

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

การพัฒนาสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ และสารไพโรนิลระดับพันธุกรรมในพื้นที่เสี่ยงโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย

Development of natural compound aerosol spray against genetic fipronil and pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* mosquitoes in dengue risk areas in Thailand

จักรวาล ชมภูศรี

Jakkrawarn Chompoonsri

ชญาดา ขำสวัสดิ์

Chayada Khamsawads

จริยา ครูธบุตร

Jariya Krutbut

ธัญญภัทษณ์ มากริน

Thanyapak Makruen

อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์

Archawin Rojanawiwat

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

National Institute of Health,

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Department of Medical Sciences

DOI: 10.14456/dcj.2024.9

Received: May 8, 2023 | Revised: November 9, 2023 | Accepted: November 28, 2023

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์ และสารไพโรนิลระดับพันธุกรรมในพื้นที่เสี่ยงโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย ได้พัฒนาสเปรย์สกัดที่มีสารออกฤทธิ์เป็นสารธรรมชาติ 5 ชนิด ประกอบด้วย citral, citronellal, citronellol, geraniol และ linalool ที่ความเข้มข้นร้อยละ 8.00, 0.41, 0.52, 0.61 และ 0.75 ตามลำดับ ประเมินผลของสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์และสารไพโรนิลในตู้ทดสอบ และยุงลายบ้านในภาคสนาม 6 จังหวัด คือ กาญจนบุรี จันทบุรี ชุมพร พิชณุโลก นครปฐม และนครราชสีมา จากนั้นตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *para* และยีน *Rdl* ในยุงลายบ้านที่ตายในภาคสนาม ด้วยวิธี PCR และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการศึกษาพบว่าสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านในตู้ทดสอบและภาคสนาม ร้อยละ 100 โดยตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 989 (S989P) และ 1016 (V1016G) ในยุงลายบ้านที่ตายในภาคสนาม 6 จังหวัด โดยมีความถี่การกลายพันธุ์ที่ 0.23-0.40 และ 0.30-0.47 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบการกลายพันธุ์ของยีน *Rdl* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 302 (A302S) ในยุงลายบ้านที่ตายในภาคสนามจังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดนครปฐม โดยมีความถี่การกลายพันธุ์ที่ 0.13 และ 0.20 ตามลำดับ สรุปได้ว่าสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านคือสารไพรีทรอยด์และสารไพโรนิลระดับพันธุกรรมในพื้นที่เสี่ยงโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย โดยสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านนี้ สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์กำจัดยุงทางเลือกแทนการใช้ผลิตภัณฑ์เคมีกำจัดยุงเพื่อป้องกันโรคที่นำโดยยุงลายบ้าน

ติดต่อผู้พิมพ์: จักกรวาล ชมภูศรี

อีเมล: jakkrawarn.c@gmail.com

Abstract

This research aimed to study a natural compound aerosol spray against genetic fipronil and pyrethroid-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes in dengue risk areas in Thailand. A natural compound aerosol spray was developed that contained 5 natural compounds of citral, citronellal, citronellol, geraniol, and linalool at concentrations of 8.00%, 0.41%, 0.52%, 0.61%, and 0.75%, respectively as active ingredients. The aerosol spray was evaluated against fipronil and pyrethroid-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes in glass chambers and *Ae. aegypti* mosquitoes in the fields of 6 provinces: Kanchanaburi, Chanthaburi, Chumphon, Phitsanulok, Nakhon Pathom, and Nakhon Ratchasima. Polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing were conducted to detect mutations in the *para* gene and the *Rdl* gene in *Ae. aegypti* mosquitoes that died in the fields. The result showed that the natural compound aerosol spray provided a 100% mortality rate for *Ae. aegypti* mosquitoes in both the glass chambers and the fields. Mutations in the *para* gene at amino acid positions of 989 (S989P) and 1016 (V1016G) were detected in the dead mosquitoes in the fields of 6 study provinces with mutation frequencies of 0.23–0.40 and 0.30–0.47, respectively. In addition, a mutation in the *Rdl* gene at an amino acid position of 302 (A302S) was found in dead mosquitoes in Kanchanaburi and Nakhon Pathom provinces with mutation frequencies of 0.13 and 0.20, respectively. In conclusion, the natural compound aerosol spray developed and tested in this study was effective against genetic fipronil and pyrethroid-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes in dengue risk areas in Thailand. It suggests that the natural compound aerosol spray could be developed further as an alternative anti-mosquito product to anti-mosquito chemical products to prevent mosquito-borne diseases.

