ต่อไปเพื่อให้สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้อย่างถูกต้อง

1.3 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยูงโดยวิธีทางอณูชีววิทยา

ทำการแยกสารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างแบคทีเรียโดยการต้ม โดยนำแบคทีเรียที่เพิ่มปริมาณใน LB broth มาปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้มาล้างในน้ำกลั่นและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงละลายตะกอนในน้ำกลั่นจำนวน 40 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำแข็งและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดูดเก็บส่วนใสด้านบน (สารพันธุกรรม) และเก็บตัวอย่างของสารพันธุกรรมที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจหาชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

ทำการตรวจหาชนิดของเชื้อแบคทีเรีย (16 s rRNA) จากตัวอย่างที่สกัดได้ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยที่ใช้วิธี PCR จำนวน 2 ปฏิกริยา ซึ่งใช้ primer ที่มีลำดับเบสที่แตกต่างกัน จำนวน 2 คู่ และทำการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

วิธี PCR ปฏิกริยาที่ 1

Primer ที่ใช้คือ 16 s-F 5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' และ 16 s-R 5'-GCT ACC TTG TTA CGA CTT C-3' (Dinparast Djadid et al., 2011) โดยในปฏิกริยาประกอบไปด้วยตัวอย่างสารพันธุกรรม (template DNA) จำนวน 1.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (Platinum Taq DNA polymerase high fidelity, Invitrogen) จำนวน 0.2 ไมโครลิตร 10X PCR buffer จำนวน 2.5 ไมโครลิตร 10 mM dNTP จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 50 mM MgSO₄ จำนวน 1 ไมโครลิตร Forward primer จำนวน 1 ไมโครลิตร หรือ 10 µM Reverse primer จำนวน 1 ไมโครลิตร หรือ 10 µM และน้ำกลั่นจำนวน 17.3 ไมโครลิตร

การศึกษานี้ประกอบไปด้วยขั้นตอน initial denaturation ภายใต้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตามด้วยขั้นตอน PCR amplification ซึ่งจะแบ่งเป็นการทำ ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ขั้นตอน คือ ภายใต้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงเปลี่ยนเป็นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วินาที และที่ภายใต้อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที 30 วินาที โดยในขั้นตอนนี้จะทำด้วยกันทั้งหมด 35 รอบ ขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ซึ่งจะทำภายใต้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วจึงลดอุณหภูมิลงเหลือที่ 4 องศาเซลเซียส และคงไว้ที่อุณหภูมินั้นก็ได้เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาผสมกับ loading buffer (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen, USA) จำนวน 6 ไมโครลิตร และนำส่วนผสมดังกล่าวที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร มาผ่านกระบวนการ electrophoresis ที่ระดับไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นระยะเวลา 40 นาที โดยใช้ agarose (Ultrapure agarose, Invitrogen, USA) ที่มีระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน TAE buffer โดยที่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 1.5 kilobase pairs และนำไปศึกษาถึงลำดับเบส (DNA sequencing) เพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียต่อไป

วิธี PCR ปฏิกริยาที่ 2

Primer ที่ใช้คือ forward primer 63f 5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3' และ reverse primer 1387r 5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3' (Marchesi et al., 1998) โดยในปฏิกริยาประกอบไปด้วยตัวอย่างสารพันธุกรรม (template DNA) จำนวน 1.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (Platinum Taq DNA polymerase high fidelity, Invitrogen) จำนวน 0.2 ไมโครลิตร 10X

PCR buffer จำนวน 2.5 ไมโครลิตร 10 mM dNTP จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 50 mM MgSO₄ จำนวน 1 ไมโครลิตร Forward primer จำนวน 1 ไมโครลิตร หรือ 10 μM Reverse primer จำนวน 1 ไมโครลิตร หรือ 10 μM และน้ำกลั่นจำนวน 17.3 ไมโครลิตร

การศึกษานี้ประกอบไปด้วยขั้นตอน initial denaturation ภายใต้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตามด้วยขั้นตอน PCR amplification ซึ่งจะแบ่งเป็นการทำ ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ขั้นตอน คือ ภายใต้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้ว จึงเปลี่ยนเป็นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที และที่ภายใต้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที 30 วินาที โดยในขั้นตอนนี้จะทำด้วยกันทั้งหมด 30 รอบ ขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ซึ่งจะทำการภายใต้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วจึงลดอุณหภูมิลงเหลือที่ 4 องศาเซลเซียส และคงไว้ที่อุณหภูมินั้นก็จะได้เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาผสมกับ loading buffer (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen, USA) จำนวน 6 ไมโครลิตร และนำส่วนผสมดังกล่าวที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร มาผ่านกระบวนการ electrophoresis ที่ระดับไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นระยะเวลา 40 นาที โดยใช้ agarose (Ultrapure agarose, Invitrogen, USA) ที่มีระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน TAE buffer โดยที่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 1.3 kilobase pairs และนำไปศึกษาถึงลำดับเบส (DNA sequencing) เพื่อป่งชี้ชนิดของแบคทีเรียต่อไป

2. การศึกษาการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในหนูไมซ์ชนิด BALB/c และชนิด ICR

เนื่องจากคณะผู้วิจัยมีความต้องการที่จะใช้หนูทดลองเป็นแหล่งของเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพของยุงลายสวนในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา จึงได้ทำการศึกษาถึงระดับของเชื้อในหนูทดลองว่ามีความเป็นไปได้หรือไม่ที่จะใช้หนูทดลองติดเชื้อเป็นแหล่งของเชื้อในการทดลองถัดไป การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 13310043

2.1 เชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่จะนำมาใช้ในการศึกษานี้เป็นเชื้อไวรัสที่ได้มาจากผู้ป่วยในประเทศไทยในระหว่างที่เกิดการระบาดของเชื้อในปี พ.ศ. 2553 (Thailand 2010 strain Chikungunya virus) และได้นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของหน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 สัตว์ทดลอง

ทำการฉีดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาให้กับหนูไมซ์ชนิด BALB/c และชนิด ICR หลังจากนั้นในแต่ละวันได้ทำการเจาะเลือดจากหนูและตรวจหาการติดเชื้อและปริมาณของเชื้อในกระแสเลือดของหนู โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การศึกษาที่ 1

ทำการฉีดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาปริมาณ 0.2 มิลลิตร เข้าช่องท้องของหนูไมซ์ชนิด BALB/c และชนิด ICR โดยความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้คือ $10^{5.6}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ และทำการตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดของหนูทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน นับจากวันที่ฉีดเชื้อ โดยตรวจหาเชื้อด้วยวิธี RT-PCR และ immunocytochemistry

การศึกษาที่ 2

ทำการฉีดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาปริมาณ 0.2 มิลลิตร เข้าช่องท้องของหนูไมซ์ชนิด BALB/c โดยความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้คือ $10^{6.5}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ และทำการตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดของหนูทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน นับจากวันที่ฉีดเชื้อ โดยตรวจหาเชื้อด้วยวิธี RT-PCR และ Immunocytochemistry

การศึกษาที่ 3

ทำการศึกษาผลของ dexamethasone ต่อการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในหนูไมซ์ชนิด ICR โดยที่แบ่งหนูไมซ์อายุ 4 สัปดาห์ ออกเป็นสองกลุ่ม หนูกลุ่มที่ 1 จะได้รับน้ำเกลือ (normal saline) จำนวน 0.1 มิลลิตร ฉีดเข้าช่องท้อง เป็นเวลา 14 วันก่อนที่จะได้รับเชื้อ ส่วนหนูกลุ่มที่ 2 จะได้รับ dexamethasone จำนวน 100 ไมโครกรัม (0.1 มิลลิตร) ฉีดเข้าช่องท้อง เป็นเวลา 14 วันก่อนที่จะได้รับเชื้อ หลังจากนั้นทำการฉีดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาปริมาณ 0.2 มิลลิตร เข้าช่องท้องของหนูไมซ์ โดยความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้คือ $10^{7.0}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ และทำการตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดของหนูทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน นับจากวันที่ฉีดเชื้อ โดยตรวจหาเชื้อด้วยวิธี RT-PCR และ immunocytochemistry

2.3 การตรวจหาเชื้อโดยวิธีทางไวรัสวิทยา

ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสในซีรัมของหนูไมซ์โดยการนำตัวอย่างที่ได้มาเพาะเลี้ยงใน Vero cell และทำการย้อมเซลล์เพื่อตรวจหาการติดเชื้อในเซลล์ด้วยวิธี immunocytochemistry การย้อมเซลล์สามารถทำได้โดยการ fix เซลล์ด้วย 4 % formaldehyde เป็นเวลาอย่างน้อย 25 นาที และล้างด้วย PBS-tween 0.5% จำนวน 3 ครั้ง ทำการผสม mouse monoclonal anti-chikungunya virus antibody กับ 1% BSA (bovine serum albumin ละลายใน PBS-tween 0.5%) ในอัตราส่วน 1:100 และเติม

antibody ลงใน 96 well ที่มีเซลล์อยู่ จำนวนหลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะบดสารออกแล้วล้างด้วย PBS-tween 0.5% จำนวน 3 ครั้ง

ผสม conjugate mouse anti- IgG กับ 1% BSA ในอัตราส่วน 1:300 แล้วเติมลงไปเซลล์ใน 96 well จำนวนหลุมละ 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะบดสารออกแล้วล้างด้วย PBS-tween 0.5% จำนวน 3 ครั้ง

ผสม substrate AEC ซึ่งประกอบไปด้วยสารละลาย AEC จำนวน 0.25 มิลลิลิตร สารละลาย acetate buffer จำนวน 4.75 มิลลิลิตร และ 30% H_2O_2 จำนวน 5 ไมโครลิตร และหยดลงไปเซลล์ใน 96 well จำนวนหลุมละ 50 ไมโครลิตร และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะบดสารละลายออก แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าจำนวน 3 ครั้ง สะบัดเพลาแล้วนำไปผึ่งให้แห้ง นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.4 การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธีทางอณูชีววิทยา

ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสในซีรัมของหนูไม่ซีโดยการนำตัวอย่างที่ได้มาเพาะเลี้ยงใน Vero cell หลังจากนั้นทำการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างนำเลี้ยงเซลล์ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสสำเร็จรูป (viral nucleic acid extraction kit, Geneaid, Taiwan) เก็บตัวอย่างของสารพันธุกรรมที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสชนิดคุณกุนยาในตัวอย่างที่สกัดได้ทำโดยใช้วิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Primer ที่ใช้ในการศึกษาคือ DVRChk-R 5'GGGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA3' และ DVRChk-F 5'ACCGGCGTCTACCCATTCATGT3' (Naresh Kumar et al., 2007) โดยในปฏิกิริยาประกอบไปด้วยตัวอย่างสารพันธุกรรมจำนวน (template RNA) 1.5 ไมโครลิตร 2X reaction mix (dNTP 0.4 mM, $MgSO_4$ 3.2 mM) (Invitrogen, USA) จำนวน 12.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นจำนวน 8 ไมโครลิตร SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen, USA) จำนวน 1 ไมโครลิตร Forward และ Reverse primer อย่างละจำนวน 1 ไมโครลิตร (10 μ M) อุณหภูมิของปฏิกิริยา RT-PCR ได้พัฒนาจากวิธีของ Naresh Kumar และคณะ (2007) และ Theamboonlers และคณะ (2009) การศึกษานี้ประกอบไปด้วย ขั้นตอน cDNA synthesis ภายใต้อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นเป็นขั้นตอน denaturation ภายใต้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และตามด้วยขั้นตอน PCR amplification ซึ่งจะแบ่งเป็นการทำภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ขั้นตอน คือ ภายใต้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วจึงเปลี่ยนเป็นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 45 วินาที และที่ภายใต้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที โดยในขั้นตอนนี้จะทำด้วยกันทั้งหมด 35 รอบ ขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ซึ่งจะทำภายใต้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วจึงลดอุณหภูมิลงเหลือที่ 4 องศาเซลเซียส และคงไว้ที่อุณหภูมินั้นก็จะได้เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product)

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้นำมาผสมกับ loading buffer (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen, USA) จำนวน 6 ไมโครลิตร และนำส่วนผสมดังกล่าวที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร มาผ่านกระบวนการ electrophoresis ที่ระดับไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นระยะเวลา 40 นาที โดยใช้ agarose (Ultrapure agarose, Invitrogen, USA) ที่มีระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน TAE buffer โดยที่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 330 base pairs

3. การศึกษาความสัมพันธ์ของชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของยุงลายสวนและศักยภาพของยุงลายสวนในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

3.1 เชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาที่จะนำมาใช้ในการศึกษานี้เป็นเชื้อไวรัสที่ได้มาจากผู้ป่วยในประเทศไทยในระหว่างที่เกิดการระบาดของเชื้อในปี พ.ศ. 2553 (Thailand 2010 strain Chikungunya virus) และได้นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของหน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสชิคุนกุนยาจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ตัวอย่างยุง

ทำการศึกษาศักยภาพของยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา โดยใช้ยุงลายสวนที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของหน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการปล่อยให้ยุงลายสวนที่มีอายุประมาณ 7-10 วัน ได้รับเชื้อผ่านทาง artificial membrane feeder โดยภายในอุปกรณ์นี้จะมีของเหลวที่ประกอบไปด้วยเลือดแกะ 20% fetal bovine serum 1% sucrose และเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของ artificial membrane feeder

ทำการตรวจหาการติดเชื้อในยุงในวันที่ 14 ภายหลังจากการได้รับเชื้อ โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำลายจากยุง (รูปที่ 2) หลังจากนั้นทำการฆ่าและเอาส่วนลำตัวและส่วนขาออกมาเพื่อทำการตรวจหาเชื้อไวรัส และทำการฆ่าและเอาส่วนของระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงออกมา (รูปที่ 3) และนำมาบดในสารละลาย glycerol ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 60 จำนวน 300 ไมโครลิตร และเก็บตัวอย่างที่ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำตัวอย่างที่ได้มาทำการศึกษาหาเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารต่อไป

การตรวจหาเชื้อในส่วนลำตัว ส่วนขา และน้ำลายของยุง สามารถทำได้โดยการบดส่วนดังกล่าวใน 2% FBS-MEM จำนวน 500 ไมโครลิตร และหลังจากนั้นนำไปกรองผ่านฟิวเตอร์ที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปลงใน Vero cell ที่ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ภายใน 96-well plate หลังจากนั้นทำการตรวจการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ (cytopathic effect; CPE) ภายใน 72-96 ชั่วโมง และศึกษาการติดเชื้อในเซลล์โดยใช้วิธี immunocytochemistry (ICC) และวิธีทางอณูชีววิทยา



รูปที่ 2 แสดงการเก็บตัวอย่างน้ำลายจากยุง



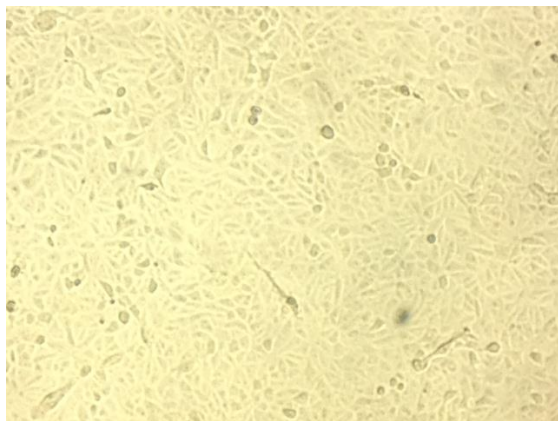
รูปที่ 3 แสดงการฆ่าและเอาส่วนของระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงออกมา

3.3 การตรวจหาเชื้อโดยวิธีทางไวรัสวิทยา

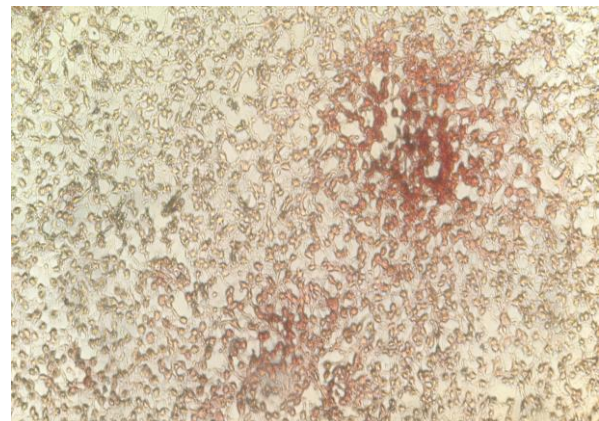
ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในส่วนลำตัว ส่วนขา และน้ำลายของยุง โดยการนำตัวอย่างที่ได้มาเพาะเลี้ยงใน Vero cell และทำการย้อมเซลล์เพื่อตรวจหาการติดเชื้อในเซลล์ด้วยวิธี immunocytochemistry (ICC) ซึ่งสามารถทำได้โดยการ fix เซลล์ด้วย 4 % formaldehyde เป็นเวลาอย่างน้อย 25 นาที และล้างด้วย PBS-tween 0.5% จำนวน 3 ครั้ง ทำการผสม mouse monoclonal anti-chikungunya virus antibody กับ 1% BSA (bovine serum albumin ละลายใน PBS-tween 0.5%) ในอัตราส่วน 1:100 และเติม antibody ลงใน 96 well ที่มีเซลล์อยู่ จำนวนหลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หลังจากนั้นสับัดสารออกแล้วล้างด้วย PBS-tween 0.5% จำนวน 3 ครั้ง

ผสม conjugate mouse anti- IgG กับ 1% BSA ในอัตราส่วน 1:300 แล้วเติมลงไปในเซลล์ใน 96 well จำนวนหลุมละ 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นสับัดสารออกแล้วล้างด้วย PBS-tween 0.5% จำนวน 3 ครั้ง

ผสม substrate AEC ซึ่งประกอบไปด้วยสารละลาย AEC จำนวน 0.25 มิลลิลิตร สารละลาย acetate buffer จำนวน 4.75 มิลลิลิตร และ 30% H_2O_2 จำนวน 5 ไมโครลิตร และหยดลงไปในเซลล์ใน 96 well จำนวนหลุมละ 50 ไมโครลิตร และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นสับัดสารละลายออก แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าจำนวน 3 ครั้ง สะบัดเพลาแล้วนำไปผึ่งให้แห้ง นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยพบว่าเซลล์ที่มีการติดเชื้อจะติดสีแดง (รูปที่ 4)



Vero cell ที่ไม่มีการติดเชื้อ



Vero cell ที่มีการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

รูปที่ 4 แสดงลักษณะของ Vero cell ที่ไม่มีการติดเชื้อและมีการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา

3.4 การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธีทางอณูชีววิทยา

ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสในส่วนลำตัว ส่วนขา และน้ำลายของยุง โดยการนำตัวอย่างที่ได้มาเพาะเลี้ยงใน Vero cell หลังจากนั้นทำการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสสำเร็จรูป (viral nucleic acid extraction kit, Geneaid, Taiwan) เก็บตัวอย่างของสารพันธุกรรมที่ได้ไว้ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสชนิดนกุนยาในตัวอย่างที่สกัดได้ทำโดยใช้วิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Primer ที่ใช้ในการศึกษาคือ DVRChk-R 5'GGGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA3' และ DVRChk-F 5'ACCGGCGTCTACCCATTCATGT3' (Naresh Kumar et al., 2007) โดยในปฏิกิริยาประกอบไปด้วยตัวอย่างสารพันธุกรรมจำนวน (template RNA) 1.5 ไมโครลิตร 2X reaction mix (dNTP 0.4 mM, MgSO₄ 3.2 mM) (Invitrogen, USA) จำนวน 12.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นจำนวน 8 ไมโครลิตร SuperScript III RT/Platinum Taq Mix (Invitrogen, USA) จำนวน 1 ไมโครลิตร Forward และ Reverse primer อย่างละจำนวน 1 ไมโครลิตร (10 µM) อุณหภูมิของปฏิกิริยา RT-PCR ได้พัฒนาจากวิธีของ Naresh Kumar และคณะ (2007) และ Theamboonlers และคณะ (2009) การศึกษานี้ประกอบไปด้วย ขั้นตอน cDNA synthesis ภายใต้อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นเป็นขั้นตอน denaturation ภายใต้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และตามด้วยขั้นตอน PCR amplification ซึ่งจะแบ่งเป็นการทำภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ขั้นตอน คือ ภายใต้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วจึงเปลี่ยนเป็นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 45 วินาที และที่ภายใต้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที โดยในขั้นตอนนี้จะทำด้วยกันทั้งหมด 35 รอบ ขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ซึ่งจะทำภายใต้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วจึงลดอุณหภูมิลงเหลือที่ 4 องศาเซลเซียส และคงไว้ที่อุณหภูมินั้นก็จะได้เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product)

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้นำมาผสมกับ loading buffer (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen, USA) จำนวน 6 ไมโครลิตร และนำส่วนผสมดังกล่าวที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร มาผ่านกระบวนการ electrophoresis ที่ระดับไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นระยะเวลา 40 นาที โดยใช้ agarose (Ultrapure agarose, Invitrogen, USA) ที่มีระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน TAE buffer โดยที่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 330 base pairs

3.5 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงโดยวิธีทางแบคทีเรียวิทยา

นำตัวอย่างยุงมาศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางด้วยวิธีทางแบคทีเรียวิทยา โดยการฆ่าและเอาส่วนของระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงออกมาและนำมาบดในสารละลาย

glycerol ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 60 จำนวน 300 ไมโครลิตร และเก็บตัวอย่างที่ได้ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำตัวอย่างที่ได้มาทำการศึกษาต่อไป

นำตัวอย่างทางเดินอาหารของยุงจำนวน 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA ที่ผสมด้วยเลือดแกะร้อยละ 5 และจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด McConkey แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นศึกษาลักษณะและจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งทำการเขียนเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ออกมาย้อมสีเพื่อศึกษาชนิดแกรมของเชื้อแบคทีเรีย (gram staining)

ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ได้โดยการเขียนจากโคโลนีเดี่ยวๆ แล้วนำไปป้ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียอีกครั้งเพื่อเตรียมไปสกัดสารพันธุกรรม (DNA) โดยการเขียนโคโลนีเดี่ยวๆ จำนวน 1 โคโลนีใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (LB broth) จำนวน 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้เขย่า (shaker incubator) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อดังกล่าวไปสกัดสารพันธุกรรม และเพิ่มจำนวนด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา (PCR) ต่อไปเพื่อให้สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้อย่างถูกต้อง

3.6 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางอนุชีววิทยาในระบบทางเดินอาหารของยุง

ทำการแยกสารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างแบคทีเรียโดยการต้ม โดยนำแบคทีเรียที่เพิ่มปริมาณใน LB broth มาปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้มาล้างในน้ำกลั่นและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงละลายตะกอนในน้ำกลั่นจำนวน 40 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำแข็งและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดูดเก็บส่วนใสด้านบน (สารพันธุกรรม) และเก็บตัวอย่างของสารพันธุกรรมที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจหาชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

ทำการตรวจหาชนิดของเชื้อแบคทีเรีย (16 s rRNA) จากตัวอย่างที่สกัดได้ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยที่ใช้วิธี PCR จำนวน 2 ปฏิกริยา ซึ่งใช้ primer ที่มีลำดับเบสที่แตกต่างกัน จำนวน 2 คู่ และทำการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

วิธี PCR ปฏิกริยาที่ 1

Primer ที่ใช้คือ 16 s-F 5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' และ 16 s-R 5'-GCT ACC TTG TTA CGA CTT C-3' (Dinparast Djadid et al., 2011) โดยในปฏิกริยาประกอบไปด้วยตัวอย่างสารพันธุกรรม (template DNA) จำนวน 1.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (Platinum Taq DNA polymerase high fidelity, Invitrogen) จำนวน 0.2 ไมโครลิตร 10X PCR buffer จำนวน 2.5 ไมโครลิตร

10 mM dNTP จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 50 mM MgSO₄ จำนวน 1 ไมโครลิตร Forward primer จำนวน 1 ไมโครลิตร หรือ 10 µM Reverse primer จำนวน 1 ไมโครลิตร หรือ 10 µM และน้ำกลั่นจำนวน 17.3 ไมโครลิตร

การศึกษานี้ประกอบไปด้วยขั้นตอน initial denaturation ภายใต้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตามด้วยขั้นตอน PCR amplification ซึ่งจะแบ่งเป็นการทำ ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ขั้นตอน คือ ภายใต้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงเปลี่ยนเป็นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วินาที และที่ภายใต้อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที 30 วินาที โดยในขั้นตอนนี้จะทำด้วยกันทั้งหมด 35 รอบ ขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ซึ่งจะทำภายใต้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วจึงลดอุณหภูมิลงเหลือที่ 4 องศาเซลเซียส และคงไว้ที่อุณหภูมินั้นก็จะได้เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product)

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้นำมาผสมกับ loading buffer (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen, USA) จำนวน 6 ไมโครลิตร และนำส่วนผสมดังกล่าวที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร มาผ่านกระบวนการ electrophoresis ที่ระดับไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นระยะเวลา 40 นาที โดยใช้ agarose (Ultrapure agarose, Invitrogen, USA) ที่มีระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน TAE buffer โดยที่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 1.5 kilobase pairs และนำไปศึกษาถึงลำดับเบส (DNA sequencing) เพื่อป่งชี้ชนิดของแบคทีเรียต่อไป

วิธี PCR ปฏิกริยาที่ 2

Primer ที่ใช้คือ forward primer 63f 5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3' และ reverse primer 1387r 5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3' (Marchesi et al., 1998) โดยในปฏิกริยาประกอบไปด้วยตัวอย่างสารพันธุกรรม (template DNA) จำนวน 1.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (Platinum Taq DNA polymerase high fidelity, Invitrogen) จำนวน 0.2 ไมโครลิตร 10X PCR buffer จำนวน 2.5 ไมโครลิตร 10 mM dNTP จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 50 mM MgSO₄ จำนวน 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น

การศึกษานี้ประกอบไปด้วยขั้นตอน initial denaturation ภายใต้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตามด้วยขั้นตอน PCR amplification ซึ่งจะแบ่งเป็นการทำ ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ขั้นตอน คือ ภายใต้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงเปลี่ยนเป็นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที และที่ภายใต้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที 30 วินาที โดยในขั้นตอนนี้จะทำด้วยกันทั้งหมด 30 รอบ ขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ซึ่งจะทำภายใต้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วจึงลดอุณหภูมิลงเหลือที่ 4 องศาเซลเซียส และคงไว้ที่อุณหภูมินั้นก็จะได้เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product)

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้นำมาผสมกับ loading buffer (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen, USA) จำนวน 6 ไมโครลิตร และนำส่วนผสมดังกล่าวที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร มาผ่านกระบวนการ electrophoresis ที่ระดับไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นระยะเวลา 40 นาที โดยใช้ agarose (Ultrapure agarose, Invitrogen, USA) ที่มีระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน TAE buffer โดยที่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 1.3 kilobase pairs และนำไปศึกษาถึงลำดับเบส (DNA sequencing) เพื่อป้องกันชนิดของแบคทีเรียต่อไป

เอกสารอ้างอิงสำหรับระเบียบวิธีวิจัย

- Dinparast Djadid N, Jazayeri H, Raz A, Favia G, Ricci I, Zakeri S (2011) Identification of the midgut microbiota of *An. stephensi* and *An. maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria. PLoS One 6(12):e28484 doi:10.1371/journal.pone.0028484
- Gonzalez-Ceron, L., Santillan, F., Rodriguez, M.H., Mendez, D., Hernandez-Avila, J.E., 2003, Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. J Med Entomol 40, 371-374.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Donell, N.R., Janda, W.M., Sommers, H.M. and Winn, W.C. 1985. Color atlas and textbook of diagnosis microbiology. 3rd edit. Lippincott, Philadelphia, PA.
- Krieg, N.R. and Holt, J.G. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore, MD.
- Marchesi JR, et al. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 64(2):795-9
- Naresh Kumar, C.V.M., Anthony Johnson, A.M. and Sai Gopal, D.V.R. 2007. Molecular characterization of Chikungunya virus from Andhra Pradesh, India & phylogenetic relationship with Central African isolates. Indian J Med Res. 126: 534-540.
- Pumpuni, C.B., Demaio, J., Kent, M., Davis, J.R., Beier, J.C., 1996, Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on *Plasmodium* sporogonic development. Am J Trop Med Hyg 54, 214-218.
- Theamboonlers, A., Rianthavorn, P., Praianantathavorn, K., Wuttirattanakowit, N. Poovorawan, Y. 2009. Clinical and molecular characterization of Chikungunya virus in South Thailand. Jpn J Infect Dis. 62: 303-305.

ผลการทดลอง

1. การศึกษาชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน ยุงลายบ้าน และยุงรำคาญ

ชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน

ทำการศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่จับมาจากจังหวัดสิงห์บุรี จำนวน 10 ตัวอย่าง ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะ คุณสมบัติ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่จับมาจากจังหวัดสิงห์บุรี

ตัวอย่างยุง	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (ต่อยุง)	ชนิดของแกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.1	Circular rough pulvinate and stringy	3	บวก	<i>Bacillus subtilis</i>
	Circular smooth transparency (ไม่สามารถ subculture)	3	-	-
	Circular smooth opaque	3	ลบ	<i>Serratia marcescens</i>
	Circular smooth transparency (ไม่สามารถ subculture)	6	-	-
No.2	ไม่พบเชื้อ	-	-	-
No.3	ไม่พบเชื้อ	-	-	-
No.4	Circular smooth translucent	66	ลบ	<i>Staphylococcus hominis</i>
No.5	ไม่พบเชื้อ	-	-	-
No.6	Circular smooth transparency	294	ลบ	-
	Circular smooth opaque	249	บวก	-
	Circular smooth translucent	3	บวก	-
No.7	ไม่พบเชื้อ	-	-	-
No.8	ไม่พบเชื้อ	-	-	-
No.9	ไม่พบเชื้อ	-	-	-
No.10	Circular smooth opaque	1	บวก	<i>Bacillus spp.</i>

ทำการศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่จับมาจากอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร จำนวน 16 ตัวอย่าง ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะ คุณสมบัติ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่จับมาจากอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร

ตัวอย่างยุง	โคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (ต่อยุง)	ชนิดของแบคทีเรีย
No.1	Type 1.2	15	-
	Type 1.3	120	-
	Type 1.4	114	-
	Type 1.5	12	-
No.2	Type 2.1	3	-
	Type 2.3	87	-
No.3	Type 3.1	>2,000	-
	Type 3.2	>2,000	-
No.4	Type 4.1	15	-
	Type 4.1	12	-
	Type 4.3	438	-
	Type 4.4	756	-
	Type 4.5	12	-
No.5	Type 5.1	246	-
	Type 5.1	18	-
	Type 5.3	3	-
No.6	Type 6.2	15	<i>Microbacterium</i> spp.
No.7	Type 7.1	156	-
No.8	-	-	-
No.9	Type 9.1	3	-

ตารางที่ 2 (ต่อ) ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่จับมาจากจังหวัดชุมพร

ตัวอย่างยุง	โคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (ต่อยุง)	ชนิดของแบคทีเรีย
No.10	Type 10.1	279	-
	Type 10.2	273	-
	Type 10.3	3,336	-
No.11	Type 11.1	51	-
	Type 11.2	9	-
No.12	Type 12.1	3	-
	Type 12.2	96	-
No.13	-	-	-
No.14	-	-	-
No.15	-	-	-
No.16	Type 16.1	3	-
	Type 16.2	2,391	-

ทำการศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่จับมาจากอำเภอลำสนธิ จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 18 ตัวอย่าง ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะ คุณสมบัติ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่จับมาจากอำเภอลำสนธิ จังหวัดฉะเชิงเทรา

ตัวอย่าง ยุง	โคโลนีของ แบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของ แบคทีเรีย (ต่อยุง)	ชนิดของ แกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.1	Type 1.1	3	ลบ	<i>Acinetobacter</i> spp.
	Type 1.2	3	ลบ	<i>Chryseobacterium</i> spp.
	Type 1.3	9	ลบ	<i>Providencia</i> spp.
No.2	Type 3.1	3	ลบ	<i>Providencia</i> spp.
	Type 3.2	3	บวก	<i>Micrococcus</i> spp.
	Type 3.3	6	บวก	-
No.3	Type 3.1	3	ลบ	<i>Pantoea dispersa</i>
	Type 3.2	3	ลบ	<i>Providencia</i> spp.
No.4	Type 4.1	3	ลบ	<i>Erwinia</i> spp.
No.5	Type 5.1	135	-	-
	Type 5.2	228	ลบ	-
No.6	Type 6.1	-	-	-
No.7	Type 7.1	-	-	-
No.8	Type 8.1	3	บวก	<i>Microbacterium</i> spp.
No.9	Type 9.1	-	-	-
No.10	Type 10.1	12	ลบ	-
No.11	Type 11.1	18	ลบ	<i>Pseudomonas</i> spp.
No.12	Type 12.1	3	ลบ	<i>Acinetobacter</i> spp.
	Type 12.2	6	บวก	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
No.13	Type 13.1	3	ลบ	<i>Pseudomonas</i> spp.
	Type 13.2	9	ลบ	-
No.14	Type 14.1	6	ลบ	<i>Pseudomonas</i> spp.
No.15	Type 15.1	-	-	-

ตารางที่ 3 (ต่อ) ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่จับมาจากอำเภอลำสนธิ จังหวัดฉะเชิงเทรา

ตัวอย่าง ยุง	โคโลนีของ แบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของ แบคทีเรีย (ต่อยุง)	ชนิดของ แกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.16	Type 16.1	3	ลบ	-
	Type 16.2	24	ลบ	-
	Type 16.3	24	ลบ	-
No.17	Type 17.1	15	ลบ	<i>Providencia</i> spp.
	Type 17.2	15	บวก	<i>Micrococcus</i> spp.
No.18	Type 18.1	3	บวก	<i>Micrococcus</i> spp.

ทำการศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่จับมาจากจังหวัดยะลา จำนวน 28 ตัวอย่าง ที่จับมาจากจังหวัดยะลา ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะคุณสมบัติ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่จับมาจากจังหวัดยะลา

ตัวอย่างยุง	โคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (ต่อยุง)	ชนิดของแกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.1	Type 1.1	5	ลบ	<i>Rahnella aquatilis</i>
	Type 1.2	546	ลบ	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
No.2	-	-	-	-
No.3	Type 3.1	3	ลบ	<i>Agrobacterium</i> spp.
	Type 3.2	3	ลบ	<i>Sphingomonas sanguinis</i>
No.4	Type 4.1	6	ลบ	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	Type 4.2	9	บวก	<i>Brachybacterium nesterenkovi</i>
No.5	Type 5.1	3	ลบ	<i>Rhizobium pusense</i>
No.6	-	-	-	-
No.7	Type 7.1	3	ลบ	<i>Agrobacterium</i> spp.
	Type 7.2	6	ลบ	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
	Type 7.3	3	บวก	<i>Microbacterium aoyamense</i>
	Type 7.4	3	ลบ	<i>Acinetobacter radioresisten</i>
No.8	-	-	-	-
No.9	Type 9.1	3	ลบ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
No.10	Type 10.1	3	ลบ	<i>Brevundimonas aurantiaca</i>
No.11	Type 11.1	3	บวก	<i>Bacillus pumilus</i>
No.12	-	-	-	-
No.13	Type 13.1	9	ลบ	<i>Rhizobium pusense</i>
No.14	Type 14.1	3	ลบ	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
No.15	Type 15.1	3	ลบ	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
No.16	-	-	-	-
No.17	Type 7.1	3	ลบ	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
No.18	Type 18.1	3	บวก	<i>Micrococcus luteus</i>
	Type 18.2	3	ลบ	<i>Sphingomonas sanguinis</i>
No.19	Type 19.1	18	ลบ	<i>Massilia oculi</i>
	Type 19.2	3	ลบ	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

ตารางที่ 4 (ต่อ) ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่จับมาจากจังหวัดยะลา

ตัวอย่าง ยุง	โคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี ของแบคทีเรีย (ต่อยุง)	ชนิดของ แกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.20	Type 20.1	6	ลบ	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	Type 20.2	3	ลบ	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
No.21	Type 21.1	3	ลบ	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	Type 21.2	9	ลบ	<i>Rhizobium pusense</i>
	Type 21.3	3	บวก	<i>Nocardioides zeae</i>
No.22	Type 22.1	3	ลบ	<i>Burkholderia anthina</i>
	Type 22.2	3	ลบ	-
No.23	-	-	-	
No.24	Type 24.1	9	ลบ	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
No.25	-	-	-	-
No.26	-	-	-	-
No.27	-	-	-	-
No.28	-	-	-	-

ทำการศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จำนวน 28 ตัวอย่าง ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะ คุณสมบัติ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างยุง	โคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (ต่อยุง)	ชนิดของแบคทีเรีย
No.1	Type 1.1	92	<i>Micrococcus</i> spp.
	Type 1.2	130	-
	Type 1.3	12	<i>Staphylococcus hominis</i>
No.2	Type 2.1	86	<i>Staphylococcus</i> spp.
	Type 2.2	32	<i>Micrococcus</i> spp.
No.3	Type 3.1	292	<i>Micrococcus</i> spp.
	Type 3.2	14	<i>Micrococcus</i> spp.
No.4	Type 4.1	38	<i>Staphylococcus hominis</i>
	Type 4.2	12	<i>Micrococcus</i> spp.
No.5	Type 5.1	16	<i>Micrococcus</i> spp.
	Type 5.2	10	<i>Pandoraea</i> spp.
No.6	Type 6.1	24	<i>Micrococcus</i> spp.
No.7	Type 7.1	16	<i>Staphylococcus hominis</i>
	Type 7.2	10	<i>Micrococcus</i> spp.
No.8	Type 8.1	14	<i>Staphylococcus</i> spp.
	Type 8.2	2	<i>Staphylococcus hominis</i>
No.9	Type 9.1	12	<i>Pseudomonas</i> spp.
	Type 9.2	4	<i>Klebsiella pneumonia</i>
No.10	-	-	-
No.11	-	-	-
No.12	Type 12.1	36	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	Type 12.2	57	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ) ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างยุง	โคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (ต่อยุง)	ชนิดของแบคทีเรีย
No.13	Type 13.1	57	-
	Type 13.2	717	-
No.14	Type 14.1	21	-
No.15	-	-	-
No.16	Type 16.1	9	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	Type 16.2	3	<i>Staphylococcus spp.</i>
No.17	-	-	-
No.18	-	-	-
No.19	-	-	-
No.20	-	-	-
No.21	-	-	-
No.22	Type 22.1	333	-
	Type 22.2	60	-
No.23	-	-	-
No.24	Type 24.1	234	-
	Type 24.2	66	-
No.25	Type 25.1	189	-
	Type 25.2	93	-
	Type 25.3	63	-
No.26	Type 26.1	180	<i>Staphylococcus spp.</i>
	Type 26.2	3	-
No.27	Type 27.2	66	-
No.28	Type 28.2	513	-
	Type 28.3	3	-

ชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายบ้าน

ศึกษาชนิดและจำนวนของแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) การศึกษาประกอบไปด้วยยุงจำนวน 2 กลุ่ม คือยุงที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ยุงที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในกรุงเทพมหานครจำนวน 2 พื้นที่ คือ เขตสวนหลวงและเขตหลักสี่ และยุงจากพื้นที่จังหวัดชุมพร ทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียของแต่ละตัวอย่างโดยใช้วิธีทางแบคทีเรียวิทยาและอนุชีววิทยา

การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากยุงลายบ้านที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจำนวน 16 ตัวอย่าง พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 12 สกุล ได้แก่ *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Chryseomicrobium*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* เชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุดที่ยุงลายบ้านที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ คือ สกุล *Microbacterium*

การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากยุงลายบ้านที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในกรุงเทพมหานครเขตสวนหลวงจำนวน 5 ตัวอย่าง พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 3 สกุล ได้แก่ *Bacillus*, *Micrococcus* และ *Staphylococcus* เชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุดที่ยุงลายบ้านที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในเขตสวนหลวง กรุงเทพมหานคร คือ สกุล *Micrococcus* และ *Staphylococcus*

การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากยุงลายบ้านที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในกรุงเทพมหานครเขตหลักสี่จำนวน 7 ตัวอย่าง พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 7 สกุล ได้แก่ *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Staphylococcus* และ *Streptococcus* เชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุดที่ยุงลายบ้านที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในเขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร คือ สกุล *Staphylococcus*

การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากยุงลายบ้านที่สุ่มจับมาจากพื้นที่อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพรจำนวน 2 ตัวอย่าง พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 1 สกุล คือ *Moraxella*

การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากยุงลายบ้านที่สุ่มจับมาจากพื้นที่อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพรจำนวน 4 ตัวอย่าง พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 2 สกุล คือ *Providencia* และ *Pseudomonas*

การศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes aegypti* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จำนวน 16 ตัวอย่าง ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะ คุณสมบัติ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างยุง	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี ของแบคทีเรีย	ชนิดของ แกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.1	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.	8	บวก	<i>Microbacterium imperiale</i>
No.2	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1	บวก	<i>Enterobacter hormaechei</i>
No.3	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม.	2	ลบ	<i>Pantoea agglomerans</i>
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	3	บวก	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	สีขาว ผิวด้านแบน ของไม่เรียบ และแผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม.	2	ลบ	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
	สีครีม ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	3	ไม่สามารถ ระบุได้	ให้ผลลบ
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม.	2	บวก	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
No.4	ใส ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	4	ไม่สามารถ ระบุได้	ให้ผลลบ
No.5	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	2	บวก	<i>Bacillus spp.</i>
No.6	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	3	บวก	<i>Microbacterium imperiale</i>
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	3	บวก	<i>Microbacterium laevaniformans</i>
No.7	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มม.	1	บวก	<i>Dietzia cinnamea</i>
No.8	สีครีม ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มม.	14	บวก	<i>Microbacterium laevaniformans</i>
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มม.	5	ลบ	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>
	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1	ลบ	<i>Chryseomicrobium imtechense</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ) ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายบ้าน
Aedes aegypti ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างยุง	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี ของแบคทีเรีย	ชนิดของ แกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.9	สีเหลือง ผิวด้านนูน ขอบเรียบ ไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.	2	บวก	-
	ใส ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่	3	บวก	-
No.10	ใส ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	3	บวก	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>
No.11	ใส ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 มม.	12	บวก	<i>Cellulomonas hominis</i>
No.12	ใส ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 0.1 มม.	29	ไม่สามารถ ระบุได้	-
	สีขาว ผิวด้านแบน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม.	1	ลบ	-
No.13	สีครีม ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2 มม. อี โมไลซิส	2	บวก	<i>Staphylococcus aureus</i>
	สีเหลือง ผิวด้านแบน ขอบไม่ เรียบและไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1	ไม่สามารถ ระบุได้	-
	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม.	17	บวก	<i>Staphylococcus aureus</i>
	สีเหลือง ผิวด้านแบน ขอบเรียบ และยกขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม.	1	บวก	<i>Pseudomonas luteola</i>
No.14	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม.	142	บวก	<i>Microbacterium laevaniformans</i>
No.15	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม. อีโมไลซิส	18	บวก	<i>Staphylococcus hominis</i>
No.16	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม. อีโมไลซิส	13	บวก	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>

การศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes aegypti* ที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในเขตสวนหลวง กรุงเทพมหานคร จำนวน 5 ตัวอย่าง ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะคุณสมบัติ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในเขตสวนหลวง กรุงเทพมหานคร

ตัวอย่างยุง	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย	ชนิดของแกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.1	สีขาว ผิวด้านนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มม.	1	บวก	-
No.2	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.	1	บวก	<i>Staphylococcus spp.</i>
No.3	ใสมีจุดสีม่วงอยู่ตรงกลางขุ่นและขอบใส ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.	0	ลบ	-
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1	บวก	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	ใส ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	2	บวก	<i>Micrococcus chenggongense</i>
No.4	สีขาว ผิวด้านแบน ขอบไม่เรียบและไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ฮีโมไลซิส	28	ลบ	<i>Bacillus spp.</i>
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบไม่เรียบและแผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มม. ฮีโมไลซิส	1	บวก	<i>Bacillus licheniformis</i>
	สีขาว ผิวด้านแบน ขอบไม่เรียบและไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มม. ฮีโมไลซิส	4	บวก	<i>Bacillus safensis</i>
No.5	สีเหลือง ผิวด้านนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1	บวก	<i>Micrococcus luteus</i>

การศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes aegypti* ที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในกรุงเทพมหานคร เขตหลักสี่ จำนวน 7 ตัวอย่าง ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะ คุณสมบัติ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในเขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร

ตัวอย่างยุง	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย	ชนิดของแกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.1	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบไม่เรียบ ไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม.	5	บวก	<i>Micrococcus</i> spp.
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม.	11	ลบ	<i>Moraxella osloensis</i>
No.2	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1	บวก	<i>Microbacterium</i> spp.
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 มม.	2	บวก	<i>Staphylococcus</i> spp.
No.3	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1	บวก	<i>Cellulomonas hominis</i>
No.4	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	2	บวก	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
No.5	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	2,500	บวก	<i>Staphylococcus warneri</i>
	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม.	700	บวก	<i>Neisseria flavescens</i>
	ใส ผิววาวแบน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 มม. ฮีโมไลซิส	2,900	บวก	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
No.6	สีครีม ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 มม.	1	ไม่สามารถระบุได้	-
No.7	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม. ฮีโมไลซิส	15	บวก	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 มม.	26	บวก	<i>Staphylococcus hominis</i>

การศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ที่จับมาจากอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร จำนวน 2 ตัวอย่าง ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะ คุณสมบัติ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ที่สุ่มจับมาจากพื้นที่อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร

ตัวอย่างยุง	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย	ชนิดของแกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.1	Type 1.1	12	บวก	-
No.2	Type 2.1	6	ลบ	<i>Moraxella</i> spp.

การศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes aegypti* ที่จับมาจากอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร จำนวน 4 ตัวอย่าง ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะ คุณสมบัติ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่จับมาจากอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร

ตัวอย่างยุง	โคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (ต่อยุง)	ชนิดของแกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.1	Type 1.1	12	ลบ	<i>Psuedomonas</i> spp.
No.2	Type 2.1	6	บวก	<i>Providencia</i> spp.
	Type 2.2	6	บวก	<i>Providencia rettgeri</i>
No.3	Type 3.1	-	-	-
No.4	Type 4.1	3	ลบ	-
	Type 4.2	237	ลบ	-

ชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงรำคาญ

ศึกษาชนิดและจำนวนแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) โดยประกอบไปด้วยยุงจำนวน 2 กลุ่ม คือยุงที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และยุงที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในกรุงเทพมหานครจำนวน 2 พื้นที่ คือ เขตสวนหลวงและเขตหลักสี่ โดยทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียของแต่ละตัวอย่างโดยใช้วิธีทางแบคทีเรียวิทยาและอนุชีววิทยา

การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากยุงรำคาญที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจำนวน 11 ตัวอย่าง พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 5 สกุล ได้แก่ *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุด ในยุงรำคาญที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ คือ สกุล *Staphylococcus*

จากการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากยุงรำคาญที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในเขตสวนหลวง กรุงเทพมหานคร จำนวน 10 ตัวอย่าง พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 6 สกุล ได้แก่ *Chryseobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Providencia* และ *Staphylococcus* โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุด ในยุงรำคาญที่สุ่มจับมาจากพื้นที่เขตสวนหลวง คือ สกุล *Micrococcus*

จากการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากยุงรำคาญที่สุ่มจับมาจากพื้นที่เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร จำนวน 11 ตัวอย่าง พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 11 สกุล ได้แก่ *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* และ *Staphylococcus* พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุด ในยุงรำคาญที่สุ่มจับมาจากพื้นที่เขตหลักสี่ คือ สกุล *Staphylococcus*

การศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จำนวน 11 ตัวอย่าง ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะ คุณสมบัติ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ แสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างยุง	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย	ชนิดของแกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.1	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 มม.	70	ลบ	-
No.2	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	35	บวก	<i>Micrococcus</i> spp.
No.3	สีขาว ผิววาวแบน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มม. ฮีโมไลซิส	11	บวก	<i>Staphylococcus</i> spp.
	สีเหลือง ผิววาวแบน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. ฮีโมไลซิส	2	บวก	-
	สีเหลืองเข้ม ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.	1	บวก	<i>Micrococcus</i> spp.
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม.	40	บวก	<i>Microbacterium</i> spp.
No.4	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	9	บวก	<i>Microbacterium</i> spp.
	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม.	1	บวก	<i>Staphylococcus</i> spp.
No.5	สีขาว ผิววาวนูน ขอบไม่เรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1	บวก	<i>Staphylococcus</i> spp.
No.6	สีขาว ผิววาวแบน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มม.	2	บวก	<i>Paenibacillus</i> spp.
	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มม.	140	บวก	<i>Microbacterium</i> spp.
No.7	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม.	1	บวก	<i>Microbacterium</i> spp.

ตารางที่ 11 (ต่อ) ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงรำคาญ
Culex quinquefasciatus ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างยุง	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี ของแบคทีเรีย	ชนิดของ แกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.8	สีขาว ผิววาวแบน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มม.	3	บวก	<i>Paenibacillus</i> spp.
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบและ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	62	บวก	<i>Microbacterium</i> spp.
No.9	สีขาว ผิววาวแบน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. อีโมไลซิส	5	บวก	<i>Staphylococcus</i> spp.
	สีชมพู ผิวด้านนูน ขอบไม่เรียบ ไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.	0	ลบ	<i>Pseudomonas</i> spp.
No.10	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.	2	บวก	<i>Staphylococcus</i> spp.
No.11	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.	3	บวก	<i>Staphylococcus hominis</i>

ทำการศึกษานกที่เรียกในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของงูรำคาญ *Culex quinquefasciatus* ที่ลุ่มจับมาจากพื้นที่ในเขตสวนหลวง กรุงเทพมหานคร จำนวน 10 ตัวอย่าง ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะ คุณสมบัติ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ แสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของงูรำคาญ *Culex quinquefasciatus* ที่ลุ่มจับมาจากพื้นที่ในกรุงเทพมหานคร เขตสวนหลวง

ตัวอย่างงู	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย	ชนิดของแกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.1	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 มม.	18,800	ลบ	<i>Providencia rettgeri</i>
	สีชมพู ผิววาวแบนและนูนตรงกลาง ขอบไม่เรียบและแผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม.	0	ลบ	<i>Pantoea</i> spp.
	สีใส ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม.	0	ลบ	<i>Providencia rettgeri</i>
	สีชมพู ผิววาวแบนและนูนตรงกลาง ขอบไม่เรียบและแผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม.	0	ลบ	<i>Pantoea</i> spp.
No.2	สีเหลือง ผิวด้านและนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	7	บวก	<i>Micrococcus</i> spp.
No.3	ขุ่น ผิวมันวาวและนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม.	56	ลบ	-
	สีชมพู ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 มม.	0	ลบ	-
No.4	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1	ลบ	<i>Chryseobacterium taklimakanense</i>
No.5	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1,420	ลบ	-
	ใสมีจุดสีม่วงอยู่ตรงกลางขุ่นและขอบใส ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มม.	0	ลบ	-
No.6	สีขาว ผิวด้านนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม. ฮีโมไลซิส	268,000	ลบ	-
	ขุ่นมีจุดสีม่วงอยู่ตรงกลางและขอบใส ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-1.5 มม.	0	ลบ	<i>Pantoea</i> spp.

ตารางที่ 12 (ต่อ) ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงรำคาญ
Culex quinquefasciatus ที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในกรุงเทพมหานคร เขตสวนหลวง

ตัวอย่างยุง	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี ของแบคทีเรีย	ชนิดของ แกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.7	สีขาวยาวตรงกลางและขอบใส ผิววาว นูน ขอบไม่เรียบและไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม.	84	บวก	-
	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1	บวก	<i>Micrococcus luteus</i>
No.8	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม.	1	บวก	<i>Staphylococcus</i> spp.
	สีครีม ผิววาวแบน ขอบไม่เรียบ และไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม.	1	บวก	<i>Microbacterium arborescens</i>
No.9	สีครีม ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.	1	บวก	<i>Micrococcus luteus</i>
	สีขาวยาวตรงกลางและขอบใส ผิววาว นูนตรงกลางขอบแบน ขอบเรียบ ไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1	บวก	<i>Microbacterium imperiale</i>
No.10	สีขาว ผิวด้านนูน ขอบไม่เรียบและ ไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม.	1	ลบ	-

ทำการศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* ที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในกรุงเทพมหานคร เขตหลักสี่ จำนวน 11 ตัวอย่าง ผลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะ คุณสมบัติ และจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่พบ ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* ที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในกรุงเทพมหานคร เขตหลักสี่

ตัวอย่างยุง	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย	ชนิดของแกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.1	สีครีม ผิวด้านขรุขระและนูน ขอบไม่เรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มม.	1	ลบ	<i>Pseudomonas</i> spp.
No.2	สีขาว ผิวด้านนูน ขอบเรียบและแผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 มม.	2	ลบ	<i>Acinetobacter</i> spp.
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. ฮีโมไลซิส	9	บวก	<i>Staphylococcus</i> spp.
	สีครีม ผิวด้านขรุขระและนูน ขอบไม่เรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.	1	ลบ	<i>Pseudomonas</i> spp.
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.	1	ลบ	-
No.3	สีขาว ผิวด้านแบน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม. ฮีโมไลซิส	8	บวก	-
	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม.	5	ลบ	-
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1	บวก	<i>Actinomyces oris</i>
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มม.	1	บวก	-
No.4	สีเหลืองอ่อน ผิววาวแบน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม. ฮีโมไลซิส	17	บวก	<i>Staphylococcus</i> spp.
No.5	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มม.	2	ลบ	<i>Novosphingobium panipatense</i>

ตารางที่ 13 (ต่อ) ชนิดของแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงรำคาญ
Culex quinquefasciatus ที่สุ่มจับมาจากพื้นที่ในกรุงเทพมหานคร เขตหลักสี่

ตัวอย่างยุง	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี ของแบคทีเรีย	ชนิดของ แกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
No.6	สีครีม ผิวด้านนูน ขอบเรียบและ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม.	82	บวก	<i>Pantoea dispersa</i>
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบและแผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มม.	26	ลบ	-
No.7	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. ฮีโมไลซิส	1	บวก	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มม.	1	บวก	<i>Kocuria marina</i>
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มม.	4	บวก	<i>Micrococcus luteus</i>
No.8	สีครีม ผิวด้านแบน ขอบไม่เรียบ และไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม.	1	บวก	<i>Bacillus</i> spp.
No.9	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	9	บวก	<i>Kocuria marina</i>
	สีครีม ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มม.	1	ลบ	-
	สีขาว ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 มม.	6	บวก	<i>Pantoea dispersa</i>
	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 มม.	2	ลบ	<i>Pantoea stewartii</i>
	สีขาว ผิวด้านแบน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	0	ไม่สามารถ ระบุได้	-
No.10	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม.	1	บวก	<i>Microbacterium imperiale</i>
	สีเหลือง ผิววาวนูน ขอบเรียบไม่ แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มม.	1	บวก	<i>Bacillus licheniformis</i>
No.11	สีขาว ผิวด้านนูน ขอบเรียบไม่แผ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม.	1	บวก	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>

2. การศึกษาการติดเชื้อไวรัสซึนคุนงูยาในหนูไมซ์ชนิด BALB/c และชนิด ICR

การศึกษาที่ 1

ทำการฉีดเชื้อไวรัสซึนคุนงูยาปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร เข้าช่องท้องของหนูไมซ์ชนิด BALB/c และชนิด ICR โดยปริมาณของเชื้อที่ใช้คือ $10^{5.6}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ หรือคิดเป็น $10^{4.9}$ $\text{CID}_{50}/\text{mouse}$ และทำการตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดของหนูทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน หลังจากวันที่ฉีดเชื้อ โดยตรวจหาเชื้อด้วยวิธี RT-PCR และ immunocytochemistry ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 การติดเชื้อไวรัสซึนคุนงูยาในหนูไมซ์ชนิด BALB/c และชนิด ICR หลังจากที่ได้รับเชื้อที่มีปริมาณ $10^{4.9}$ $\text{CID}_{50}/\text{mouse}$

ชนิดของหนู	อายุเมื่อได้รับเชื้อ (สัปดาห์)	วันที่ทำการตรวจหาเชื้อ (PI)	RT-PCR	Immunocytochemistry ($\text{CID}_{50}/\text{ml}$)
No.1 BALB/c	6	Day 1	+	$10^{2.5}$
No.2 BALB/c	6	Day 1	+	$10^{2.5}$
No.3 BALB/c	6	Day 2	+	$10^{1.5}$
No.4 BALB/c	6	Day 2	+	$10^{2.5}$
No.5 ICR	7	Day 2	-	$10^{1.5}$
No.6 ICR	7	Day 2	-	$10^{1.5}$
No.7 BALB/c	6	Day 3	-	$10^{3.5}$
No.8 BALB/c	6	Day 3	-	$10^{2.5}$
No.9 BALB/c	6	Day 4	-	$10^{3.5}$
No.10 BALB/c	6	Day 4	-	$10^{3.0}$

การศึกษาที่ 2

ทำการฉีดเชื้อไวรัสซึนคุนยาปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร เข้าช่องท้องของหนูไมซ์ชนิด BALB/c โดยปริมาณของเชื้อที่ใช้คือ 10^7 CID₅₀/ml หรือคิดเป็น $10^{6.3}$ CID₅₀/mouse และทำการตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดของหนูทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน หลังจากวันที่ฉีดเชื้อ โดยตรวจหาเชื้อด้วยวิธี RT-PCR และ Immunocytochemistry ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 การติดเชื้อไวรัสซึนคุนยาในหนูไมซ์ชนิด BALB/c หลังจากที่ได้รับเชื้อที่มีปริมาณ $10^{6.3}$ CID₅₀/mouse

ชนิดของหนู	อายุเมื่อได้รับเชื้อ (สัปดาห์)	วันที่ทำการตรวจหาเชื้อ (PI)	RT-PCR	Immunocytochemistry (CID ₅₀ /ml)
No.1 BALB/c	4	Day 1	+	$10^{4.0}$
No.2 BALB/c	4	Day 1	+	$10^{2.5}$
No.3 BALB/c	4	Day 2	+	$10^{1.5}$
No.4 BALB/c	4	Day 2	+	$10^{1.5}$
No.5 BALB/c	4	Day 3	-	$10^{3.0}$
No.6 BALB/c	4	Day 3	+	$10^{1.5}$
No.7 BALB/c	4	Day 3	+	$10^{2.5}$
No.8 BALB/c	4	Day 4	+	$10^{4.0}$
No.9 BALB/c	4	Day 4	-	$10^{1.5}$
No.10 BALB/c	4	Day 4	-	$10^{1.5}$

การศึกษาที่ 3

ศึกษาผลของ dexamethasone ต่อการติดเชื้อไวรัสซึนคุนยาในหนูไมซ์ชนิด ICR โดยที่แบ่งหนูไมซ์อายุ 4 สัปดาห์ ออกเป็นสองกลุ่ม หนูกลุ่มที่ 1 จะได้รับน้ำเกลือ (normal saline) จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าช่องท้อง เป็นเวลา 14 วันก่อนที่จะได้รับเชื้อ ส่วนหนูกลุ่มที่ 2 จะได้รับ dexamethasone จำนวน 100 ไมโครกรัม หรือปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าช่องท้อง เป็นเวลา 14 วันก่อนที่จะได้รับเชื้อ

หลังจากนั้นทำการฉีดเชื้อไวรัสซึนคุนยาปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร เข้าช่องท้องของหนูไมซ์ โดยปริมาณของเชื้อที่ใช้คือ $10^{7.0}$ CID₅₀/ml หรือคิดเป็น $10^{6.3}$ CID₅₀/mouse และทำการตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดของหนูทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน หลังจากวันที่ฉีดเชื้อ โดยตรวจหาเชื้อด้วยวิธี RT-PCR และ immunocytochemistry ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 การติดเชื้อไวรัสซึคนกุนยาในหนูไมซ์ชนิด ICR หลังจากที่ได้รับ dexamethasone (Dexa) หรือน้ำเกลือ (NSS) เป็นเวลา 4 วัน และตามด้วยเชื้อที่มีปริมาณ $10^{6.3}$ CID₅₀/mouse

ชนิดของหนู	สารที่ได้รับ	อายุเมื่อได้รับเชื้อ (สัปดาห์)	วันที่ทำการตรวจหาเชื้อ (PI)	RT-PCR	Immunocytochemistry (CID ₅₀ /ml)
No.1 ICR	Dexa	6	Day 1	+	$10^{2.75}$
No.2 ICR	Dexa	6	Day 1	+	$10^{2.5}$
No.3 ICR	NSS	6	Day 1	+	$10^{1.5}$
No.4 ICR	NSS	6	Day 1	+	$10^{2.5}$
No.5 ICR	Dexa	6	Day 2	+	$10^{2.5}$
No.6 ICR	Dexa	6	Day 2	+	$10^{3.5}$
No.7 ICR	NSS	6	Day 2	+	$10^{2.0}$
No.8 ICR	NSS	6	Day 2	-	-
No.9 ICR	Dexa	6	Day 3	+	$10^{3.25}$
No.10 ICR	Dexa	6	Day 3	+	$10^{6.0}$
No.11 ICR	NSS	6	Day 3	-	$10^{2.25}$
No.12 ICR	NSS	6	Day 3	-	$10^{2.5}$
No.13 ICR	Dexa	6	Day 4	+	$10^{3.5}$
No.14 ICR	Dexa	6	Day 4	+	$10^{3.5}$
No.15 ICR	NSS	6	Day 4	+	$10^{3.5}$
No.16 ICR	NSS	6	Day 4	-	$10^{3.5}$
No.17 ICR	Dexa	6	Day 5	+	$10^{2.5}$
No.18 ICR	Dexa	6	Day 5	+	$10^{3.0}$
No.19 ICR	NSS	6	Day 5	—	$10^{2.5}$
No.20 ICR	NSS	6	Day 5	—	$10^{3.5}$
No.21 ICR	Dexa	6	Day 6	+	$10^{2.5}$
No.22 ICR	Dexa	6	Day 6	-	$10^{3.5}$
No.23 ICR	NSS	6	Day 6	-	$10^{2.75}$
No.24 ICR	NSS	6	Day 6	-	$10^{2.5}$
No.25 ICR	Dexa	6	Day 7	-	$10^{2.5}$
No.26 ICR	Dexa	6	Day 7	-	$10^{2.5}$
No.27 ICR	NSS	6	Day 7	-	-
No.28 ICR	NSS	6	Day 7	-	-
No.29 ICR	NSS	6	Day 7	-	$10^{3.0}$

3. การศึกษาความสัมพันธ์ของชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของงูลายสวนและศักยภาพของงูลายสวนในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสซิคุนกุญา

การศึกษาที่ 1

ศึกษาศักยภาพของงูลายสวนในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสซิคุนกุญา โดยศึกษาการติดเชื้อในตัวยุง (infection) ด้วยวิธี Immunocytochemistry (ICC) พบว่าร้อยละของการติดเชื้อในงูลายสวนเป็น 30, 43.33, 23.33, 50 และ 73.33 ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณ 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 และ 10^6 CID₅₀/ml ตามลำดับ ซึ่งระบุการติดเชื้อโดยวิธี Immunocytochemistry ส่วนวิธี RT-PCR นั้นสามารถระบุการติดเชื้อในงูที่ได้รับเชื้อในขนาด 10^6 CID₅₀/ml เท่านั้น และพบการติดเชื้อในงูร้อยละ 80 ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 17 การติดเชื้อในงูลายสวนหลังจากได้รับเชื้อไวรัสในระดับต่างๆ ได้แก่ 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 และ 10^6 CID₅₀/ml โดยระบุการติดเชื้อด้วยวิธี RT-PCR และวิธี Immunocytochemistry (ICC)

ปริมาณของ ไวรัสที่งูได้รับ (CID ₅₀ /ml)	จำนวนงูที่ ทำการศึกษา	จำนวนงูที่ตรวจพบ เชื้อด้วยวิธี RT-PCR	จำนวนงูที่ ตรวจพบเชื้อ ด้วยวิธี ICC	ร้อยละของการ ติดเชื้อด้วยวิธี ICC
10^2	30	0	9	30
10^3	30	0	13	43.33
10^4	30	0	7	23.33
10^5	30	0	15	50
10^6	30	24	22	73.33

การศึกษาที่ 2

ศึกษาศักยภาพของยุงลายสวนในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสซิกุนกุนยา โดยศึกษาการติดเชื้อในยุงด้วยวิธี Immunocytochemistry (ICC) พบว่าภายหลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาตร 10^6 CID₅₀/ml โดยพบการติดเชื้อในตัวยุง (infection) ร้อยละ 100 ส่วนขาของยุง (dissemination) ร้อยละ 95 และในน้ำลายของยุง (transmission) ร้อยละ 57 ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 การติดเชื้อในยุงลายสวนหลังจากได้รับเชื้อไวรัสในระดับ 10^6 CID₅₀/ml โดยระบุการติดเชื้อด้วยวิธี Immunocytochemistry (ICC)

ตำแหน่งที่พบการติดเชื้อ	จำนวนยุงที่ทำการศึกษา	จำนวนยุงที่ตรวจพบเชื้อด้วยวิธี ICC	ร้อยละของการติดเชื้อด้วยวิธี ICC
ตัวยุง (infection)	21	21	100
ขา (dissemination)	21	20	95
น้ำลาย (transmission)	21	12	57

การศึกษาที่ 3

ศึกษาศักยภาพของยุงลายสวนในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสซิกุนกุนยา โดยศึกษาการติดเชื้อในตัวยุง (infection) ส่วนขาของยุง (dissemination) และในน้ำลายของยุง (transmission) ด้วยวิธี Immunocytochemistry (ICC) หลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณ 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 และ 10^6 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ ตามลำดับ ซึ่งระบุการติดเชื้อโดยวิธี Immunocytochemistry ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 การติดเชื้อในยุงลายสวนหลังจากได้รับเชื้อไวรัสในระดับต่างๆ ได้แก่ 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 และ 10^6 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ โดยระบุการติดเชื้อด้วยวิธี Immunocytochemistry (ICC)

ปริมาณของไวรัส ที่ยุงได้รับ ($\text{CID}_{50}/\text{ml}$)	จำนวนยุงที่ ทำการศึกษา	ร้อยละของการ ติดเชื้อในตัวยุง	ร้อยละของการติด เชื้อในส่วนขา	ร้อยละของการ ติดเชื้อในน้ำลาย
10^2	24	83 (20/24)	71 (17/24)	42 (10/24)
10^3	30	90 (27/30)	87 (26/30)	70 (21/30)
10^4	30	100 (30/30)	100 (30/30)	100 (30/30)
10^5	30	100 (30/30)	90 (27/30)	90 (27/30)
10^6	30	100 (30/30)	100 (30/30)	100 (30/30)

การศึกษาที่ 4

ศึกษาชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของงูลายสว่นที่พบและไม่พบการติดเชื้อไวรัสซิกุนกุนยาในน้ำลาย ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณ 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 และ 10^6 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ ตามลำดับ

การศึกษานี้พบชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของงูลายสว่นที่พบและไม่พบการติดเชื้อไวรัสซิกุนกุนยาในน้ำลายหรืออุจจาระที่มีศักยภาพในการถ่ายทอดเชื้อ ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณ 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 และ 10^6 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ ตามลำดับ ดังนี้

ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณ 10^2 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ กลุ่มที่เกิดการติดเชื้อไวรัสนั้นตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของงูลายสว่น ได้แก่ *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Arthrobacter tumbae* และ *Corynebacterium* spp. ส่วนในกลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสนั้นตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของงูลายสว่น ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis* และ *Staphylococcus hominis*

ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณ 10^3 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ กลุ่มที่เกิดการติดเชื้อไวรัสนั้นตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของงูลายสว่น ได้แก่ *Acinetobacter radioresistens* ส่วนในกลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสนั้นตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของงูลายสว่น

ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณ 10^4 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ กลุ่มที่เกิดการติดเชื้อไวรัสนั้นตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของงูลายสว่น ได้แก่ *Staphylococcus haemolyticus* ส่วนในกลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสนั้นตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของงูลายสว่น

ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณ 10^5 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ กลุ่มที่เกิดการติดเชื้อไวรัสนั้นตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของงูลายสว่น ส่วนในกลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสนั้นตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของงูลายสว่น ได้แก่ *Staphylococcus haemolyticus* และ *Corynebacterium* spp.

ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อในปริมาณ 10^6 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ กลุ่มที่เกิดการติดเชื้อไวรัสนั้นตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของงูลายสว่น ได้แก่ *Sinomonas mesophila*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Moraxella osloensis* ส่วนในกลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสนั้นตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของงูลายสว่น ได้แก่ *Actinomyces naeslundii*, *Brachybacterium paraconglomeratum* และ *Staphylococcus hominis* ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของ
 ยุงลายสวนที่พบและไม่พบการติดเชื้อไวรัสซิกุนกุนยาในน้ำลาย ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อในขนาดที่
 แตกต่างกัน

ปริมาณ ของไวรัสที่ ยุงได้รับ (CID ₅₀ /ml)	การติดเชื้อ ในน้ำลาย	ตัวอย่าง ยุง	โคโลนีของ แบคทีเรีย	จำนวนโคโลนี ของแบคทีเรีย (ต่อยุง)	ชนิดของ แกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
10 ²	Negative	No.1	-	-	-	-
		No.2	2.1	3	บวก	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
		No.3	-	-	-	-
		No.4	4.1	3	บวก	<i>Staphylococcus capitis</i>
			4.2	1,149	-	-
		No.5	5.1	6	บวก	<i>Staphylococcus hominis</i>
			5.2	24	-	-
	Positive	No.6	-	-	-	-
		No.7	7.1	3	บวก	<i>Staphylococcus hominis</i>
		No.8	-	-	-	-
		No.9	9.1	42	บวก	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
			9.2	33	บวก	<i>Arthrobacter tumbae</i>
			9.3	27	บวก	<i>Corynebacterium</i> spp.
		No.10	-	-	-	-
10 ³	Negative	No.11	-	-	-	-
		No.12	-	-	-	-
		No.13	-	-	-	-
		No.14	-	-	-	-
		No.15	-	-	-	-
	Positive	No.16	-	-	-	-
		No.17	-	-	-	-
		No.18	-	-	-	-
		No.19	-	-	-	-
		No.20	20.1	3	ลบ	<i>Acinetobacter radioresistens</i>

ตารางที่ 20 (ต่อ) ชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของงูลายสว่นที่พบและไม่พบการติดเชื้อไวรัสซิกุนกุนยาในน้ำลาย ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อในขนาดที่แตกต่างกัน

ปริมาณของไวรัสที่งูได้รับ (CID50/ml)	การติดเชื้อในน้ำลาย	ตัวอย่างงู	โคโลนีของแบคทีเรีย	จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (ต่องู)	ชนิดของแกรม	ชนิดของแบคทีเรีย
10 ⁴	Negative	No.21	-	-	-	-
		No.22	-	-	-	-
	Positive	No.23	23.1	36	บวก	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
			23.2	3	-	-
		No.24	-	-	-	-
10 ⁵	Negative	No.25	-	-	-	-
		No.26	26.1	12	บวก	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
			26.2	3	บวก	<i>Corynebacterium spp.</i>
	Positive	No.27	-	-	-	-
		No.28	-	-	-	-
10 ⁶	Negative	No.29	29.1	3	บวก	<i>Staphylococcus hominis</i>
			29.2	3	บวก	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
			29.3	3	บวก	<i>Actinomyces naeslundii</i>
	Positive	No. 30	30.1	6	บวก	<i>Sinomonas mesophila</i>
	Positive	No. 31	31.1	3	ลบ	<i>Moraxella osloensis</i>
	Positive	No.32	32.1	3	บวก	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

บทวิจารณ์

โรคติดเชื้อไวรัสซิกุนกุนยาเป็นโรคอุบัติซ้ำที่มีผู้เป็นแมลงพาหะนำโรคที่สำคัญสำหรับประเทศไทยและหลาย ๆ ประเทศ วัฏจักรการถ่ายทอดของเชื้อนี้ในธรรมชาติเกี่ยวข้องกับคนติดเชื้อ สัตว์ติดเชื้อ และแมลงพาหะนำโรค ยุงลายทำหน้าที่เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญเนื่องจากเชื้อให้เชื่อมีการเพิ่มจำนวนและถ่ายทอดเชื้อได้ แม้ว่าในปัจจุบันการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสซิกุนกุนยาในประเทศไทยจะลดน้อยลง แต่ก็ยังมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคนี้อย่างต่อเนื่องเพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับการระบาดของเชื้อที่อาจจะเกิดขึ้นในอนาคต การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายและชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวนและศักยภาพของยุงสวนในการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสซิกุนกุนยา นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาความหลากหลายและชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายบ้านและยุงรำคาญอีกด้วย เนื่องจากยุงทั้งสองชนิดนี้ก็มีบทบาทที่สำคัญในการนำเชื้อต่าง ๆ ในประเทศไทย รวมทั้งได้ศึกษาการติดเชื้อไวรัสซิกุนกุนยาในหนูไมซ์เพื่อการพัฒนาไปเป็นสัตว์ทดลองต้นแบบในการศึกษาการติดเชื้อและพยากรณ์เกิดของเชื้อไวรัสซิกุนกุนยา

ระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงเป็นตำแหน่งของทางเดินอาหารที่จะมีการติดเชื้อเข้าสู่ร่างกายของยุง และในบริเวณนี้ยังเป็นตำแหน่งที่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตอยู่จึงทำให้ในตำแหน่งนี้จะมีปฏิกิริยาตอบสนองระหว่างเชื้อโรค แบคทีเรียในทางเดินอาหาร และร่างกายของยุงซึ่งล้วนจะส่งผลต่อการตอบสนองต่อเชื้อของยุง ความหลากหลายของแบคทีเรียในทางเดินอาหารนี้อาจจะส่งผลต่อลักษณะทางชีววิทยาของยุงและศักยภาพของยุงในการนำเชื้อ ซึ่งอาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดความแตกต่างของการถ่ายทอดเชื้อของยุงหรือศักยภาพของยุงในการนำเชื้อโรค ที่ผ่านมานั้นได้มีการศึกษาถึงความหลากหลายและความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารของยุงต่อการติดเชื้อและการนำเชื้อโดยยุงในประเทศต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลเหล่านี้ยังไม่มีการศึกษาในประเทศไทย คณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญจำเป็นต้องศึกษาในเรื่องดังกล่าวนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของประเทศไทยและจะได้นำมาช่วยอธิบายถึงบทบาทของยุงชนิดต่าง ๆ ในการนำเชื้อในประเทศไทย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงและศักยภาพของยุงในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสซิกุนกุนยา โดยศึกษาแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงลายสวน ยุงลายบ้าน และยุงรำคาญ ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและยุงที่จับมาจากพื้นที่จังหวัดต่าง ๆ ซึ่งศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยวิธีทางแบคทีเรียและอนุชีววิทยา

แบคทีเรียที่พบในยุงลายสวน *Aedes albopictus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ สกุล *Agrobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pandora*, *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* ยุงลายสวนจากจังหวัดสิงห์บุรีนั้นตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Bacillus*, *Serratia* และ *Staphylococcus* ยุงลายสวนจากอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร นั้นตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Microbacterium* ยุงลายสวนจากอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร นั้นตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Erwinia*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Providencia*, *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* และ

ยุงลายสวนจากจังหวัดยะลานั้นตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Brachy bacterium*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Massilia*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Nocardioidea*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Rhizobium* และ *Sphingomonas*

แบคทีเรียที่พบในยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Chryseomicrobium*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* ยุงลายบ้านจากเขตสวนหลวง กรุงเทพฯ นั้นตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Bacillus*, *Micrococcus* และ *Staphylococcus* ยุงลายบ้านจากเขตหลักสี่ กรุงเทพฯ นั้นตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Staphylococcus* และ *Streptococcus* ยุงลายบ้านจากอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร นั้นตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Moraxella* และยุงลายบ้านจากอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพรนั้นตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Providencia* และ *Pseudomonas*

แบคทีเรียที่พบในยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* ยุงรำคาญจากเขตสวนหลวง กรุงเทพฯ นั้นตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Chryseobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Providencia* และ *Staphylococcus* และยุงรำคาญจากเขตหลักสี่ กรุงเทพฯ นั้นตรวจพบแบคทีเรียสกุล *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* และ *Staphylococcus*

การศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงจากหลายๆ กลุ่มของประชากรยุงจากหลายพื้นที่ เนื่องจากต้องการที่จะบ่งชี้ถึงอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่ยุงอาศัยอยู่ต่อชนิด ความหลากหลาย และจำนวนของแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุง การศึกษาของ Chandel และคณะ (2013) เกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารของยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ในประเทศอินเดียนั้นพบแบคทีเรียจำนวน 83 ชนิด ซึ่งจัดอยู่ใน 31 สกุล และพบว่าแบคทีเรียที่มีจำนวนมากที่สุดคือสกุล *Staphylococcus* โดยมีจำนวนมากถึง 11 ชนิด ส่วนแบคทีเรียที่พบในหลายพื้นที่มากที่สุดคือแบคทีเรียในสกุล *Enterobacter* นอกจากนี้ Chandel และคณะ (2015) ยังได้ตรวจพบว่ามีแบคทีเรียชนิด *Vagococcus fluvialis* ในยุงรำคาญ ปกติแล้วแบคทีเรียชนิดนี้จะพบได้ในคนหรือสัตว์เท่านั้น ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าแบคทีเรียหลายๆชนิดที่ตรวจพบในยุงนั้นเป็นเชื้อที่ยุงได้รับมาพร้อมกับอาหารที่กินเข้าไป แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้ในประเทศไทยไม่พบแบคทีเรียชนิด *Vagococcus fluvialis*

การศึกษาของ Valiente Moro และคณะ (2013) พบว่าแบคทีเรียที่พบมากในทางเดินอาหารของยุงลายสวน *Ae. albopictus* เพศเมียจะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Proteobacteria*, *Firmicutes* และ *Actinobacteria* ตามลำดับ ส่วนในยุงลายสวนเพศผู้แบคทีเรียที่พบมากจะเป็นกลุ่ม *Actinobacteria*, *Proteobacteria* และ *Firmicutes* ตามลำดับ แบคทีเรียที่พบมากที่สุดทั้งในยุงเพศผู้และเพศเมียคือสกุล *Pantoea* จากการศึกษาในครั้งนี้ก็พบแบคทีเรียสกุล *Pantoea* ในประเทศไทยเช่นเดียวกัน โดยพบในยุงลายบ้านที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ยุงลายสวนและยุงรำคาญที่จับมาจากพื้นที่ จากการศึกษานี้จะ

เห็นได้ว่าแบคทีเรียที่ตรวจพบในทางเดินอาหารของยุงนั้นจะมีความหลากหลายและแตกต่างกันมาก ระหว่างประชากรของยุงแต่ละกลุ่ม ซึ่งการบ่งชี้ว่าแบคทีเรียชนิดใดจะมีผลต่อการติดเชื้อชนิดต่างๆ ของยุงนั้นจำเป็นต้องทำการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

สำหรับการศึกษาการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในหนูไมซ์ชนิด BALB/c และชนิด ICR นั้นประกอบไปด้วย 3 การศึกษา การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำหนูทั้งสองชนิดนี้มาใช้เป็นสัตว์ทดลองต้นแบบในการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อและพยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา ในการศึกษาที่ 1 หนูไมซ์ชนิด BALB/c และ ICR ได้รับเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในขนาด $10^{4.9}$ $\text{CID}_{50}/\text{mouse}$ และทำการตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดของหนูทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน หลังจากวันที่ฉีดเชื้อ โดยพบว่าระดับของเชื้อในซีรัมของหนูไมซ์ชนิด BALB/c มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ $10^{2.5}$, $10^{2.0}$, $10^{3.0}$ และ $10^{3.3}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ ในวันที่ 1 ถึง 4 ตามลำดับ ส่วนระดับของเชื้อในซีรัมของหนูไมซ์ชนิด ICR มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ $10^{1.5}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ ในวันที่ 2 และในการศึกษาที่ 2 หนูไมซ์ชนิด BALB/c ได้รับเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในขนาด $10^{6.3}$ $\text{CID}_{50}/\text{mouse}$ และทำการตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดของหนูทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน หลังจากวันที่ฉีดเชื้อ โดยพบว่าระดับของเชื้อในซีรัมของหนูไมซ์ชนิด BALB/c มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ $10^{3.3}$, $10^{1.5}$, $10^{2.3}$ และ $10^{2.3}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ ในวันที่ 1 ถึง 4 ตามลำดับ

ในการศึกษาที่ 3 ศึกษาผลของ dexamethasone ต่อการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในหนูไมซ์ชนิด ICR โดยที่แบ่งหนูไมซ์ออกเป็นสองกลุ่ม หนูกลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม) ได้รับน้ำเกลือ ส่วนหนูกลุ่มที่ 2 ได้รับ dexamethasone เป็นเวลา 14 วันก่อนที่จะได้รับเชื้อ หลังจากนั้นหนูไมซ์จะได้รับเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาในขนาด $10^{6.3}$ $\text{CID}_{50}/\text{mouse}$ และทำการตรวจหาเชื้อในกระแสเลือดของหนูทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน หลังจากวันที่ฉีดเชื้อ พบว่าระดับของเชื้อในหนูกลุ่มที่ได้รับ dexamethasone มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ $10^{2.7}$, $10^{3.0}$, $10^{4.7}$, $10^{3.5}$, $10^{2.8}$, $10^{3.0}$ และ $10^{2.5}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ ในวันที่ 1 ถึง 7 ตามลำดับ สำหรับหนูในกลุ่มควบคุมนั้นระดับของเชื้อในหนูมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ $10^{2.0}$, $10^{1.0}$, $10^{2.4}$, $10^{3.5}$, $10^{3.0}$, $10^{2.7}$ และ $10^{1.5}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ ในวันที่ 1 ถึง 7 ตามลำดับ ในหนูกลุ่มที่ได้รับ dexamethasone นั้นพบว่าหนูจะมีน้ำหนักน้อยกว่าหนูในกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามพบว่าการติดเชื้อในหนูทั้งสองกลุ่มแต่ระดับของเชื้อในหนูกลุ่มที่ได้รับ dexamethasone จะมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่พบอาการผิดปกติอื่นๆ ในหนูทั้งสองกลุ่ม สำหรับการติดเชื้อในกระเพาะที่มีการระบาดของเชื้อในประเทศไทยนั้นพบว่าผู้ป่วยจะแสดงอาการต่างๆ ได้แก่ มีไข้ ปวดตามข้อ และสมองอักเสบ (Chusri et al., 2011; Nakkhara et al., 2013; Appassakij et al., 2013) และในบางการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อในหนูนั้นพบว่าหนูแสดงอาการเชื่องซึม เดินลำบาก การอักเสบของข้อ และน้ำหนักลด (Gardner et al., 2010; Ziegler et al., 2008)

การติดเชื้อไวรัสในยุงนั้นจะเริ่มจากการที่ยุงได้รับเชื้อมาพร้อมกับเลือดของโฮสต์ หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าไปเจริญในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุง ซึ่งจะบ่งชี้ได้ว่าการติดเชื้อในยุง (infection) หลังจากนั้นเชื้อจะเคลื่อนที่เข้าสู่ช่องว่างในร่างกายของยุง ซึ่งจะบ่งชี้ได้ว่าการกระจายของเชื้อจากทางเดินอาหารเข้าสู่ช่องว่างของร่างกาย (dissemination) และหลังจากนั้นเชื้อจะเคลื่อนที่เข้าสู่ต่อมน้ำลายของยุงและมีการเพิ่มจำนวนในต่อมน้ำลาย เมื่อยุงไปดูดเลือดจากโฮสต์ก็จะปล่อยเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดของโฮสต์ได้ (transmission)

สำหรับการศึกษาการติดเชื้อไวรัสซิคุนกุญาในยุงลายสวนนั้นพบว่าร้อยละของการติดเชื้อในตัวยุง (infection) ในช่องว่างของร่างกายยุง (dissemination) และในน้ำลายของยุง (transmission) เป็น 83%, 71% และ 42% หลังจากได้รับเชื้อในปริมาณ 10^2 CID₅₀/ml ร้อยละของการติดเชื้อในตัวยุง ช่องว่างของร่างกายยุง และน้ำลายของยุง เป็น 90%, 87% และ 70% หลังจากได้รับเชื้อในปริมาณ 10^3 CID₅₀/ml ร้อยละของการติดเชื้อในตัวยุง ช่องว่างของร่างกายยุง และน้ำลายของยุง เป็น 100%, 100% และ 100% หลังจากได้รับเชื้อในปริมาณ 10^4 CID₅₀/ml ร้อยละของการติดเชื้อในตัวยุง ช่องว่างของร่างกายยุง และน้ำลายของยุง เป็น 100%, 90% และ 90% หลังจากได้รับเชื้อในปริมาณ 10^5 CID₅₀/ml และร้อยละของการติดเชื้อในตัวยุง ช่องว่างของร่างกายยุง และน้ำลายของยุง เป็น 100%, 100% และ 100% หลังจากได้รับเชื้อในปริมาณ 10^6 CID₅₀/ml

การศึกษาความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของยุงที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อภายหลังการที่ได้รับเชื้อไวรัสซิคุนกุญาในปริมาณที่แตกต่างกัน การศึกษาพบว่าหลังจากที่ยุงได้รับเชื้อในปริมาณ 10^2 CID₅₀/ml นั้นพบว่ายุงที่มีการติดเชื้อไวรัสจะพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Arthrobacter*, *Corynebacterium* และ *Staphylococcus* ส่วนยุงที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสนั้นจะพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ในยุงได้รับเชื้อในปริมาณ 10^3 CID₅₀/ml นั้นพบว่ายุงที่มีการติดเชื้อไวรัสจะพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Acinetobacter* ส่วนยุงที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสนั้นไม่พบว่ามีแบคทีเรีย ในยุงได้รับเชื้อในปริมาณ 10^4 CID₅₀/ml นั้นพบว่ายุงที่มีการติดเชื้อไวรัสจะพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ส่วนยุงที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสนั้นไม่พบว่ามีแบคทีเรีย ในยุงได้รับเชื้อในปริมาณ 10^5 CID₅₀/ml นั้นพบว่ายุงที่มีการติดเชื้อไวรัสนั้นไม่พบว่ามีแบคทีเรีย ส่วนยุงที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสนั้นพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Corynebacterium* และ *Staphylococcus* ในยุงได้รับเชื้อในปริมาณ 10^6 CID₅₀/ml นั้นพบว่ายุงมีการติดเชื้อไวรัสจะพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Moraxella*, *Sinomonas* และ *Staphylococcus* ส่วนยุงที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสนั้นจะพบว่ามีแบคทีเรียสกุล *Actinomyces*, *Brachybacterium* และ *Staphylococcus*

การศึกษานี้บ่งชี้ได้ว่ายุงลายสวน *Ae. albopictus* เป็นยุงที่มีศักยภาพในการนำเชื้อไวรัสซิคุนกุญาที่มีการระบาดในประเทศไทยในปัจจุบัน ในขณะที่ในอดีตที่ผ่านมาที่ยุงลายบ้าน *Ae. aegypti* จะมีบทบาทที่สำคัญในการเป็นพาหะนำเชื่อนี้ (Thavara et al., 2009) การศึกษาของ Tsetsarkin และคณะ (2007) ได้บ่งชี้ว่ายุงลายสวนมีบทบาทสำคัญในการนำเชื้อในปัจจุบันเนื่องมาจากเกิดการเปลี่ยนแปลง (mutation) ของเชื้อทำให้เชื่อนี้พัฒนาได้ดีในยุงลายสวนมากกว่ายุงลายบ้าน และการศึกษาของ Chompoonsri และคณะ (2016) ได้พบว่าเชื้อไวรัสนี้สามารถถ่ายทอดจากแม่สู่ลูกในยุงลายสวนและยุงลายบ้าน แต่ก็พบในยุงลายสวนได้มากกว่ายุงลายบ้าน ข้อมูลพื้นฐานที่เป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงลักษณะชีววิทยาและนิเวศวิทยาของเชื่อนี้และยุงพาหะนำโรคในประเทศไทย ซึ่งจะนำไปสู่การวางแผนเพื่อการสำรวจ การควบคุม และป้องกันการระบาดของโรคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Appassakij, H., Khuntikij, P., Kemapunmanus, M., Wutthanarungsan, R., Silpapojakul, K. 2013. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? *Transfusion* 53: 2567-2574.
- Chandel, K., et al. 2013. Midgut microbial community of *Culex quinquefasciatus* mosquito populations from India. *PLoS One* 8(11): e80453 doi:10.1371/journal.pone.0080453.
- Chandel, K., Parikh, R.Y., Mendki, M.J., Shouche, Y.S., Veer, V. 2015. Isolation and characterization of *Vagococcus* sp from midgut of *Culex quinquefasciatus* (Say) mosquito. *J Vector Borne Dis* 52(1):52-57.
- Chompoosri, J., Thavara, U., Tawatsin, A., Boonserm, R., Phumee, A., Sangkitporn, S., Siriyasatien, P. 2016. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Parasit Vectors* 9:227 doi:10.1186/s13071-016-1505-6.
- Chusri, S., Siripaitoon, P., Hirunpat, S., Silpapojakul, K. 2011. Case reports of neuro-Chikungunya in southern Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85: 386-389.
- Gardner, J., Anraku, I., Le, T. T., Larcher, T., Major, L., Roques, P., Schroder, W. A., Higgs, S., Suhrbier, A. 2010. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. *Journal of Virology* 84: 8021-8032.
- Nakkhara, P., Chongsuvivatwong, V., Thammapalo, S. 2013. Risk factors for symptomatic and asymptomatic chikungunya infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 107: 789-796.

- Thavara, U., Tawatsin, A., Pengsakul, T., Bhakdeenuan, P., Chanama, S., Anantapreecha, S., Molito, C., Chompoosri, J., Thammapalo, S., Sawanpanyalert, P., Siriyasatien, P. 2009. Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 40: 951-962.
- Tsetsarkin, K.A., Vanlandingham, D.L., McGee, C.E., Higgs, S. 2007. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. PLoS Pathogens 3: e201.
- Valiente Moro, C., Tran, F.H., Raharimalala, F.N., Ravelonandro, P., Mavingui, P. 2013. Diversity of culturable bacteria including Pantoea in wild mosquito *Aedes albopictus*. BMC Microbiol 13:70 doi:10.1186/1471-2180-13-70.
- Ziegler, S. A., Lu, L., da Rosa, A. P., Xiao, S. Y., Tesh, R. B. 2008. An animal model for studying the pathogenesis of Chikungunya virus infection. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 79: 133-139.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 3 เรื่อง

Sonthaya Tiawsirisup, Ranida Tuanudom, and Nicharpat Yurayart. 2016. Chikungunya virus infection in BALB/c and ICR mouse models. Tropical Biomed (Accepted with revision).

Sonthaya Tiawsirisup, Jirirut Sirijutaluk, Mananya Sondang, Manunya Supol, Nut Ansusinha, Ranida Tuanudom, and Channarong Rodkum. 2016. Midgut microbiota diversity of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* (Say). Parasitology Reserach (Submitted).

Ranida Tuanudom, Nicharpat Yurayart, and Sonthaya Tiawsirisup. 2016. Chikungunya virus transmission by *Aedes albopictus* (Skuse). Parasitology Reserach (Submitted).

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์ -

- เชิงนโยบาย -

- เชิงสาธารณะ -

- เชิงวิชาการ ความรู้ใหม่ที่ได้จากงานวิจัยนี้ได้มีการนำมาพัฒนาการเรียนการสอนในระดับปริญญาบัณฑิตและบัณฑิตศึกษาของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้มีการสร้างนักวิจัยใหม่โดยมีนิสิตทั้งระดับปริญญาบัณฑิตและบัณฑิตศึกษาของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้มีโอกาสร่วมงานในการศึกษาครั้งนี้

3. อื่น ๆ

3.1 การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ

การนำเสนอผลงานในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว ครั้งที่ 15 ในระหว่างวันที่ 6-8 มกราคม 2559 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ชะอำ บีช รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี จำนวน 1 เรื่อง

- Bacterial biodiversity in midguts of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes

3.2 การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Joint International Tropical Medicine Meeting 2014 ในระหว่างวันที่ 2-4 ธันวาคม 2557 ณ โรงแรมเซ็นทารา แกรนด์ แอท เซ็นทรัลเวิลด์ จำนวน 2 เรื่อง

- Immunosuppression with dexamethasone and Chikungunya virus infection in ICR mice
- Midgut microbiota of Thailand strain of *Aedes albopictus* mosquitoes

การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ Joint International Tropical Medicine Meeting 2015 ในระหว่างวันที่ 2-4 ธันวาคม 2558 ณ Amari Watergate Hotel จำนวน 1 เรื่อง

- Midgut microbiota diversity of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* (Say)

ภาคผนวก

การนำเสนอผลงานในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 15 ในระหว่างวันที่ 6-8 มกราคม 2559 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ชะอำ บีช รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี

- Bacterial biodiversity in midguts of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes

การประชุม นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.

O-BIO-E06

Bacterial Biodiversity in Midguts of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes

Tuanudom, R.^{1,3}, Yurayart, N.¹, Rodkhum, C.², Thavara, U.⁴, Tawatsin, A.⁴, Tiawsirisup, S.^{1*}

¹Animal Vector-Borne Disease Research Group, Parasitology Unit, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³Interdisciplinary Program of Biomedical Science, Faculty of Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

⁴Department of Medical Sciences, National Institute of Health of Thailand, Nonthaburi, Thailand

Abstract

Aedes albopictus is an important mosquito vector for many infectious diseases in humans and animals worldwide including Thailand. Bacteria in midgut or midgut microbiota of mosquitoes are factors that might be involved in vector competency of the mosquitoes. Bacteria in the midguts of laboratory rearing and field collected *Aedes albopictus* were investigated in this study. Midguts were dissected under aseptic condition and tested for bacteria by using bacteriological and molecular techniques. Twenty-eight mosquitoes from laboratory rearing were examined and the bacterial isolates found in these mosquitoes were *Agrobacterium tumefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus* spp., *Pandoraea* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Staphylococcusepidermidis*, and *Staphylococcus hominis*. Sixteen mosquitoes from Patew district, Chumphon province were examined and the bacterial isolate found in this mosquito was *Microbacterium* spp. Eighteen mosquitoes from Lang Suan district, Chumphon province were examined and the bacterial isolates found in these mosquitoes were *Acinetobacter* spp., *Chryseobacterium* spp., *Erwinia* spp., *Microbacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Pantoea dispersa*, *Providencia* spp., *Pseudomonas* spp., and *Staphylococcusepidermidis*. Ten mosquitoes from Singha Buri province were examined and the bacterial isolates found in these mosquitoes were *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, and *Staphylococcus hominis*. These findings indicate the variation and biodiversity of bacteria in the midguts of *Aedes albopictus* mosquitoes from various geographical areas. However, further studies need to be undertaken to determine the relation between midgut microbiota and disease infection in mosquitoes.

Keywords: bacteria, biodiversity, midgut, *Aedes albopictus*, Thailand

*Corresponding author.

Tel.: 0-2218-9664; Fax: 0-2218-9666

E-mail: sonthaya.t@chula.ac.th

POSTER Presentations

POSTER No. 013

IMMUNOSUPPRESSION WITH DEXAMETHASONE AND CHIKUNGUNYA VIRUS INFECTION IN ICR MICE

Sonthaya Tiawsirisup¹, Ranida Tuanudom¹, Nichapat Yurayart¹

¹ Parasitology Unit, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Chikungunya virus (CHIKV) infection is an emerging or re-emerging infectious disease in several countries including Thailand. The ecology of this virus involves human-mosquito-human and animal-mosquito-animal transmission cycles. CHIKV infection in ICR mice and that in immunosuppressed ICR mice were examined in this study. The first group or control group, 4-week-old mice were injected with 0.1 ml of normal saline by intraperitoneal route for 14 days. In the second group or immunosuppressed group, 4-week-old mice were injected with 0.1 ml or 100 mg of dexamethasone by intraperitoneal route for 14 days. All mice were then inoculated with 0.2 ml of CHIKV (10^7 CID₅₀/ml). Blood samples were collected and tested for CHIKV infection by using immunocytochemistry (ICC) and reverse transcription polymerase reaction (RT-PCR) for seven days post infection. For the control group, the average CHIKV levels in mice were $10^{2.0}$, $10^{1.0}$, $10^{2.4}$, $10^{3.5}$, 10^3 , $10^{2.7}$, and $10^{1.5}$ CID₅₀/ml of serum on day 1 to day 7 post infection (PI). However, only the serum samples of day 1, 2, and 4 PI were positive for CHIKV by using RT-PCR. For the immunosuppressed group, the average CHIKV levels in mice were $10^{2.7}$, $10^{3.0}$, $10^{4.7}$, $10^{3.5}$, $10^{2.8}$, $10^{3.0}$, and $10^{2.5}$ CID₅₀/ml of serum on day 1 to day 7 post infection (PI), respectively. However, only the serum samples of day 1 to day 6 PI were positive for CHIKV by using RT-PCR. Dexamethasone might affect CHIKV infection in ICR mice. Nevertheless, further studies are needed to confirm this finding.

Keywords: Chikungunya virus, Immunosuppression, ICR mice

การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Joint International Tropical Medicine Meeting 2014 ในระหว่างวันที่ 2-4 ธันวาคม 2557 ณ โรงแรมเซ็นทารา แกรนด์ แอท เซ็นทรัลเวิลด์

- Immunosuppression with dexamethasone and Chikungunya virus infection in ICR mice



Immunosuppression with dexamethasone and Chikungunya virus infection in ICR mice

Sonthaya Tiawsirisup*, Ranida Tuanudom, Nichapat Yurayart

Animal Vector-Borne Diseases Research Group, Parasitology Unit, Department of Veterinary Pathology,
Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

*Corresponding author: sonthaya.t@chula.ac.th

Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is a re-emerging infectious mosquito borne virus found in several countries including Thailand. CHIKV belongs to Togaviridae family. It can be divided into four lineages: West Africa, East Central and South Africa, Asian, and Indian Ocean lineage (IOL). CHIKV of Asian lineage was previously circulated in Thailand but the virus of IOL has been responsible for the recent outbreak in Thailand.

Infected humans, animals, and mosquitoes play important roles in the CHIKV transmission cycle. Human and animal immunity status might be a factor involved in the outbreak of this virus.

This study was conducted to explore the possible role of immunosuppressant on virus replication in animal hosts. CHIKV infection in ICR mice and that in immunosuppressed ICR mice were examined in this study.

Materials and Methods

Virus and cell culture: Thailand 2010 strain of Chikungunya virus (CHIKV) used in this study was propagated and assayed in Vero-76 cells.

Virus assay: CHIKV and mice serum samples were assayed for an amount of virus in Vero-76 cells by using immunocytochemistry (ICC) staining. Virus titers were expressed as CID_{50}/ml .

Viral nucleic acid extraction: Viral nucleic acid was extracted from an individual serum sample by using viral nucleic acid extraction kit II (Geneaid, Taiwan).

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR): Each extracted viral nucleic acid sample was tested for CHIKV by using RT-PCR according to Naresh Kumar et al. (2007) and Theamboonlers et al. (2009) with slight modification. The primers were DVRChk-R 5'GGGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA3' and DVRChk-F 5'ACGGCGCTCTACCCATTCTATGT3'. The expected PCR product was 330 base pair band.

Experiment animals and design: The control group, 4-week-old mice were injected with 0.1 ml of normal saline by intraperitoneal (IP) route for 14 days. The immunosuppressed group, 4-week-old mice were injected with 100 μg of dexamethasone by IP route for 14 days.

Experiment animals and design:

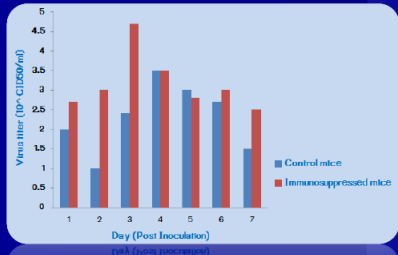
All mice were then inoculated with 0.2 ml of CHIKV (10^7 CID_{50}/ml). Blood samples were collected and tested for CHIKV infection by using ICC staining and RT-PCR for seven days post inoculation.




Results and Conclusions

For the control group, the average CHIKV levels in mice were $10^{2.0}$, $10^{1.0}$, $10^{2.4}$, $10^{3.5}$, 10^3 , $10^{2.7}$, and $10^{1.5}$ CID_{50}/ml of serum on day 1 to day 7 post infection (PI), respectively. However, only the serum samples of day 1, 2, and 4 PI were positive for CHIKV by using RT-PCR.

For the immunosuppressed group, the average CHIKV levels in mice were $10^{2.7}$, $10^{3.0}$, $10^{4.7}$, $10^{3.5}$, $10^{2.8}$, $10^{3.0}$, and $10^{2.5}$ CID_{50}/ml of serum on day 1 to day 7 post infection (PI), respectively. However, only the serum samples of day 1 to day 6 PI were positive for CHIKV by using RT-PCR.



Day (Post Inoculation)	Control mice (10 ⁻¹ $CID_{50}/\mu g$)	Immunosuppressed mice (10 ⁻¹ $CID_{50}/\mu g$)
1	2.0	2.5
2	1.0	3.0
3	2.5	4.5
4	3.5	3.5
5	2.5	3.0
6	2.5	3.0
7	1.5	2.5

Dexamethasone might affect CHIKV infection in ICR mice. Nevertheless, further studies are needed to confirm this finding.

Acknowledgements

This study was supported by the Thailand Research Fund and Chulalongkorn University (RSA 5680030) and Special Task Force for Activating Research, Chulalongkorn University (GSTAR 57-003-31-001).

References

Naresh Kumar, CVM. et al. 2007. Indian J Med Res 126: 534-540.

Theamboonlers, A. et al. 2009. Jpn J Infect Dis 62: 303-305.

การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Joint International Tropical Medicine Meeting 2014 ในระหว่างวันที่ 2-4 ธันวาคม 2557 ณ โรงแรมเซ็นทารา แกรนด์ แอท เซ็นทรัลเวิลด์

- Midgut microbiota of Thailand strain of *Aedes albopictus* mosquitoes

POSTER Presentations

POSTER No. 010

MIDGUT MICROBIOTA OF THAILAND STRAIN OF *AEDES ALBOPICTUS* MOSQUITOES

Ranida Tuanudom¹, Nichapat Yurayart², Sonthaya Tiawsirisup²

¹ Interdisciplinary Program of Biomedical Science, Faculty of Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

² Parasitology Unit, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand



Mosquitoes are important vectors in the transmission of various diseases including malaria, dengue fever, and chikungunya. These particular diseases pose a great challenge to public health in many countries. Insects exhibit a broad range of relationships with symbiotic organisms. The mosquito and its microbiota are involved in complex mutual interactions such as host reproduction, survival, and protection against pathogens. This research aims to identify the microbiota present in the midgut of *Aedes albopictus*. The midgut bacteria in field caught and laboratory rearing of female *Aedes albopictus* mosquitoes were studied. The midgut from non-fed *Aedes albopictus* was dissected under aseptic conditions, homogenized and plated on blood agar. Microorganisms were first screened based on colony characteristics, morphology, arrangement of isolates, and Gram staining. The bacterial colonies were then identified by using polymerase chain reaction and 16S rRNA sequencing. The bacterial isolates found in field caught mosquitoes were *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, and *Staphylococcus hominis*. On the other hand, the bacterial isolates found in laboratory reared mosquitoes were *Klebsiella pneumonia*, *Micrococcus* spp., *Pandoraea* spp., *Staphylococcus* spp., and *Staphylococcus hominis*. It has also been observed that individual mosquitoes have a variety of bacteria in the midgut. These findings indicate that the variation in midgut microbiota may be one of the factors responsible for variation in disease transmission rates or vector competence within mosquito populations. However, further studies need to be undertaken to determine the mechanism of disease transmission.

Keywords: *Aedes albopictus*, midgut, microbiota, vector, transmission

การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ Joint International Tropical Medicine Meeting 2015
ในระหว่างวันที่ 2-4 ธันวาคม 2558 ณ Amari Watergate Hotel

- Midgut microbiota diversity of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus*
(Say)



Poster No. 70

Abstracts
POSTER PRESENTATIONS

MIDGUT MICROBIOTA DIVERSITY OF *Aedes aegypti* (LINNAEUS) AND *Culex quinquefasciatus* (SAY)

Sonthaya Tiawsirisup¹, Jirirut Sirijutaluk¹, Mananya Sondang¹,
Manunya Supol¹, Nut Ansusinha¹, Ranida Tuanudom²,
Channarong Rodkum³

¹ Animal Vector-Borne Disease Research Group, Parasitology Unit, Department of
Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand

² Interdisciplinary Program of Biomedical Science, Faculty of Graduate School,
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

³ Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn
University, Bangkok, Thailand

Aedes aegypti and *Culex quinquefasciatus* are important mosquito vectors for many infectious diseases. A number of factors affect vector competence of these mosquitoes for a specific pathogen. The bacteria harbored in the midgut are known to influence the mosquito physiology and can alter the response to various pathogens. Bacteria from midgut of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* were cultured and identified by using bacteriological and molecular techniques in this study in which two groups of mosquitoes were examined. The first group was field collected mosquitoes from two areas of Bangkok: Suanluang and Laksi district. The second group was laboratory rearing mosquitoes. Three bacterial genera (*Bacillus*, *Micrococcus*, and *Staphylococcus*) were identified from field collected *Ae. aegypti* in Suanluang district. Seven bacterial genera (*Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, and *Streptococcus*) were identified from field collected *Ae. aegypti* in Laksi district. Twelve bacterial genera (*Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Chryseomicrobium*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, and *Staphylococcus*) were identified from laboratory rearing *Ae. aegypti*. Six bacterial genera (*Chryseobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Providencia*, and *Staphylococcus*) were identified from field collected *Cx. quinquefasciatus* in Suanluang district. Eleven bacterial genera (*Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, and *Staphylococcus*) were identified from field collected *Cx. quinquefasciatus* in Laksi district. Five bacterial genera (*Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, and *Staphylococcus*) were identified from laboratory rearing *Cx. quinquefasciatus*. The variation of these midgut microbiota may influence mosquito vector competence for a specific pathogen. However, further studies need to be performed to indicate this relationship. ❧

Keywords: bacteria, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*

การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ Joint International Tropical Medicine Meeting 2015
ในระหว่างวันที่ 2-4 ธันวาคม 2558 ณ Amari Watergate Hotel

- Midgut microbiota diversity of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* (Say)



Midgut microbiota diversity of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* (Say)

Sonthaya Tiawsirisup^{1*}, Jirinut Sirijataluk¹, Mananya Sondang¹, Manunya Supol¹,
Nut Anusinha¹, Ranida Tuanudom, R.^{1, 3}, Channarong Rodkum²

¹Animal Vector-Borne Diseases Research Group, Parasitology Unit, Department of Veterinary Pathology,
Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
²Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
³Interdisciplinary Program of Biomedical Science, Faculty of Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

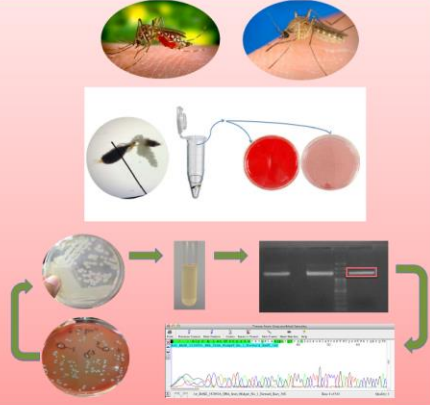
Introduction

Aedes aegypti and *Culex quinquefasciatus* are important mosquito vectors for many infectious diseases. A number of factors affect vector competence of these mosquitoes for a specific pathogen.

The bacteria harbored in the midgut are known to influence the mosquito physiology and can alter the response to various pathogens. However, the knowledge of the microorganism diversity within mosquito vector is limited.

A better understanding of midgut microbiota diversity and the mechanisms that are involved in the process of pathogen propagation and the maintenance of these in the mosquitoes are required.

Results and Conclusions



Materials and Methods

Mosquitoes: Laboratory rearing and field collected *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* were examined. Field mosquitoes were collected from Lak Si and Suan Luang district, Bangkok, Thailand.

Midgut dissecting: After washing in 70% ethanol and PBS, the midgut was dissected from each mosquito. The midgut then was kept in 60% glycerol and ground by using sterile plastic pestle.

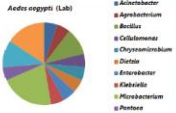
Bacteria isolation and identification from mosquito midgut: Bacteria from the midgut were cultured and identified by using bacteriological and molecular techniques.

Bacteriological technique : The midgut sample was examined by using pour plate and spread plate technique. Pure bacterial colonies were then examined by using gram staining and molecular techniques.

Molecular technique: Bacterial DNA was extracted by using boiling method and examined by using PCR technique. Two universal primers for 16s rRNA gene of bacteria were used in this study (Marchesi et al. 1998; Dinparast Djadid et al. 2011). The PCR product was purified, sequenced, analysed, and blasted with the data in GenBank.

Midgut microbiota in each mosquito group showed in the following figures

***Aedes aegypti* (Lab)**



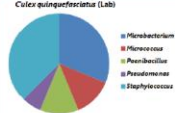
***Aedes aegypti* (Lak Si)**



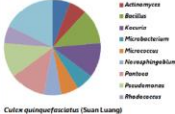
***Aedes aegypti* (Suan Luang)**



***Culex quinquefasciatus* (Lab)**



***Culex quinquefasciatus* (Lak Si)**



***Culex quinquefasciatus* (Suan Luang)**



These findings indicate the variation of midgut microbiota. This variation may influence mosquito vector competence. However, further studies need to be performed to indicate this relationship.

Acknowledgements

This study was supported by the Thailand Research Fund and Chulalongkorn University (RSA 5680030) and Special Task Force for Activating Research, Chulalongkorn University (GSTAR 59-001-31-001).

References

Marchesi, JR et al. 1998. Appl Environ Microbiol 64(2):795-9.
Dinparast Djadid, N et al. 2011. PLoS One 6(12):e28484.

Chikungunya virus infection in BALB/c and ICR mouse models

Tiawsirisup, S.^{1*}, Tuanudom, R.^{1,2} and Yurayart, N.¹

¹Animal Vector-Borne Disease Research Group, Parasitology Unit,
Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Interdisciplinary Program of Biomedical Science, Faculty of Graduate School,
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

*Corresponding author email: sonthaya.t@chula.ac.th

Abstract. Chikungunya virus (CHIKV) infection is an emerging or re-emerging infectious disease found in several countries. The ecology of this virus involves humans, reservoir animals, and mosquito vectors. Two experiments were conducted in this study. For the first experiment, BALB/c mice were inoculated with $10^{6.3}$ CID₅₀/mouse and blood samples were collected and tested for CHIKV infection by using immunocytochemistry (ICC) and reverse transcription polymerase reaction (RT-PCR). The mean CHIKV titers in BALB/c mice were $10^{3.3}$, $10^{1.5}$, $10^{2.3}$, and $10^{2.3}$ CID₅₀/ml of serum on day 1 to day 4 post inoculation (PI), respectively. All serum samples of day 1 and day 2 PI were positive for CHIKV by using RT-PCR. For the second experiment, there were two groups of ICR mice. In the first group or immunosuppressed ICR group, mice were injected with 100 µg of dexamethasone for 14 days. In the second group or control ICR group, mice were injected with 0.1 ml of normal saline for 14 days. All mice were then inoculated with $10^{6.3}$ CID₅₀/mouse. Blood samples were collected and tested for CHIKV infection by using ICC and RT-PCR. For the

immunosuppressed ICR group, the mean CHIKV titers in mice were $10^{2.7}$, $10^{3.0}$, $10^{4.7}$, $10^{3.5}$, $10^{2.8}$, $10^{3.0}$, and $10^{2.5}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ of serum on day 1 to day 7 PI, respectively. All serum samples of day 1 to day 5 PI were positive for CHIKV by using RT-PCR. For the control ICR group, the mean CHIKV titers in mice were $10^{2.0}$, $10^{1.0}$, $10^{2.4}$, $10^{3.5}$, $10^{3.0}$, $10^{2.7}$, and $10^{1.5}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ of serum on day 1 to day 7 PI, respectively. All serum samples of day 1 PI were positive for CHIKV by using RT-PCR.