Correspondence: Jakkrawarn Chompoonsri

E-mail: jakkrawarn.c@gmail.com

คำสำคัญ

สเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัด,
ยุงลายบ้านต่อสารไพรีทรอยด์และสารฟิโพรนิล
ระดับพันธุกรรม, การกลายพันธุ์ของยีน,
ยีน *para*, ยีน *Rdl*

Keywords

natural compound aerosol spray,
genetic fipronil and pyrethroid-resistant
Ae. aegypti mosquitoes,
gene mutation, *para* gene, *Rdl* gene

บทนำ

ยุงลายบ้านเป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue virus, DENV) การระบาดของโรคไข้เลือดออกในประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกในเขตกรุงเทพมหานคร เมื่อปี 2501⁽¹⁾ โดยหลังจากนั้นได้มีรายงานการระบาดของโรคในหลายพื้นที่ของประเทศไทยอย่างต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน ในปี 2566 มีรายงานผู้ป่วยไข้เลือดออก 13,987 คน คิดเป็นอัตรา

ป่วย 21.16 ต่อประชากรแสนคน และเสียชีวิต 13 คน คิดเป็นอัตรารายร้อยละ 0.02 (ข้อมูล ณ วันที่ 2 พฤษภาคม 2566)⁽²⁾ ปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุทำให้ไม่สามารถป้องกันและควบคุมโรคไข้เลือดออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ ยุงลายบ้านมีการพัฒนากลไกการต่อสู้สารเคมีกำจัดแมลงระดับพันธุกรรม โดยเกิดการกลายพันธุ์ของยีนเป้าหมายของสารเคมีกำจัดแมลงแล้วทำให้โปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นมีโครงสร้างเปลี่ยนไป

ทำให้ความสามารถในการจับกับสารเคมีกำจัดแมลงลดลง หรือไม่สามารถจับกับสารเคมีกำจัดแมลงได้ ดังนั้น สารเคมีกำจัดแมลงจึงออกฤทธิ์ได้ช้าหรือไม่ออกฤทธิ์ทำให้ยุงลายบ้านไม่ตายและเกิดภาวะการมดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลง

การกลายพันธุ์ของยีนที่สังเคราะห์โปรตีนเป้าหมายของสารเคมีกำจัดแมลงในยุงลายบ้านมีรายงานในหลายประเทศทั่วโลก โดยมีรายงานยืนยันการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 5 ตำแหน่งของโปรตีนโซเดียมแชนแนล (voltage-gated sodium channel) คือ V410L บริเวณ segment ที่ 6 ใน domain I (IS6), S989P บริเวณ S5 และ S6 loop ใน domain II, I1011M และ V1016G บริเวณ segment ที่ 6 ใน domain II (IIS6) และ F1534C บริเวณ segment ที่ 6 ใน domain III (IIS6) ทำให้ลดความไวของโปรตีนโซเดียมแชนแนลในการจับกับสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์⁽³⁾ การกลายพันธุ์ของยีน *ace-1* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน G119S ของโปรตีนหรือเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase; AChE) ทำให้ลดความไวของโปรตีนหรือเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในการจับกับสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์เมต⁽⁴⁾ และการกลายพันธุ์ของยีน *Rdl* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน A302S ของโปรตีน gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors มีผลทำให้ลดความไวของโปรตีนในการจับกับสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มไซโคลไดอีนส์ เช่น คลอร์เดน (chlordane) และกลุ่มเพนิลไพราโซล เช่น ฟิพโรนิล (fipronil)⁽⁵⁾