INTRODUCTION

Chikungunya virus (CHIKV) is an emerging or re-emerging mosquito-borne virus belonging to *Alphavirus* genus of the *Togaviridae* family which was first discovered in Tanzania in 1952. It is an enveloped, single-stranded, positive-sense RNA virus. CHIKV can be classified into four lineages: West Africa, East Central and South Africa, Asian, and Indian Ocean lineage. The large outbreak of this virus occurred in different geographic regions including Africa and the Indian Ocean basin (Thaikruea *et al.*, 1997; Kishishita *et al.*, 2015; Sasayama *et al.*, 2014; Duong *et al.*, 2012). Lately, this virus has emerged and spread throughout the Americas (Alpuche Aranda & Lopez-Gatell, 2015; Donalisio & Freitas, 2015; Diaz *et al.*, 2015; de Figueiredo & Figueiredo, 2014). CHIKV was first identified in Thailand in 1958 and was re-emerged in Thailand in 2008. The virus of Asian lineage was circulated in the past but the virus that was responsible for the recent outbreak in Thailand had different genome sequences (Theamboonlers *et al.*, 2009). The Asian lineage was the virus strain that respond for the outbreak in the past in Thailand but the Indian Ocean lineage (IOL) was responsible for the outbreak in the present in Thailand. There are the differences between E1 envelope glycoprotein sequences. The present study also indicated an alanine-to-valine substitution at the position 226 of the E1 envelope glycoprotein (E1-A226V) on an IOL.

Transmission cycle of CHIKV might be divided into two cycles: urban and sylvatic life cycle. Infected humans and mosquitoes play an important role in the transmission in an urban cycle, but infected animals and mosquitoes are responsible for the transmission in a sylvatic cycle (Jupp & Kemp, 1996; Vourc'h *et al.*, 2014). Mice and nonhuman primates have been used as animal models for studying CHIKV infection, pathogenesis, immune response, and treatment (Dhanwani *et al.*, 2014; Ziegler *et al.*, 2008; Tretyakova *et al.*, 2014; Long *et al.*, 2013; Teo *et al.*, 2013; Higgs & Ziegler, 2010; Chen *et al.*, 2010; Labadie *et al.*, 2010). However, the roles of animals in the epidemiology of CHIKV are poorly understood.

There were few studies of animal infections and the virus strain that were responsible for the current outbreak in Thailand (Tiawsirisup *et al.*, 2012). More studies need to be performed to address the role and relationship between animals and mosquitoes in the ecology of this virus in Thailand. This study was conducted to explore the possible role of mice as animal models for CHIKV infection. CHIKV infections in BALB/c and ICR mice were examined in this study.

MATERIALS AND METHODS

Virus and cell culture

Thailand 2010 strain of Chikungunya virus (CHIKV) was used in this study. This virus was originally isolated from an infected patient during the outbreak in southern Thailand in 2010. It is in the Indian Ocean lineage (IOL) with an alanine-to-valine substitution at the position 226 of the E1 envelope glycoprotein (E1-A226V). It was kindly provided by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand. CHIKV was propagated and assayed in Vero-76 cells.

Virus assay

Ten-fold dilution of CHIKV in mice inoculum and inoculated mice serum samples were assayed for an amount of virus in Vero-76 cells by using immunocytochemistry (ICC) staining. Samples were inoculated in Vero-76 cells in 96-well-plate for three days. Inoculated cells were then fixed with 4% formaldehyde at room temperature for 25 minutes and washed three times with 0.5% tween in Phosphate Buffer Saline (PBS). Mouse monoclonal antibody to CHIKV (abcam®, USA) was added and incubated at room temperature for two hours. The plate was then washed with 0.5% tween in PBS for three times. Polyclonal rabbit anti- mouse immunoglobulins/HRP (Dako, Denmark) was added and incubated at room temperature for two hours. The plate was then washed with 0.5% tween in PBS for three times. AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) substrate (Sigma-Aldrich, USA) was added and incubated at room temperature for one hour. The plate was then washed with distilled water, dried at room temperature, and examined under light microscope. Single measurement with four wells of inoculated cells was used for virus titer examination by using ICC. Infected cells indicated by the red brown color in the cells. Virus titers of CHIKV in mice inoculum and inoculated mice serum samples were expressed as $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ (Reed & Muench, 1938).

Viral nucleic acid extraction

Viral nucleic acid was extracted from mice inoculum and individual mouse serum sample by using viral nucleic acid extraction kit II (Geneaid, Taiwan) following the manufacturer's instructions. The extracted nucleic acid was kept at -80°C until tested.

Reverse transcription polymerase chain reaction

Each extracted viral nucleic acid sample was tested for CHIKV by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), which was adapted from CV *et al.* (2007) and

Theamboonlers *et al.* (2009) with slight modification. The primers used in this study were DVRChk-Reverse 5'GGGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA3' and DVRChk-Forward 5'ACCGGCGTCTACCCATTCATGT3' (CV *et al.*, 2007). The PCR product was analyzed in 2% agarose gel with expected 330 base pair band.

Experiment animals and design

CHIKV infection in BALB/c (*Mus musculus*) and ICR (*Mus musculus*) mice were examined in this study. This study was approved by the Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee (Animal Use Protocol and Approval No.1031038). BALB/c and ICR mice used in this study were provided by the National Laboratory Animal Center, Thailand. They were colonized in the close system and free from the pathogens. There were 10 BALB/c mice and 28 ICR mice used in this study. There were two experiments conducted in this study.

For the first experiment, four-week-old BALB/c mice were inoculated with 0.2 ml of CHIKV (10^7 CID₅₀/ml) by intraperitoneal (IP) route. Two to three mice were sampled daily for four days post inoculation (PI). Blood was collected from sampled mice and tested for CHIKV infection by using immunocytochemistry (ICC) staining and reverse transcription polymerase reaction (RT-PCR). The mice were then euthanized after blood collection.

For the second experiment, two groups of ICR mice were used. In the first group or immunosuppressed group, four-week-old ICR mice were injected with 0.1 ml or 100 µg of dexamethasone by IP route for 14 days. In the second group or control group, four-week-old mice were injected with 0.1 ml of normal saline by IP route for 14 days. All mice were then inoculated with 0.2 ml of CHIKV (10^7 CID₅₀/ml) by IP route. Two mice from each group were sampled daily for seven days PI. Blood was collected from sampled mice and tested for CHIKV infection by using ICC staining and RT-PCR. The mice were then euthanized after blood collection.

The inoculated mice were also observed for the joint pain and walking difficulty to indicated the symptoms of Chikungunya virus infection.

RESULTS

Chikungunya virus (CHIKV) infection in BALB/c and ICR mice were examined in this study. BALB/c mice were intraperitoneal (IP) inoculated with CHIKV by needle injection. CHIKV viremia developed in all 10 BALB/c mice, which was indicated by using immunocytochemistry (ICC) staining. The blood samples were collected after inoculation by using heart puncture. The virus recovered from the blood samples were the virus that was replicated in the mice. If the virus cannot replicate in the mice, it will not be detected in the blood circulation. Immunohistochemistry also indicated live virus in the mice. If the virus cannot replicate in the virus, it will be died shortly and cannot be detected by using immunocytochemistry (ICC). Infected cells indicated by the red brown color in the cells (Figure 1).

Viremia titers in BALB/c mice peaked on day 1 and day 4 post inoculation (PI) with the titer of $10^{4.0}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ of serum. The mean CHIKV levels in BALB/c mice were $10^{3.3}$, $10^{1.5}$, $10^{2.3}$, and $10^{2.3}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ of serum on day 1 to day 4 post inoculation (PI), respectively, which was indicated by using ICC staining. All serum samples of day 1 and day 2 PI were positive for CHIKV but only two serum samples (2/3) of day 3 and one serum sample (1/3) of day 4 PI were positive for CHIKV by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Table 1 and Figure 2).

There were two groups of ICR mice in this study. Mice in the immunosuppressed group were injected with dexamethasone and mice in the control group were injected with normal saline by IP route for 14 days before virus inoculation. Mice in both

immunosuppressed and control group were IP inoculated with CHIKV by needle injection. CHIKV viremia developed in all 14 mice in the immunosuppressed group and 12 mice in the control group, which was indicated by using ICC staining. Viremia titers in mice in the immunosuppressed group peaked on day 3 PI with the titer of $10^{6.0}$ CID₅₀/ml of serum but viremia titers in mice in the control group peaked on day 4 and day 5 PI with the titer of $10^{3.5}$ CID₅₀/ml of serum.

The mean CHIKV titers in mice in the immunosuppressed group were $10^{2.7}$, $10^{3.0}$, $10^{4.7}$, $10^{3.5}$, $10^{2.8}$, $10^{3.0}$, and $10^{2.5}$ CID₅₀/ml of serum on day 1 to day 7 PI, respectively, which was indicated by using ICC staining. All serum samples of day 1 to day 5 PI were positive for CHIKV, but only one serum sample (1/2) of day 6 PI was positive for CHIKV by using RT-PCR. The mean CHIKV titers in mice in the control group were $10^{2.0}$, $10^{1.0}$, $10^{2.4}$, $10^{3.5}$, 10^3 , $10^{2.7}$, and $10^{1.5}$ CID₅₀/ml of serum on day 1 to day 7 PI, respectively, which was indicated by using ICC staining. All serum samples of day 1 PI were positive for CHIKV, but only one serum sample (1/2) of day 2 PI and one serum sample (1/2) of day 4 PI were positive for CHIKV by using RT-PCR (Table 2 and Figure 1). No signs of illness were observed in all CHIKV-infected BALB/c and ICR mice during the study period.

DISCUSSION

This study was conducted to examine the possibility of using BALB/c (inbred) and ICR (outbred) mice as animal models for studying Thailand strain of Chikungunya virus (CHIKV) infection and pathogenesis. Infected animal models were also needed as sources of infected blood meal for vector competence study. CHIKV used in this study was isolated from an infected patient during the outbreak of CHIKV in Thailand in 2010. The study by Theamboonlers *et al.* (2009) indicated that the genome sequences of CHIKV isolated from

the outbreak in Thailand in 2008 were different from the virus isolated from the outbreak in Thailand in 1988 and during 1995-1996. Thailand 2010 strain of CHIKV used in this study is in the Indian Ocean lineage (IOL) with an alanine-to-valine substitution at the position 226 of the E1 envelope glycoprotein (E1-A226V). It is in the same lineage as 2008 Thailand strain but it is difference from 1995 Thailand strain. There are 94% similarity between 2008 Thailand and 1995 Thailand strain. Chikungunya virus Thailand 2008 were also closely related to the strains isolated from the outbreaks in Singapore in 2008 and in India in 2007 (99-100%).

The study on mosquito vector competence of CHIKV indicated that the mosquito species that were responsible for the current outbreak included *Aedes albopictus* whereas *Ae. aegypti* were responsible for the previous outbreak in Thailand (Thavara *et al.*, 2009). Tsetsarkin *et al.* (2007) also specified that *Ae. albopictus* were more potential vectors for CHIKV than *Ae. aegypti* due to the mutation of the virus which allowed them to adapt to different mosquito vectors in the past.

One group of BALB/c mice and two groups of ICR mice were examined in this study. All mice in this study were intraperitoneal (IP) inoculated with 0.2 ml of 10^7 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ of CHIKV or $10^{6.3}$ CID_{50} of CHIKV/mouse. Mice in the immunosuppressed ICR group were injected with dexamethasone and mice in the control ICR group were injected with normal saline. Having been injected with dexamethasone for two weeks, the immunosuppressed ICR mice showed signs of reduced weight gain when compared with the control ICR mice. CHIKV viremia developed in all BALB/c and immunosuppressed ICR mice, which was indicated by using immunocytochemistry (ICC) staining. However, the highest viremia titers were found in the immunosuppressed ICR mice.

Dexamethasone used in the immunosuppressed ICR mice might affect CHIKV infection in ICR mice. Nevertheless, further studies are needed to confirm this finding. Other

factors such as inoculum doses and routes of infection might be involved in animal infections. In this study, the mice were only inoculated with virus by IP route. Mice inoculation by using other routes such as intramuscular, intravenous, and subcutaneous should be examined for the investigation of the effect of inoculum route on duration of infection, peak of viremia, and pathogenesis. There was only one mouse in the immunosuppressed group whose virus titer reached $10^{6.0}$ $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ of serum. More virus in mouse inoculum might be needed to gain higher viremia in inoculated mice. However, additional studies need to be undertaken to evaluate this possibility.

Clinical signs and symptoms found in infected patients during the outbreak of CHIKV in Thailand ranged from no clinical sign, fever, joint pain, polyarthritis, meningoencephalitis to myeloneuropathy (Chusri *et al.*, 2011; Nakkhara *et al.*, 2013; Appassakij *et al.*, 2013). The study on infection and pathogenesis of other CHIKV isolates and mice models indicated lethargy, walking difficulty, hind limb dragging, arthritis, and reduced weight gain (Gardner *et al.*, 2010; Ziegler *et al.*, 2008). However, no signs of illness were observed in any of the CHIKV-infected BALB/c and ICR mice in this study. CHIKV infections in wild mice in Thailand also need to be studied to understand the roles of wild mice in the epidemiology of CHIKV in Thailand.

Acknowledgements. This study was supported by the Thailand Research Fund and Chulalongkorn University (RSA 5680030) and Special Task Force for Activating Research, Chulalongkorn University (GSTAR 57-003-31-001). The authors would like to thank the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand for Chikungunya virus and Dr. Suphawatt Pookcharoen for the manuscript editing and proofreading.

REFERENCES

- Alpuche Aranda, C. M. & Lopez-Gatell, H. (2015). Chikungunya, the 2014, emerging infectious diseases in the Americas. *Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery* **10**: 6-7.
- Appassakij, H., Khuntikij, P., Kemapunmanus, M., Wutthanarungsan, R. & Silpapojakul, K. (2013). Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? *Transfusion* **53**: 2567-2574.
- Chen, C. I., Clark, D. C., Pesavento, P., Lerche, N. W., Luciw, P. A., Reisen, W. K. & Brault, A. C. (2010). Comparative pathogenesis of epidemic and enzootic Chikungunya viruses in a pregnant Rhesus macaque model. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **83**: 1249-1258.
- Chusri, S., Siripaitoon, P., Hirunpat, S. & Silpapojakul, K. (2011). Case reports of neuro-Chikungunya in southern Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **85**: 386-389.
- CV, M. N. K., Anthony Johnson, A. M. & DV, R. S. G. (2007). Molecular characterization of chikungunya virus from Andhra Pradesh, India & phylogenetic relationship with Central African isolates. *The Indian Journal of Medical Research* **126**: 534-540.
- de Figueiredo, M. L. & Figueiredo, L. T. (2014). Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **47**: 677-683.
- Dhanwani, R., Khan, M., Lomash, V., Rao, P. V., Ly, H. & Parida, M. (2014). Characterization of chikungunya virus induced host response in a mouse model of viral myositis. *PLoS One* **9**: e92813.

- Diaz, Y., Carrera, J. P., Cerezo, L., Arauz, D., Guerra, I., Cisneros, J., Armien, B., Botello, A. M., Arauz, A. B., Gonzalez, V., Lopez, Y., Moreno, L., Lopez-Verges, S. & Moreno, B. A. (2015). Chikungunya virus infection: first detection of imported and autochthonous cases in panama. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **92**: 482-485.
- Donalisio, M. R. & Freitas, A. R. (2015). Chikungunya in Brazil: an emerging challenge. *Revista Brasileira de Epidemiologia* **18**: 283-285.
- Duong, V., Andries, A. C., Ngan, C., Sok, T., Richner, B., Asgari-Jirhandeh, N., Bjorge, S., Huy, R., Ly, S., Laurent, D., Hok, B., Roces, M. C., Ong, S., Char, M. C., Deubel, V., Tarantola, A. & Buchy, P. (2012). Reemergence of Chikungunya virus in Cambodia. *Emerging Infectious Diseases* **18**: 2066-2069.
- Gardner, J., Anraku, I., Le, T. T., Larcher, T., Major, L., Roques, P., Schroder, W. A., Higgs, S. & Suhrbier, A. (2010). Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. *Journal of Virology* **84**: 8021-8032.
- Higgs, S. & Ziegler, S. A. (2010). A nonhuman primate model of chikungunya disease. *Journal of Clinical Investigation* **120**: 657-660.
- Jupp, P. G. & Kemp, A. (1996). What is the potential for future outbreaks of chikungunya, dengue and yellow fever in southern Africa? *The South African Medical Journal* **86**: 35-37.
- Kishishita, N., Sasayama, M., Takeda, N., Sa-Ngasang, A., Anuegoonpipat, A. & Anantapreecha, S. (2015). Neutralization activity of patient sera collected during the 2008-2009 Chikungunya outbreak in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology* **53**: 184-190.

- Labadie, K., Larcher, T., Joubert, C., Mannioui, A., Delache, B., Brochard, P., Guigand, L., Dubreil, L., Lebon, P., Verrier, B., de Lamballerie, X., Suhrbier, A., Cherel, Y., Le Grand, R. & Roques, P. (2010). Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *The Journal of Clinical Investigation* **120**: 894-906.
- Long, K. M., Whitmore, A. C., Ferris, M. T., Sempowski, G. D., McGee, C., Trollinger, B., Gunn, B. & Heise, M. T. (2013). Dendritic cell immunoreceptor regulates Chikungunya virus pathogenesis in mice. *Journal of Virology* **87**: 5697-5706.
- Nakkhara, P., Chongsuvivatwong, V. & Thammapalo, S. (2013). Risk factors for symptomatic and asymptomatic chikungunya infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **107**: 789-796.
- Reed, L.J. & Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene* **27**: 493-497
- Sasayama, M., Benjathummarak, S., Kawashita, N., Rukmanee, P., Sangmukdanun, S., Masrinoul, P., Pitaksajakul, P., Puiprom, O., Wuthisen, P., Kurosu, T., Chaichana, P., Maneekan, P., Ikuta, K., Ramasoota, P., Okabayashi, T., Singhasivanon, P. & Luplertlop, N. (2014). Chikungunya virus was isolated in Thailand, 2010. *Virus Genes* **49**: 485-489.
- Teo, T. H., Lum, F. M., Claser, C., Lulla, V., Lulla, A., Merits, A., Renia, L. & Ng, L. F. (2013). A pathogenic role for CD4⁺ T cells during Chikungunya virus infection in mice. *The Journal of Immunology* **190**: 259-269.
- Thaikruea, L., Charearnsook, O., Reanphumkarnkit, S., Dissomboon, P., Phonjan, R., Ratchbud, S., Kounsang, Y. & Buranapiyawong, D. (1997). Chikungunya in Thailand: a re-emerging disease? *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **28**: 359-364.

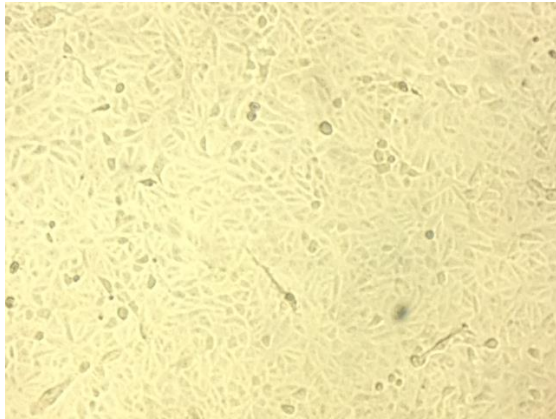
- Thavara, U., Tawatsin, A., Pengsakul, T., Bhakdeenuan, P., Chanama, S., Anantapreecha, S., Molito, C., Chompoosri, J., Thammapalo, S., Sawanpanyalert, P. & Siriyasatien, P. (2009). Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **40**: 951-962.
- Theamboonlers, A., Rianthavorn, P., Praianantathavorn, K., Wuttirattanakowit, N. & Poovorawan, Y. (2009). Clinical and molecular characterization of chikungunya virus in South Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **62**: 303-305.
- Tiawsirisup, S., Rattanakampol, P., Navavichit, W. and Ratpiyapaporn, H. (2012). Experimental infection of mice and baby chickens with Thailand strain of Chikungunya virus. *The Thai Journal of Veterinary Medicine* **42**: 353-358.
- Tretyakova, I., Hearn, J., Wang, E., Weaver, S. & Pushko, P. (2014). DNA vaccine initiates replication of live attenuated chikungunya virus in vitro and elicits protective immune response in mice. *The Journal of Infectious Diseases* **209**: 1882-1890.
- Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E. & Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathogens* **3**: e201.
- Vourc'h, G., Halos, L., Desvars, A., Boue, F., Pascal, M., Lecollinet, S., Zientara, S., Duval, T., Nzonza, A. & Bremont, M. (2014). Chikungunya antibodies detected in non-human primates and rats in three Indian Ocean islands after the 2006 ChikV outbreak. *Veterinary Research* **45**: 52.
- Ziegler, S. A., Lu, L., da Rosa, A. P., Xiao, S. Y. & Tesh, R. B. (2008). An animal model for studying the pathogenesis of chikungunya virus infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **79**: 133-139.

Table 1. Chikungunya virus (CHIKV) viremia in BALB/c mice on day 1 to day 4 post inoculation (PI) by using immunocytochemistry (ICC) staining and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

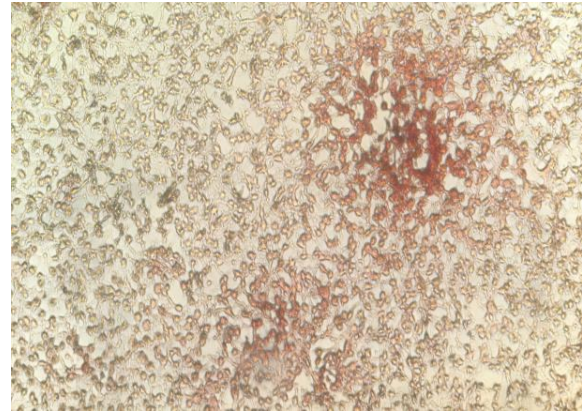
Day (PI)	BALB/c mice	
	Mean virus titers (10 [^] CID ₅₀ /ml)	RT-PCR
1	3.3 (2.5, 4.0)	+/+
2	1.5 (1.5, 1.5)	+/+
3	2.3 (1.5, 2.5, 3.0)	+/+/-
4	2.3 (1.5, 1.5, 4.0)	-/-/+

Table 2. The comparison of Chikungunya virus (CHIKV) viremia between immunosuppressed ICR and control ICR group of mice on day 1 to day 7 post inoculation (PI) by using immunocytochemistry (ICC) staining and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Day (PI)	Immunosuppressed ICR mice group		Control ICR mice group	
	Mean virus titers (10 [^] CID ₅₀ /ml)	RT-PCR	Mean virus titers (10 [^] CID ₅₀ /ml)	RT-PCR
1	2.7 (2.5, 2.8)	+/+	2.0 (1.5, 2.5)	+/+
2	3.0 (2.5, 3.5)	+/+	1.0 (0, 2.0)	-/+
3	4.7 (3.3, 6.0)	+/+	2.4 (2.3, 2.5)	-/-
4	3.5 (3.5, 3.5)	+/+	3.5 (3.5, 3.5)	-/+
5	2.8 (2.5, 3.0)	+/+	3.0 (2.5, 3.5)	-/-
6	3.0 (2.5, 3.5)	+/-	2.7 (2.5, 2.8)	-/-
7	2.5 (2.5, 2.5)	-/-	1.5 (0, 3.0)	-/-



Vero cell (negative control)



Vero cell infected with Chikungunya virus

Figure 1. Comparison between negative control and Chikungunya virus infected Vero cell indicated by using immunocytochemistry (ICC)

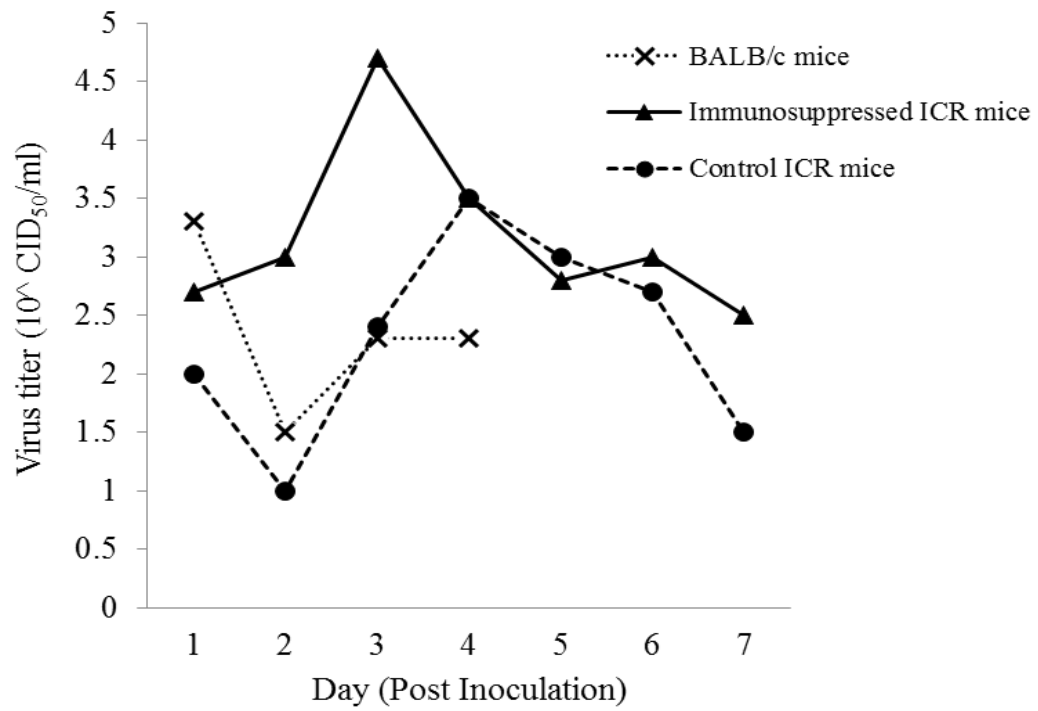


Figure 2. The comparison of Chikungunya virus (CHIKV) viremia among BALB/c, immunosuppressed ICR, and control ICR group of mice on day 1 to day 7 post inoculation (PI) by using immunocytochemistry (ICC) staining.

Midgut microbiota diversity of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* (Say)

Sonthaya Tiawsirisup^{1*}, Jirinut Sirijutaluk¹, Mananya Sondang¹, Manunya Supol¹,
Nut Ansusinha¹, Ranida Tuanudom, R.^{1,3}, Channarong Rodkum²

¹Animal Vector-Borne Disease Research Group, Parasitology Unit, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

³Interdisciplinary Program of Biomedical Science, Faculty of Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

*Corresponding author email: sonthaya.t@chula.ac.th

Abstract *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* are important mosquito vectors for many infectious diseases. A number of factors affect vector competence of these mosquitoes for a specific pathogen. The bacteria harbored in the midgut are known to influence the mosquito physiology and can alter the response to various pathogens. Bacteria from midgut of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* were isolated and identified by using bacteriological and molecular techniques in this study in which two groups of mosquitoes were examined. The first group was field collected mosquitoes from two areas of Bangkok: Suanluang and Laksi district. The second group was laboratory rearing mosquitoes. Three bacterial genera (i.e., *Bacillus*, *Micrococcus*, and *Staphylococcus*) were identified from field collected *Ae. aegypti* from Suanluang district. Seven bacterial genera (i.e., *Cellulomonas*, *Microbacterium*,

Micrococcus, *Moraxella*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, and *Streptococcus*) were identified from field collected *Ae. aegypti* from Laksi district. Twelve bacterial genera (i.e., *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Chryseomicrobium*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, and *Staphylococcus*) were identified from laboratory rearing *Ae. aegypti*. Six bacterial genera (i.e., *Chryseobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Providencia*, and *Staphylococcus*) were identified from field collected *Cx. quinquefasciatus* from Suanluang district. Eleven bacterial genera (i.e., *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, and *Staphylococcus*) were identified from field collected *Cx. quinquefasciatus* from Laksi district. Five bacterial genera (i.e., *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, and *Staphylococcus*) were identified from laboratory rearing *Cx. quinquefasciatus*. The variation of these midgut microbiota may influence mosquito vector competence for a specific pathogen. However, further studies need to be performed to indicate this relationship.

Keywords: bacteria, biodiversity, midgut, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, Thailand

Introduction

Aedes aegypti (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* (Say) are important mosquito vectors that can be found worldwide and throughout Thailand. They are nuisance insects and important vectors for many infectious diseases. *Ae. aegypti* play important roles as vectors for many filarial nematodes and viruses particularly Zika and dengue virus (Ariani et al. 2015; da Moura et al. 2015; Diallo et al. 2008; Monaghan et al. 2016; Richard et al. 2016; Tiawsirisup and Nithiuthai 2006; Watson and Kay 1999). *Cx. quinquefasciatus* are also important vectors for filarial nematodes, protozoa, and many viruses such as canine heartworm caused by

Dirofilaria immitis, avian malaria caused by *Plasmodium gallinaceum*, West Nile virus, and Rift Valley fever virus (Ahid et al. 2000; Sudeep et al. 2015; Tiawsirisup and Nithiuthai 2006; Turell et al. 2007; Vargas and Beltran 1941).

Vertebrate host, pathogen, and mosquito vector factors affect vector competence of mosquitoes for a specific pathogen. Pathogen infection in mosquito can occur only in the mosquito's midgut since the structure of the midgut is different from foregut and hindgut. The midgut of mosquito vector contains not only pathogens, but also a diverse microbiota (Dennison et al. 2014). Midgut microbiota are the bacteria that have co-evolved and developed symbiotic relationships with mosquitoes or the bacteria that are acquired from the mosquito's breeding water or nectar sources, and they have adapted to persist within the mosquitoes.

These bacteria influence the mosquito physiology, the susceptibility of the mosquitoes to specific pathogens, the response to various pathogens, and ability to transmit the pathogen. Midgut microbiota in the mosquitoes are also diverse depend on species, sex of the mosquito, developmental stage of the mosquito, ecological factors, and geographic locations. However, the reduction in bacteria diversity can be found during the metamorphosis (Kim et al. 2015).

Some studies have suggested a potential role of microbiota in the biology and vector competence of mosquitoes. The mosquito's midgut microbiota can modulate the mosquito immune response and affect vector competence to pathogens. The microbiota can also manipulate mosquito competence by impairing pathogen infection through resource competition or antipathogen molecule secretion. These observations have encouraged the recent development of new mosquito control methods based on the use of symbiotically-modified mosquitoes to interfere with pathogen transmission or reduce the host reproduction and life span (Minard et al. 2013).

Studying about the diversity of the midgut microbiota will be the basic knowledge for the advance study of the relationship between midgut microbiota and specific pathogen infection and transmission in the mosquito vectors. Understanding of the role of the mosquito microbiota in modulating infections with pathogen is importance. However, the information about midgut microbiota of mosquitoes from Thailand is limited. This study was conducted to access the diversity of midgut microbiota of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* from Thailand. This is the basic and important information for the advance research on mosquito vector competence and mosquito control in Thailand.

Materials and methods

Mosquitoes

Laboratory rearing and field collected *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* were examined in this study. Laboratory mosquitoes were reared and maintained at the parasitology laboratory, Parasitology Unit, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. Field mosquitoes were collected from Suan Luang and Lak Si district, Bangkok, Thailand by using BG-Sentinel mosquito trap (Biogents[®], Germany).

The mosquitoes were then kept at 4°C for 20 minutes and identified under a light microscope. Only female mosquitoes were examined in this study. The sampling mosquitoes were washed in 70% ethanol for 5 minutes and phosphate buffer saline (PBS). After washing, the midgut was dissected from each mosquito under a light microscope. The midguts then were kept in 300 microliters of 60% glycerol in PBS, ground by using sterile plastic pestle, and kept at -80°C until tested.

Bacteria isolation and identification from mosquito midgut

Bacteria from midgut of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* were isolated and identified by using bacteriological and molecular techniques.

Bacteriological technique

The ground midgut from each mosquito was separated into three parts. The first part, 50 microliters of the ground midgut were examined for the total colonies by using pour plate technique. The sample was mixed with plate count agar (PCA) and poured into a plastic petri dish. The petri dish was kept at 37°C for 24-48 hours and counted for bacterial colonies. If the total colonies of bacteria were higher than 250 colonies, the ground midgut was diluted and the total colonies were examined again by using pour plate.

The second part, 50 microliters of the ground midgut were examined for the bacterial colonies by using spread plate technique. Trypticase soy agar (TCA) with 5% sheep blood was used in this technique. The midgut was streaked over an agar surface by four-way cross streak method. The streaked plate then was kept at 37°C for 24-48 hours and counted for bacterial colonies.

The third part, 50 microliters of the ground midgut were examined for the bacterial colonies by using spread plate technique. MacConkey agar (MAC) with 5% sheep blood was used in this technique. The midgut was streaked over an agar surface by four-way cross streak method. The streaked plate then was kept at 37°C for 24-48 hours and counted for bacterial colonies. The bacterial colonies were indicated as colony forming unit (CFU) per mosquito.

Each bacterial colony from spread plate technique was subcultured over TCA with 5% sheep blood by four-way cross streak method. The streaked plate then was kept at 37°C for 24-48 hours. Pure bacterial colonies were examined by using gram staining and molecular

techniques. Before examination by molecular technique, the pure bacterial colony was cultured in Luria-Bertani (LB) broth. Stock of the pure colony was kept in stock media at 37°C for 24 hours and transferred to room temperature.

Molecular technique

Bacterial DNA was extracted by using boiling method. The pure bacterial colony was cultured in two milliliters of LB broth at 37°C for 24-48 hours. It was centrifuged at 14,000 rpm for 15 minutes and the bacterial pellet was washed one time in distilled water. Forty microliters of distilled water were added into the bacterial pellet. It was kept at 100°C for 10 minutes, cooled down in the ice basket, and centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes. The supernatant (extracted DNA) was kept at -80°C until tested by using polymerase chain reaction and sequencing.

Polymerase chain reaction technique

The extracted bacterial DNA was examined by using polymerase chain reaction (PCR) technique. Two universal primers for 16s rRNA gene of bacteria were used in this study. The first pair of primer were 16 s Forward 5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' and 16 s Reverse 5'-GCT ACC TTG TTA CGA CTT C-3' (Dinparast Djadid et al. 2011) and the second pair of primer were 63F 5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3' and 1387R 5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3' (Marchesi et al. 1998). PCRs were performed in 25 µl-reaction. The PCR consisted of 1.5 µl of DNA template, 0.2 µl of Taq DNA polymerase (Platinum Taq DNA polymerase high fidelity, Invitrogen, USA), 2.5 µl of 10x PCR buffer, 0.5 µl of 10mM dNTP, 1 µl of 50 mM MgSO₄, 10 µM of forward primer, 10 µM of reverse primer, and 17.3 µl of distilled water. DNA was amplified by using thermocycler (Perkin Elmer Cetus 9600, Perkin Elmer, Waltham, MA).

Reaction for the first primer consisted of the initial denaturation at 94°C for 2 min, the amplification was carried out for 35 cycles with the following temperature cycling parameters: 94°C for 30 sec of denaturation, 55°C for 30 sec of annealing, and 68°C for 1 min 30 sec of extension. The final amplification cycle included an addition of 10 min extension at 72°C. The PCR product was mixed with loading buffer (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen, USA) and analyzed in 1.5% agarose gel (UltraPure™, Invitrogen, Carlsbad, CA) with expected 1.5 kilobase pair band.

Reaction for the second primer consisted of the initial denaturation at 94°C for 2 min, the amplification was carried out for 30 cycles with the following temperature cycling parameters: 95°C for 1 min of denaturation, 55°C for 1 min of annealing, and 72°C for 1 min 30 sec of extension. The final amplification cycle included an addition of 5 min extension at 72°C. The PCR product was mixed with loading buffer (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Invitrogen, USA) and analyzed in 1.5% agarose gel (UltraPure™, Invitrogen, Carlsbad, CA) with expected 1.3 kilobase pair band.

Bacterial DNA sequencing

After DNA amplification, the PCR product in agarose gel was purified by using Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan) according to the manufacturer's recommendation. The purified DNA was sequenced (First BASE Laboratories, Singapore), analysed by using Molecular Evolution Genetics Analysis (MEGA) 5.1, and blasted with the data in GenBank.

Results

This study was conducted to examine genera and diversity of bacteria in the midguts of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. Laboratory rearing and field collected mosquitoes were examined in this study. The field mosquitoes were collected from Suanluang and Laksi district, Bangkok, Thailand by using BG-Sentinel mosquito traps. Bacteria in the mosquito midguts were cultured and identified by using bacteriological and molecular techniques.

Sixteen laboratory rearing *Ae. aegypti* were examined and twelve bacterial genera (i.e., *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Chryseomicrobium*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, and *Staphylococcus*) were identified from this mosquito group (13/16). Three mosquitoes were free from the culturable bacteria in the midguts (3/16). The most common bacteria found in this mosquito group were *Microbacterium* (4/13).

Five field collected *Ae. aegypti* from Suanluang district were examined and three bacterial genera (i.e., *Bacillus*, *Micrococcus*, and *Staphylococcus*) were identified from this mosquito group (4/5). One mosquito was free from the culturable bacteria in the midgut (1/5). The most common bacteria found in this mosquito group were *Micrococcus* (2/4) and *Staphylococcus* (2/4).

Seven field collected *Ae. aegypti* from Laksi district were examined and seven bacterial genera (i.e., *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, and *Streptococcus*) were identified from this mosquito group (6/7). One mosquito was free from the culturable bacteria in the midgut (1/7). The most common bacteria found in this mosquito group were *Staphylococcus* (4/6) (Table 1 and 2).

Eleven laboratory rearing *Cx. quinquefasciatus* were examined and five bacterial genera (i.e., *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, and

Staphylococcus) were identified from this mosquito group (10/11). One mosquito was free from the culturable bacteria in the midgut (1/11). The most common bacteria found in this mosquito group were *Staphylococcus* (6/10).

Ten field collected *Cx. quinquefasciatus* from Suanluang district were examined and six bacterial genera (i.e., *Chryseobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Providencia*, and *Staphylococcus*) were identified from this mosquito group (7/10). Three mosquitoes were free from the culturable bacteria in the midgut (3/10). The most common bacteria found in this mosquito group were *Micrococcus* (3/7).

Eleven field collected *Cx. quinquefasciatus* from Laksi district were examined and eleven bacterial genera (i.e., *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, and *Staphylococcus*) were identified from this mosquito group (11/11). The most common bacteria found in this mosquito group were *Staphylococcus* (4/11) (Table 1 and 3).

Discussion

Mosquito midgut is a site of complex interactions among mosquito, pathogens, and resident microbiota. The variation of these bacteria may influence mosquito biology and vector competence for a specific pathogen. It may be one of the factors responsible for the difference in disease transmission rates or vector competence within mosquito population. The previous studies from various countries indicate the role and relation between mosquito midgut microbiota and vector competence for specific pathogen. However, the information about mosquito midgut microbiota and the relation between these bacteria and pathogens from Thailand is limited.

This study was performed to initiate the basic information about midgut microbiota from Thailand's mosquitoes. They were collected from two different areas in Bangkok,

Thailand to indicate the effect of environment conditions on the variation of mosquito midgut microbiota. Three bacterial genera were identified from field collected *Ae. aegypti* from Suanluang district. Seven bacterial genera were identified from field collected *Ae. aegypti* from Laksi district. Twelve bacterial genera were identified from laboratory rearing *Ae. aegypti*. Six bacterial genera were identified from field collected *Cx. quinquefasciatus* from Suanluang district. Eleven bacterial genera were identified from field collected *Cx. quinquefasciatus* from Laksi district. Five bacterial genera were identified from laboratory rearing *Cx. quinquefasciatus*.

The study by Chandel et al. (2013) indicated the midgut microbiota of female *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes collected from India. They examined 16S ribosomal DNA from culturable microflora and revealed the presence of 83 bacterial species belonging to 31 bacterial genera. Phylum Proteobacteria was the most dominant phylum (37 species), followed by Firmicutes (33 species) and Actinobacteria (13 species). The genus *Staphylococcus* was the largest genus represented by 11 species whereas *Enterobacter* was the most prevalent genus and recovered from most field stations. They found individual mosquito harbor extremely diverse gut bacteria and have very small overlap bacterial taxa in their gut.

Another study by Chandel et al. (2015) also indicated the isolation of *Vagococcus fluvialis* from *Cx. quinquefasciatus* mosquito midgut collected from India. This bacteria species was known from domestic animals and human sources only. This finding might confirm the hypothesis that microbiota are acquired from the mosquito's food sources. It is the first report of *V. fluvialis* from the midgut of *Cx. quinquefasciatus* mosquito collected from Arabian Sea coastal of India. However, this genus of bacteria was not isolated from our present study from Thailand.

The study by Valiente Moro et al. (2013) indicated that bacterial isolates from female *Ae. albopictus* mosquitoes were mostly Proteobacteria followed by Firmicutes and Actinobacteria. On the other hand, Actinobacteria was the most abundant phylum in male *Ae. albopictus* followed by Proteobacteria and Firmicutes. *Pantoea* was the most common genus in both females and males from all sampling sites. In our present study, *Pantoea* was isolated from laboratory rearing females *Ae. aegypti* and field collected female *Cx. quinquefasciatus* from Thailand.

For the midgut microbiota of *Anopheles* mosquitoes, the majority of the identified bacteria from *An. stephensi* and *An. maculipennis* from Iran were belonged to the gamma-proteobacteria class, including *Pseudomonas* and *Aeromonas*. The other bacteria found in these mosquitoes were *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Lysinibacillus* and *Rahnella* (Dinparast Djadid et al. 2011). *Acinetobacter*, *Bacillus*, and *Pseudomonas* are also found in the mosquitoes from Thailand which indicated by this present observation.

Another important bacterial endosymbiont in mosquitoes is *Wolbachia*. This bacterium blocks the transmission of dengue virus by *Ae. aegypti*. It is currently being evaluated for control of dengue outbreaks. *Wolbachia* induces cytoplasmic incompatibility that results in the developmental failure of offspring. However, only agar-culturable bacteria were examined in this study. *Wolbachia* infection in *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* cannot be indicated by the methodology used in this study.

In addition, the presence of antibiotics in the blood of infected people is a new risk of disease transmission increasing. For examples, antibiotics in malaria-infected people enhances the susceptibility of *An. gambiae* mosquitoes to malaria infection by disturbing their midgut microbiota. Antibiotics exposure also increases mosquito survival and fecundity, which are known to increase vector competency (Gendrin et al. 2015).

Future studies of the role of culturable bacteria in the biological role in the invasiveness of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* need to be performed. Isolated bacteria will be characterized to better understand its genetic contents and any possible influence on *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* vector competence.

Conclusion

The recent finding in this study indicates the diversity and variation of midgut microbiota of laboratory rearing and field collected *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* from Thailand. However, further investigations to verify the potential role of the detected bacteria in mosquitoes for the transmission of various pathogens are needed.

Acknowledgements This study was supported by the Thailand Research Fund and Chulalongkorn University (RSA 5680030), Special Task Force for Activating Research, Chulalongkorn University (GSTAR 59-001-31-001), and the Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.