ในปัจจุบันสารจากธรรมชาติได้รับความสนใจมากขึ้นที่จะนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง⁽⁶⁻⁸⁾ เนื่องจากสารธรรมชาติมีผลกระทบต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อมน้อย เมื่อเทียบกับสารเคมีกำจัดแมลง นอกจากนี้ ยังสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ โดยมีรายงานว่าสเปรย์สกัดก๊ากซ์ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านร้อยละ 8.14 ให้อัตราตายของยุงลายบ้านต่อสารเคมีกำจัดแมลงจากจังหวัดนครปฐม และจังหวัดจันทบุรี ร้อยละ 100 ที่ 24 ชั่วโมง และ

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้านโดยวิธี GC-MS พบสารประกอบหลักคือ geraniol หรือ trans-citral ร้อยละ 28.77 และ neral หรือ cis-citral ร้อยละ 22.74⁽⁷⁾ นอกจากนี้ มีรายงานสารธรรมชาติในกลุ่ม monoterpenoids คือ citral (กลุ่ม aldehydes), citronellal (กลุ่ม aldehydes), citronellol (กลุ่ม alcohols), geraniol (กลุ่ม alcohols) และ linalool (กลุ่ม alcohols) ที่ความเข้มข้น discriminating concentration ร้อยละ 0.20, 0.41, 0.52, 0.61 และ 0.75 ตามลำดับ ให้อัตราตายของยุงลายบ้านต่อสารไพรีทรอยด์และสารฟิพโรนิลระดับพันธุกรรม ร้อยละ 100 ที่ 24 ชั่วโมง โดยดัดแปลงวิธีทดสอบความไวของยุงลายบ้านต่อสารเคมีกำจัดแมลงที่เป็นวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก⁽⁸⁾

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสเปรย์สารธรรมชาติสกัดก๊ากซ์กำจัดยุงลายบ้านที่ต่อสารไพรีทรอยด์และสารฟิพโรนิลระดับพันธุกรรม ในพื้นที่เสี่ยงโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย โดยศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 989 (S989P) จากซีรีน (Serine, S, TCC) เป็น โพรลีน (Proline, P, CCC) และตำแหน่งกรดอะมิโน 1016 (V1016G) จากวาไลน์ (Valine, V, GTA) เป็น ไกลซีน (Glycine, G, GGA) และการกลายพันธุ์ของยีน *Rdl* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน A302S จากอะลานีน (Alanine, A, GCA) เป็นซีรีน (Serine, S, TCA) ในยุงลายบ้านที่ตายจากการประเมินผลของสเปรย์สารธรรมชาติสกัดก๊ากซ์ในพื้นที่ศึกษาภาคสนาม โดยการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่บริเวณดังกล่าว ผู้วิจัยและคณะได้ตรวจพบในยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัดพื้นที่ที่ศึกษา คือ นครปฐม นครราชสีมา ชุมพร จันทบุรี กาญจนบุรี และพิษณุโลก ส่วนการกลายพันธุ์ของยีน *Rdl* ที่ตำแหน่ง A302S พบในยุงลายบ้านจาก 2 จังหวัด คือ กาญจนบุรี และนครปฐม⁽⁸⁾ โดยสเปรย์สารธรรมชาติสกัดก๊ากซ์ที่พัฒนาขึ้นจะสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นสเปรย์สารธรรมชาติสกัดก๊ากซ์กำจัดยุงพาหะนำโรคที่ต่อสารเคมีกำจัดแมลงระดับพันธุกรรมเพื่อใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคที่นำโดยยุงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัสดุและวิธีการศึกษา

ยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์และสารฟิโพรนิล

ยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ 6 สายพันธุ์จาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษาที่มีรายงานผู้ป่วยไข้เลือดออก คือ กาญจนบุรี (GIS: 13° 48' 36" N 99° 16' 52" E) จันทบุรี (GIS: 12° 42' 19" N 102° 14' 15" E) ชุมพร (GIS: 9° 57' 4" N 99° 4' 38" E) พิษณุโลก (GIS: 16° 44' 24" N 99° 56' 57" E) นครปฐม (GIS: 13° 44' 18" N 100° 7' 13" E) และนครราชสีมา (GIS: 14° 38' 47" N 102° 10' 26" E) โดยได้ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 989 (S989P) และ 1016 (V1016G) ในยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัด นอกจากนี้ ยุงลายบ้านสายพันธุ์จากจังหวัด นครปฐมและจังหวัดกาญจนบุรี ยังดื้อต่อสารฟิโพรนิล และได้ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *Rdl* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 302 (A302S)⁽⁸⁾ โดยยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ 6 สายพันธุ์จาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษาที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นยุงลายบ้านรุ่นลูกรุ่นที่ 1 (F1) ที่ได้มาจากยุงลายบ้านเพศเมียรุ่นแม่ (FO) ที่ได้กินเลือดของผู้ที่อยู่อาศัยในบ้านแล้วในแต่ละพื้นที่ศึกษา ซึ่งเก็บตัวอย่างยุงลายบ้านโดยใช้อุปกรณ์โฉบยุงและนำมาคัดแยกยุงลายบ้านเพศเมียที่กินเลือดแล้วเพื่อวางไข่และเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านรุ่นลูกรุ่นที่ 1 (F1) ด้วยวิธีมาตรฐานการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้รับการรับรองมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025: 2017 ซึ่งมีสภาวะการเพาะเลี้ยง ดังนี้ ลูกน้ำระยะที่ 1-2 ให้อาหารบดละเอียดไม่เกิน 10 มิลลิกรัม ต่อถาดต่อวัน และลูกน้ำระยะที่ 3-4 ให้อาหารบดหยาบไม่เกิน 60 มิลลิกรัมต่อถาดต่อวัน ส่วนอาหารสำหรับ ยุงลายบ้านตัวเต็มวัย นำไม้พ่นสำหรับน้ำหวานที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลร้อยละ 5 และวิตามินรวมร้อยละ 5 โดยเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 24-28°C ความชื้นสัมพัทธ์ 60-80% RH และระบบแสงเปิด/ปิด เป็น 12/12 ชั่วโมง

การพัฒนาสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุง

พัฒนาสเปรย์สกัดยุงที่มีสารธรรมชาติ 5 ชนิด

คือ citral, citronellal, citronellol, geraniol และ linalool ที่ความเข้มข้นร้อยละ 8.00, 0.41, 0.52, 0.61 และ 0.75 ในตัวทำละลายไอโซโพรพานอล ในอัตราส่วนสารผสมรวมตัวทำละลายไอโซโพรพานอลต่อแก๊สปิโตรเลียมเหลว (แก๊สแอลพีจี) เป็น 40:60 โดยสเปรย์สกัดกำจัดยุงมีปริมาณสารผสมรวมไอโซโพรพานอล 112.96 กรัม (ร้อยละ 40) และสารขั้วตันหรือแก๊สแอลพีจี 169.04 กรัม (ร้อยละ 60) ในความจุของกระป๋อง 640 มิลลิลิตร ความดันสูงสุดของกระป๋อง 2.20 เมกาปาสคาลมาตรและความดันของแก๊สที่ 37.80°C ไม่เกิน 0.55 เมกาปาสคาลมาตร ส่วนสเปรย์สกัดยุงในอัตราส่วนไอโซโพรพานอลต่อแก๊สปิโตรเลียมเหลว เป็น 40:60 ใช้เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ การทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงในการกำจัดยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์และสารฟิโพรนิลในตู้ทดสอบ (glass chamber)

เตรียมยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงรุ่นลูกรุ่นที่ 1 เพศเมีย อายุ 3-5 วัน โดยใช้อุปกรณ์ดูดยุง (aspirator) ดูดยุงลายบ้านเพศเมียที่มีหนวดบางออกจากยุงลายบ้านเพศผู้ที่มีหนวดหนาเป็นพุ่มที่อยู่ในกรงยุงขนาด 30 ซม.x30 ซม.x30 ซม. คัดแยกยุงลายบ้านเพศเมียจำนวน 20 ตัว ใส่ถ้ำยุงกระดาษที่ปิดด้วยผ้าตาข่ายวางสำลีสูดน้ำหวานสำหรับเป็นอาหารและพักยุงไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ฉีดสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงที่ 1.00±0.10 กรัม เข้าไปในตู้ทดสอบขนาด 0.343 ลูกบาศก์เมตร (0.7 ม.X0.7 ม.X0.7ม.) จากนั้นปล่อยยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงเข้าไปในตู้ทดสอบ บันทึกจำนวนยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงที่หายห้องทุก ๆ 5 นาที จนครบเวลาทดสอบ 60 นาที เก็บยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงที่หายห้องใส่ถ้ำยุงกระดาษแล้วปิดด้วยผ้าตาข่าย วางสำลีสูดน้ำหวานสำหรับเป็นอาหารและตรวจสอบอัตราการตายของยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงที่ 24 ชั่วโมง ดำเนินการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยใช้สเปรย์ไอโซโพรพานอลสกัดยุงเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ⁽⁷⁾

การทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงในการกำจัดยุงลายบ้านในพื้นที่ภาคสนาม

เก็บตัวอย่างยุงลายบ้านเพศเมียในบ้านในพื้นที่

ศึกษา 6 จังหวัด จำนวนร้อยละ 15-30⁽⁹⁾ ของจำนวน
หลังคาเรือนทั้งหมดในแต่ละพื้นที่ศึกษาที่เป็นบ้านหลัง
เดิมที่เคยเก็บตัวอย่างลูกน้ำและยุงลายบ้านไปทดสอบ
ยืนยันการติดต่อสารเคมีกำจัดแมลง และตรวจพบการ
กลายพันธุ์ของยีน *para* และยีน *Rdl* โดยใช้อุปกรณ์โอบ
ยุง นำยุงลายบ้านที่เก็บได้ในแต่ละหลังใส่ถ้วยกระดาษ 2
ถ้วยที่ปิดด้วยผ้าตาข่าย สำหรับเป็นกลุ่มทดสอบและกลุ่ม
เปรียบเทียบ จากนั้นซึ่งสเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซและ
สเปรย์ไอโซไพรพาทอลอัดก๊าซก่อนและหลังฉีด ฉีด
สเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซและสเปรย์ไอโซไพรพาทอล
อัดก๊าซโดยกดหัวฉีดสเปรย์ค้างไว้เป็นเวลา 1 วินาที เพื่อ
ให้ได้ปริมาณการฉีดที่ 1.00 ± 0.10 กรัม เข้าไปในถ้วย
กระดาษ ที่มียุงลายบ้านที่เป็นกลุ่มทดสอบและกลุ่ม
เปรียบเทียบ ตามลำดับ โดยให้ถ้วยกระดาษอยู่ในระดับ
เดียวกับการฉีดสเปรย์และมีระยะห่างระหว่างตำแหน่งที่
ฉีดสเปรย์และถ้วยกระดาษ 50 เซนติเมตร บันทึกจำนวน
ยุงลายบ้านที่หายท้องที่ 60 นาที วางสำลิจูบน้ำหวาน
สำหรับเป็นอาหารของยุง และตรวจสอบอัตราการตายที่ 24
ชั่วโมง ซึ่งการทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์สาร
ธรรมชาติอัดก๊าซในการกำจัดยุงลายบ้านในพื้นที่ภาค
สนามนี้เป็นการฉีดสเปรย์ 1 ครั้งต่อหลังคาเรือน และถ้า
ปริมาณการฉีดสเปรย์ไม่อยู่ในช่วงดังกล่าว จะไม่นำ
ตัวอย่างยุงลายบ้านจากบ้านหลังดังกล่าวมาใช้วิเคราะห์
ข้อมูล

การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *para* และ ยีน
Rdl ในยุงลายบ้านที่ตายจากการประเมินผลของสเปรย์
สารธรรมชาติอัดก๊าซในพื้นที่ภาคสนาม โดยวิธีปฏิกิริยา
ลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)
และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)
สกัด genomic DNA ของตัวอย่างยุงลายบ้านเพศเมียที่
ตายจากการประเมินผลของสเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซ
ในพื้นที่ภาคสนาม 6 จังหวัด และยุงลายบ้านเพศเมียสาย
พันธุ์ห้องปฏิบัติการ โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp®
DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) ตรวจการ
กลายพันธุ์ของยีน *para* บริเวณเป้าหมายการออกฤทธิ์ของ
สารไพรีทรอยด์และการกลายพันธุ์ของยีน *Rdl* บริเวณ

เป้าหมายการออกฤทธิ์ของสารฟิโพรนิลด้วยวิธี PCR ใช้
ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Q5 High-Fidelity DNA polymerase
(New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA)
โดยเตรียมปฏิกิริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตร สำหรับการ
ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *para* ใช้ชุดไพรเมอร์ 20
ไมโครโมล AaSCF20 (5'-GACAATGTGGATC-
GCTTCCC-3') และ 20 ไมโครโมล AaSCR21
(5'-GCAATCTGGCTTGTTAACTTG -3')⁽¹⁰⁾ จาก
นั้นนำปฏิกิริยาที่เตรียมในหลอด PCR ขนาด 0.2
มิลลิลิตร เข้าเครื่อง CFX96 Real-Time System (Bio-Rad
Laboratories, Inc, Hercules, California, USA) และตั้ง
โปรแกรม 7 ขั้นตอนเพื่อเริ่มปฏิกิริยา PCR จนเสร็จจลัน
การทำงาน⁽¹⁰⁾ สำหรับการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *Rdl*
ใช้ชุดไพรเมอร์ 20 ไมโครโมล mqGABAdir (5'-TG-
TACGTTTCGATGGGTTAT-3') และ 20 ไมโครโมล
mqGABArev (5'-CATGACGAAGCATGTGCCTA-3')⁽¹¹⁾
โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยา PCR 7 ขั้นตอน ดังนี้ 1)
pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 5 นาที 2)
denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที 3)
annealing ที่อุณหภูมิ 52°C นาน 30 วินาที 4)
extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที 5) ทำซ้ำปฏิกิริยา ในชั้น
ตอนที่ 2-4 จำนวน 29 รอบ 6) final extension ที่อุณหภูมิ
72°C นาน 10 นาที และ 7) holding temperature ที่อุณหภูมิ
4°C เป็นการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยา
ไว้ในเครื่อง CFX96 Real-Time System จนกว่าจะนำไป
ไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์
PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้
agarose gel ร้อยละ 1 และ 2 สำหรับตรวจสอบผลิตภัณฑ์
PCR ของยีน *para* และ ยีน *Rdl* ตามลำดับ สกัดผลิตภัณฑ์
PCR ของทั้ง 2 ยีน ออกจาก agarose gel โดยใช้ชุดน้ำยา
QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden,
Germany) นำส่ง DNA หรือ ผลิตภัณฑ์ PCR เป้าหมาย
ที่บริสุทธิ์ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท แมคโคร
เจน ประเทศเกาหลี (Macrogen Inc., GeumCheon-Gu,
Seoul, Korea) วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอ
ไทด์ที่ได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Gen-

bank และรายงานที่ผ่านมาด้วยโปรแกรม MEGA-X เพื่อ
ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *para* และ *Rdl*
การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ค่า Knockdown Time 50 (KT_{50}) คือ
ค่าเวลาที่ทำให้ยุงลายบ้านหยายท้องร้อยละ 50 โดยใช้
สถิติ probit analysis กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติ
(α)=0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS ในการทดสอบ
ถ้ากลุ่มเปรียบเทียบมีอัตราการตายของยุงลายบ้านระหว่าง
ร้อยละ 5-20 ให้ปรับค่า Abbott's formula⁽¹²⁾ แต่ถ้ามี
อัตราการตายมากกว่าร้อยละ 20 ต้องทำการทดสอบใหม่
และวิเคราะห์ค่าความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *para* และ
ยีน *Rdl* จากจำนวนตัวอย่าง DNA ของยุงลายบ้านที่พบ
การกลายพันธุ์ของยีน/จำนวนตัวอย่าง DNA ของยุงลาย
บ้านที่วิเคราะห์ทั้งหมด