References

- Ahid SM, Vasconcelos PS, Lourenco-de-Oliviera R (2000) Vector competence of *Culex quinquefasciatus* say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 95(6):769-75
- Ariani CV, Juneja P, Smith S, Tinsley MC, Jiggins FM (2015) Vector competence of *Aedes aegypti* mosquitoes for filarial nematodes is affected by age and nutrient limitation. Exp Gerontol 61:47-53 doi:10.1016/j.exger.2014.11.001
- Chandel K, et al. (2013) Midgut microbial community of *Culex quinquefasciatus* mosquito populations from India. PLoS One 8(11):e80453 doi:10.1371/journal.pone.0080453

- Chandel K, Parikh RY, Mendki MJ, Shouche YS, Veer V (2015) Isolation and characterization of *Vagococcus* sp from midgut of *Culex quinquefasciatus* (Say) mosquito. J Vector Borne Dis 52(1):52-7
- da Moura AJ, et al. (2015) Vector competence of the *Aedes aegypti* population from Santiago Island, Cape Verde, to different serotypes of dengue virus. Parasit Vectors 8:114 doi:10.1186/s13071-015-0706-8
- Dennison NJ, Jupatanakul N, Dimopoulos G (2014) The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. Curr Opin Insect Sci 3:6-13 doi:10.1016/j.cois.2014.07.004
- Diallo M, Ba Y, Faye O, Soumare ML, Dia I, Sall AA (2008) Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in West Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg 102(5):493-8 doi:10.1016/j.trstmh.2008.02.010
- Dinparast Djadid N, Jazayeri H, Raz A, Favia G, Ricci I, Zakeri S (2011) Identification of the midgut microbiota of *An. stephensi* and *An. maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria. PLoS One 6(12):e28484 doi:10.1371/journal.pone.0028484
- Gendrin M, et al. (2015) Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. Nat Commun 6:5921 doi:10.1038/ncomms6921
- Kim CH, Lampman RL, Muturi EJ (2015) Bacterial Communities and Midgut Microbiota Associated with Mosquito Populations from Waste Tires in East-Central Illinois. J Med Entomol 52(1):63-75 doi:10.1093/jme/tju011
- Marchesi JR, et al. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 64(2):795-9

- Minard G, Mavingui P, Moro CV (2013) Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors* 6:146 doi:10.1186/1756-3305-6-146
- Monaghan AJ, et al. (2016) On the Seasonal Occurrence and Abundance of the Zika Virus Vector Mosquito *Aedes aegypti* in the Contiguous United States. *PLoS Curr* 8 doi:10.1371/currents.outbreaks.50dfc7f46798675fc63e7d7da563da76
- Richard V, Paoaafaite T, Cao-Lormeau VM (2016) Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* Populations from French Polynesia for Chikungunya Virus. *PLoS Negl Trop Dis* 10(5):e0004694 doi:10.1371/journal.pntd.0004694
- Sudeep AB, Mandar P, Ghodke YK, George RP, Gokhale MD (2015) Vector competence of two Indian populations of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes to three West Nile virus strains. *J Vector Borne Dis* 52(3):185-92
- Tiawsirisup S, Nithiuthai S (2006) Vector competence of *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) for *Dirofilaria immitis* (Leidy). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37 Suppl 3:110-4
- Turell MJ, et al. (2007) Vector competence of Kenyan *Culex zombaensis* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Rift Valley fever virus. *J Am Mosq Control Assoc* 23(4):378-82 doi:10.2987/5645.1
- Valiente Moro C, Tran FH, Raharimalala FN, Ravelonandro P, Mavingui P (2013) Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. *BMC Microbiol* 13:70 doi:10.1186/1471-2180-13-70
- Vargas L, Beltran E (1941) *Culex Quinquefasciatus*, a New Vector of *Plasmodium gallinaceum*. *Science* 94(2443):389-90 doi:10.1126/science.94.2443.389-a
- Watson TM, Kay BH (1999) Vector competence of *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae) for Barmah Forest virus and of this species and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for dengue 1-4 viruses in Queensland, Australia. *J Med Entomol* 36(4):508-14

Table 1 Species, source, and number of tested mosquitoes

Mosquito species	Source of mosquitoes	Number of tested mosquitoes	Number of mosquitoes with midgut microbiota
<i>Aedes aegypti</i>	Laboratory	16	13
	Suanluang district	5	4
	Laksi district	7	6
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Laboratory	11	10
	Suanluang district	10	7
	Laksi district	11	11

Table 2 Genera of midgut microbiota found in laboratory rearing and field collected*Aedes aegypti* from Thailand

ID	Species	Source	Midgut microbiota																
			None	<i>Acinetobacter</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Chryseomicrobium</i>	<i>Dietzia</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
1	<i>Aedes</i>	Laboratory										•							
2	<i>Aedes</i>	Laboratory								•									
3	<i>Aedes</i>	Laboratory		•	•						•					•			
4	<i>Aedes</i>	Laboratory	•																
5	<i>Aedes</i>	Laboratory				•													
6	<i>Aedes</i>	Laboratory										•							
7	<i>Aedes</i>	Laboratory							•										
8	<i>Aedes</i>	Laboratory						•				•					•		
9	<i>Aedes</i>	Laboratory	•																
10	<i>Aedes</i>	Laboratory				•													
11	<i>Aedes</i>	Laboratory					•												
12	<i>Aedes</i>	Laboratory	•																
13	<i>Aedes</i>	Laboratory															•	•	
14	<i>Aedes</i>	Laboratory										•							
15	<i>Aedes</i>	Laboratory																•	
16	<i>Aedes</i>	Laboratory																•	
17	<i>Aedes</i>	Suanluang	•																
18	<i>Aedes</i>	Suanluang																•	
19	<i>Aedes</i>	Suanluang											•					•	
20	<i>Aedes</i>	Suanluang				•													
21	<i>Aedes</i>	Suanluang											•						
22	<i>Aedes</i>	Laksi											•	•					
23	<i>Aedes</i>	Laksi										•						•	
24	<i>Aedes</i>	Laksi					•												
25	<i>Aedes</i>	Laksi																•	
26	<i>Aedes</i>	Laksi													•			•	•
27	<i>Aedes</i>	Laksi	•																
28	<i>Aedes</i>	Laksi																•	

Table 3 Genera of midgut microbiota found in laboratory rearing and field collected*Culex quinquefasciatus* from Thailand

ID	Species	Source	Midgut microbiota														
			None	<i>Acinetobacter</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Chryseomicrobium</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Novosphingobium</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Providencia</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>
1	<i>Culex</i>	Laboratory	•														
2	<i>Culex</i>	Laboratory															
3	<i>Culex</i>	Laboratory								•	•						•
4	<i>Culex</i>	Laboratory								•							•
5	<i>Culex</i>	Laboratory															•
6	<i>Culex</i>	Laboratory								•			•				
7	<i>Culex</i>	Laboratory								•							
8	<i>Culex</i>	Laboratory								•			•				
9	<i>Culex</i>	Laboratory													•		•
10	<i>Culex</i>	Laboratory															•
11	<i>Culex</i>	Laboratory															•
12	<i>Culex</i>	Suanluang											•	•			
13	<i>Culex</i>	Suanluang									•						
14	<i>Culex</i>	Suanluang	•														
15	<i>Culex</i>	Suanluang					•										
16	<i>Culex</i>	Suanluang	•														
17	<i>Culex</i>	Suanluang											•				
18	<i>Culex</i>	Suanluang									•						
19	<i>Culex</i>	Suanluang								•							•
20	<i>Culex</i>	Suanluang								•	•						
21	<i>Culex</i>	Suanluang	•														
22	<i>Culex</i>	Laksi													•		
23	<i>Culex</i>	Laksi		•											•		•
24	<i>Culex</i>	Laksi			•												
25	<i>Culex</i>	Laksi															•
26	<i>Culex</i>	Laksi										•					
27	<i>Culex</i>	Laksi											•				•
28	<i>Culex</i>	Laksi						•		•							•
29	<i>Culex</i>	Laksi				•											
30	<i>Culex</i>	Laksi						•					•				
31	<i>Culex</i>	Laksi				•			•								
32	<i>Culex</i>	Laksi														•	

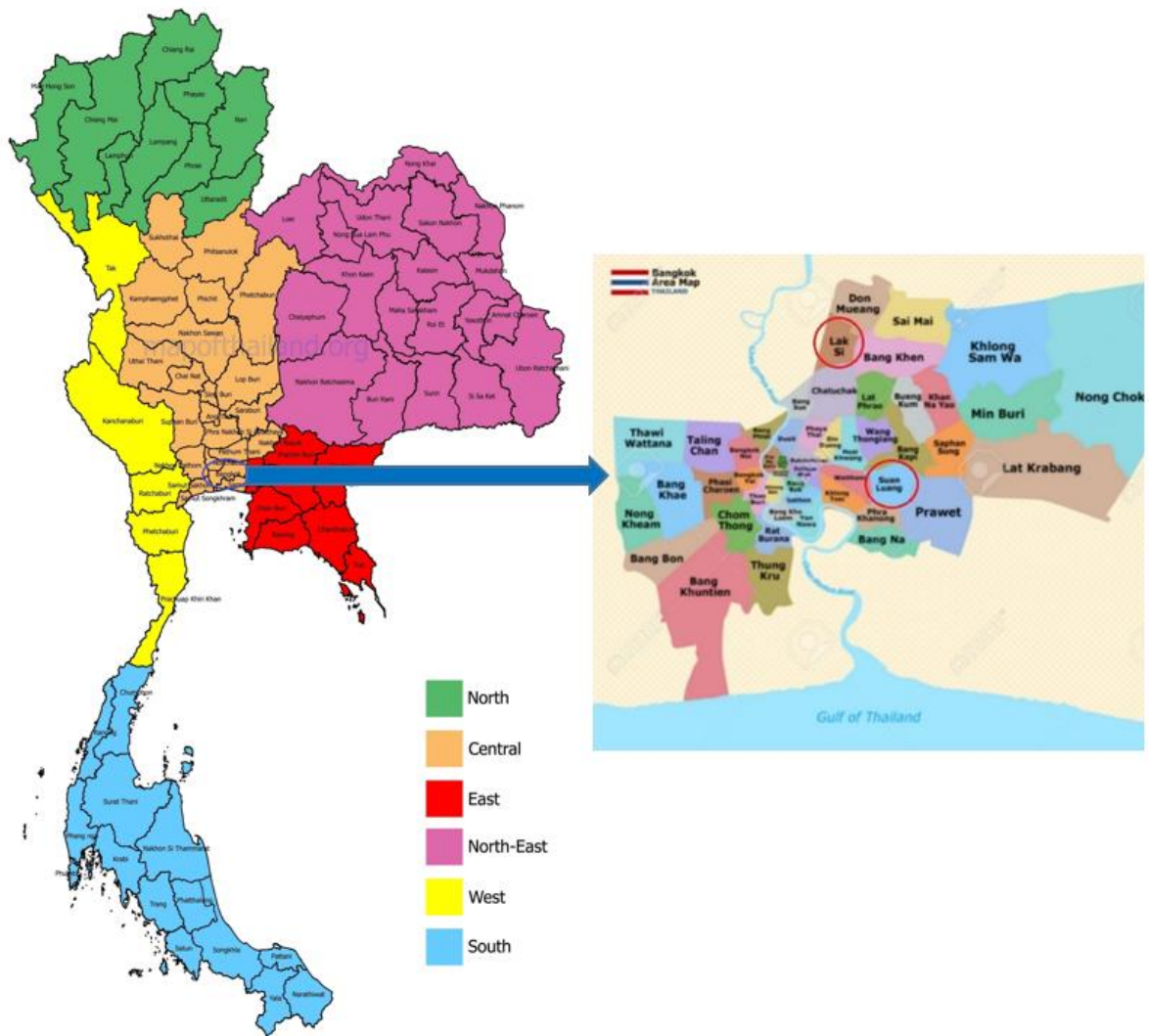


Figure 1. Map of Bangkok indicated Lak Si and Suan Luang district of Bangkok which the field mosquitoes were collected

Chikungunya virus transmission by *Aedes albopictus* (Skuse)

Ranida Tuanudom^{1, 2}, Nicharpat Yurayart¹, Sonthaya Tiawsirisup^{1*}

¹Animal Vector-Borne Disease Research Group, Parasitology Unit, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Interdisciplinary Program of Biomedical Science, Faculty of Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

*Corresponding author email: sonthaya.t@chula.ac.th

Abstract Chikungunya virus (CHIKV) is an emerging or re-emerging mosquito-borne virus. It belongs to *Alphavirus* genus of the *Togaviridae* family and can be classified into four lineages. The Asian lineage was the virus that responds for the outbreak in the past but the Indian Ocean lineage was responsible for the current outbreak in Thailand. Transmission cycle of CHIKV involves mosquito-human-mosquito. However, the studies about vector competence for this virus in Thailand are limited. This study was performed to examine the vector competence of *Aedes albopictus* mosquitoes for CHIKV. *Ae. albopictus* were allowed to feed on different levels of Thailand 2010 strain CHIKV in blood meal in an artificial membrane feeder. Saliva samples from blood-fed mosquitoes were assayed for the presence of CHIKV by using immunocytochemistry staining. There were four groups of blood fed *Ae. albopictus* in this study. They were tested for virus transmission on day 14 post blood feeding. Percent transmission defined as the percent blood-fed mosquitoes with virus in saliva. The percent transmissions were 41.67% (10/24), 70% (21/30), 100% (30/30), 90% (27/30), and 100% (30/30) after fed on 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , and 10^6 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ of CHIKV, respectively. The presence of CHIKV in the blood-fed mosquito saliva indicated that *Ae.*

albopictus are competent vector for CHIKV. They might play an important role in the transmission cycle of CHIKV in Thailand.

Keywords: Chikungunya virus, *Aedes albopictus*, Vector competence, Transmission, Thailand

Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is an emerging or re-emerging mosquito-borne virus belonging to *Alphavirus* genus of the *Togaviridae* family which was first discovered in Tanzania in 1952. It is an enveloped, single-stranded, positive-sense RNA virus. CHIKV can be classified into four lineages: West Africa, East Central and South Africa, Asian, and Indian Ocean lineage. The large outbreak of this virus occurred in different geographic regions including Africa and the Indian Ocean basin (Thaikruea *et al.*, 1997; Kishishita *et al.*, 2015; Sasayama *et al.*, 2014; Duong *et al.*, 2012). Lately, this virus has emerged and spread throughout the Americas (Alpuche Aranda & Lopez-Gatell, 2015; Donalisio & Freitas, 2015; Diaz *et al.*, 2015; de Figueiredo & Figueiredo, 2014).

CHIKV was first identified in Thailand in 1958 and was re-emerged in Thailand in 2008. The virus of Asian lineage was circulated in the past but the virus that was responsible for the recent outbreak in Thailand had different genome sequences (Theamboonlers *et al.*, 2009). The Asian lineage was the virus strain that respond for the outbreak in the past in Thailand but the Indian Ocean lineage (IOL) was responsible for the outbreak in the present in Thailand. There are the differences between E1 envelope glycoprotein sequences. The present study also indicated an alanine-to-valine substitution at the position 226 of the E1 envelope glycoprotein (E1-A226V) on an IOL.

Transmission cycle of CHIKV might be divided into two cycles: urban and sylvatic life cycle. Infected humans and mosquitoes play an important role in the transmission in an urban cycle, but infected animals and mosquitoes are responsible for the transmission in a sylvatic cycle (Jupp & Kemp, 1996; Vourc'h *et al.*, 2014).

There were few studies of mosquito infections, dissemination, and transmission with virus strain that were responsible for the current outbreak in Thailand. More studies need to be performed to address the role and relationship between mosquitoes and CHIKV. This study was conducted to explore the possible role of *Ae. albopictus* as potential vector for CHIKV in Thailand.

Materials and methods

Mosquito infection

Laboratory rearing *Aedes albopictus* were used in this study. They were allowed to feed on different levels of CHIKV (Thailand 2010 strain) in blood meal in an artificial membrane feeder. Saliva samples from blood-fed mosquitoes were assayed for the presence of CHIKV by using immunocytochemistry staining. There were five groups of blood fed *Ae. albopictus* in this study. They were tested for virus transmission on day 14 post blood feeding. Percent transmission defined as the percent blood-fed mosquitoes with virus in saliva.

Virus and cell culture

Thailand 2010 strain of Chikungunya virus (CHIKV) was used in this study. This virus was originally isolated from an infected patient during the outbreak in southern Thailand in 2010. It is in the Indian Ocean lineage (IOL) with an alanine-to-valine substitution at the position 226 of the E1 envelope glycoprotein (E1-A226V). It was kindly provided by the Faculty of

Medicine, Chulalongkorn University, Thailand. CHIKV was propagated and assayed in Vero-76 cells.

Virus assay

Ten-fold dilution of CHIKV in mosquito blood meal was assayed for an amount of virus in Vero-76 cells by using immunocytochemistry (ICC) staining. Samples were inoculated in Vero-76 cells in 96-well-plate for three days. Inoculated cells were then fixed with 4% formaldehyde at room temperature for 25 minutes and washed three times with 0.5% tween in Phosphate Buffer Saline (PBS). Mouse monoclonal antibody to CHIKV (abcam®, USA) was added and incubated at room temperature for two hours.

The plate was then washed with 0.5% tween in PBS for three times. Polyclonal rabbit anti- mouse immunoglobulins/HRP (Dako, Denmark) was added and incubated at room temperature for two hours. The plate was then washed with 0.5% tween in PBS for three times. AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) substrate (Sigma-Aldrich, USA) was added and incubated at room temperature for one hour. The plate was then washed with distilled water, dried at room temperature, and examined under light microscope. Single measurement with four wells of inoculated cells was used for virus titer examination by using ICC. Infected cells indicated by the red brown color in the cells. Virus titers of CHIKV in mosquito blood meal were expressed as CID_{50}/ml (Reed & Muench, 1938).

Results

There were five groups of blood fed *Ae. albopictus* in this study. They were allowed to feed on 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , and 10^6 CID_{50}/ml of CHIKV. The blood-fed mosquitoes were tested for virus infection, dissemination, and transmission on day 14 post blood feeding.

The transmission rate was indicated by the present of CHIKV in the mosquito saliva. The transmission rate was 41.67% (10/24), 70% (21/30), 100% (30/30), 90% (27/30), and 100% (30/30) after fed on 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , and 10^6 $\text{CID}_{50}/\text{ml}$ of CHIKV, respectively.

Discussion

This study was conducted to examine the possibility role of *Aedes albopictus* as competent vector for Thailand strain of Chikungunya virus (CHIKV). CHIKV used in this study was isolated from an infected patient during the outbreak of CHIKV in Thailand in 2010.

The study by Theamboonlers *et al.* (2009) indicated that the genome sequences of CHIKV isolated from the outbreak in Thailand in 2008 were different from the virus isolated from the outbreak in Thailand in 1988 and during 1995-1996. Thailand 2010 strain of CHIKV used in this study is in the Indian Ocean lineage (IOL) with an alanine-to-valine substitution at the position 226 of the E1 envelope glycoprotein (E1-A226V). It is in the same lineage as 2008 Thailand strain but it is difference from 1995 Thailand strain. There are 94% similarity between 2008 Thailand and 1995 Thailand strain. CHIKV Thailand 2008 were also closely related to the strains isolated from the outbreaks in Singapore in 2008 and in India in 2007 (99-100%).

The study on mosquito vector competence of CHIKV indicated that the mosquito species that were responsible for the current outbreak included *Ae. albopictus* whereas *Ae. aegypti* were responsible for the previous outbreak in Thailand (Thavara *et al.*, 2009). Tsetsarkin *et al.* (2007) also specified that *Ae. albopictus* were more potential vectors for CHIKV than *Ae. aegypti* due to the mutation of the virus which allowed them to adapt to different mosquito vectors in the past.

The study by Chompoosri *et al.* (2016) demonstrated that *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes from Thailand are capable of transmitting CHIKV IOL vertically in

the laboratory. They also showed that *Ae. albopictus* is more susceptible and has a greater ability to transmit the virus vertically than *Ae. aegypti*.

This present study would be useful for understanding of the ecology of CHIKV in nature in Thailand. It is importance for disease surveillance, vector control, and the prevention of CHIKV outbreak in Thailand.

Conclusion

The presence of Chikungunya virus in the blood-fed mosquito saliva indicated that *Aedes albopictus* mosquitoes are the competent vector for CHIKV. They might play an important role in the transmission cycle of CHIKV in the outbreak of this virus in Thailand.

Acknowledgements

This study was supported by the Thailand Research Fund and Chulalongkorn University (RSA 5680030) and Special Task Force for Activating Research, Chulalongkorn University (GSTAR 59-001-31-001).

References

- Alpuche Aranda, C. M. & Lopez-Gatell, H. (2015). Chikungunya, the 2014, emerging infectious diseases in the Americas. *Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery* **10**: 6-7.
- Chompoosri, J., Thavara, U., Tawatsin, A., Boonserm, R., Phumee, A., Sangkitporn, S. & Siriyasatien, P. (2016). Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Parasit Vectors* **9**:227 doi:10.1186/s13071-016-1505-6.

- de Figueiredo, M. L. & Figueiredo, L. T. (2014). Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **47**: 677-683.
- Diaz, Y., Carrera, J. P., Cerezo, L., Arauz, D., Guerra, I., Cisneros, J., Armien, B., Botello, A. M., Arauz, A. B., Gonzalez, V., Lopez, Y., Moreno, L., Lopez-Verges, S. & Moreno, B. A. (2015). Chikungunya virus infection: first detection of imported and autochthonous cases in panama. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **92**: 482-485.
- Donalisio, M. R. & Freitas, A. R. (2015). Chikungunya in Brazil: an emerging challenge. *Revista Brasileira de Epidemiologia* **18**: 283-285.
- Duong, V., Andries, A. C., Ngan, C., Sok, T., Richner, B., Asgari-Jirhandeh, N., Bjorge, S., Huy, R., Ly, S., Laurent, D., Hok, B., Roces, M. C., Ong, S., Char, M. C., Deubel, V., Tarantola, A. & Buchy, P. (2012). Reemergence of Chikungunya virus in Cambodia. *Emerging Infectious Diseases* **18**: 2066-2069.
- Jupp, P. G. & Kemp, A. (1996). What is the potential for future outbreaks of chikungunya, dengue and yellow fever in southern Africa? *The South African Medical Journal* **86**: 35-37.
- Kishishita, N., Sasayama, M., Takeda, N., Sa-Ngasang, A., Anuegoonpipat, A. & Anantapreecha, S. (2015). Neutralization activity of patient sera collected during the 2008-2009 Chikungunya outbreak in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology* **53**: 184-190.
- Reed, L.J. & Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene* **27**: 493-497.

- Sasayama, M., Benjathummarak, S., Kawashita, N., Rukmanee, P., Sangmukdanun, S., Masrinoul, P., Pitaksajakul, P., Puiprom, O., Wuthisen, P., Kurosu, T., Chaichana, P., Maneekan, P., Ikuta, K., Ramasoota, P., Okabayashi, T., Singhasivanon, P. & Luplertlop, N. (2014). Chikungunya virus was isolated in Thailand, 2010. *Virus Genes* **49**: 485-489.
- Thaikruea, L., Charearnsook, O., Reanphumkarnkit, S., Dissomboon, P., Phonjan, R., Ratchbud, S., Kounsang, Y. & Buranapiyawong, D. (1997). Chikungunya in Thailand: a re-emerging disease? *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **28**: 359-364.
- Thavara, U., Tawatsin, A., Pengsakul, T., Bhakdeenuan, P., Chanama, S., Anantapreecha, S., Molito, C., Chompoosri, J., Thammapalo, S., Sawanpanyalert, P. & Siriyasatien, P. (2009). Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **40**: 951-962.
- Theamboonlers, A., Rianthavorn, P., Praianantathavorn, K., Wuttirattanakowit, N. & Poovorawan, Y. (2009). Clinical and molecular characterization of chikungunya virus in South Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **62**: 303-305.
- Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E. & Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathogens* **3**: e201.
- Vourc'h, G., Halos, L., Desvars, A., Boue, F., Pascal, M., Lecollinet, S., Zientara, S., Duval, T., Nzonza, A. & Bremont, M. (2014). Chikungunya antibodies detected in non-human primates and rats in three Indian Ocean islands after the 2006 ChikV outbreak. *Veterinary Research* **45**: 52.