ผลการศึกษา

ประสิทธิภาพของสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์และสารฟิโพรนิลในตู้

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์และสารฟิโพรนิลในตู้ทดสอบ

Table 1 Efficacy of natural compound aerosol spray against fipronil- and pyrethroid-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes in glass chamber

สเปรย์สกัด	ปริมาณที่ฉีด (กรัม)	สายพันธุ์ ยุงลาย	KT_{50} (นาที) (95% CI)	Regression Coefficient±SE	อัตราการตาย (ร้อยละ)
ไอโซไพโรพานอล	1.00±0.10	กาญจนบุรี	-	-	0
		จันทบุรี	-	-	0
		ชุมพร	-	-	0
		พิษณุโลก	-	-	0
		นครปฐม	-	-	0
		นครราชสีมา	-	-	0
สารธรรมชาติ	1.00±0.10	กาญจนบุรี	20.48 (19.37-21.59)	4.76±0.31	100
		จันทบุรี	18.94 (17.89-19.98)	4.87±0.31	100
		ชุมพร	17.89 (16.75-19.01)	4.09±0.26	100
		พิษณุโลก	16.81 (15.74-17.85)	4.29±0.27	100
		นครปฐม	22.26 (21.16-23.391)	5.09±0.33	100
		นครราชสีมา	17.74 (16.50-18.98)	3.47±0.23	100

ประสิทธิภาพของสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านในพื้นที่ภาคสนาม

จากการเก็บตัวอย่างยุงลายบ้านเพศเมียในพื้นที่
ศึกษาภาคสนาม 6 จังหวัด ได้ยุงลายบ้านเพศเมีย

ทดสอบ (glass chamber)

จากการฉีดสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้าน
1.00±0.10 กรัม เข้าไปในตู้ทดสอบ และปล่อยยุงลายบ้าน
ดื้อสารไพรีทรอยด์และสารฟิโพรนิลเข้าไปในตู้ทดสอบ จาก
ผลการศึกษา พบว่าสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านดื้อสาร
ไพรีทรอยด์และสารฟิโพรนิลมีประสิทธิภาพในการกำจัดยุงลายบ้านทั้ง 6 สายพันธุ์ จาก 6 จังหวัดพื้นที่
ศึกษาในตู้ทดสอบ โดยให้อัตราตายของยุงลายบ้านดื้อสาร
ไพรีทรอยด์และสารฟิโพรนิลร้อยละ 100 ที่ 24 ชั่วโมง โดย
ยุงลายบ้านสายพันธุ์ที่มีค่า KT_{50} ที่ต่ำกว่าแสดงว่ามีความไว
ต่อสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านมากกว่า และจากผลการศึกษา
พบว่าสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านให้ค่า KT_{50} อยู่ระหว่าง
16.81-22.26 นาที โดยค่า KT_{50} ต่ำสุดและสูงสุดได้จากยุง
ลายบ้านจากจังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดนครปฐม ตาม
ลำดับ ส่วนสเปรย์ไอโซไพโรพานอลสกัดกำจัดยุงลายบ้านที่ฉีด 1.00±0.10
กรัม ไม่สามารถวิเคราะห์ค่า KT_{50} ได้ เนื่องจากไม่มียุงลาย
บ้านทั้ง 6 สายพันธุ์ หยายท้องภายในระยะเวลาที่ทดสอบ 60
นาที และไม่มียุงลายบ้านทั้ง 6 สายพันธุ์ ตายที่ 24 ชั่วโมง
(ตารางที่ 1)

ในจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 175 ตัว (กลุ่มทดสอบ
88 ตัว และกลุ่มเปรียบเทียบ 87 ตัว) จากบ้าน 31 หลัง
คิดเป็นร้อยละ 16.2 (31/191 หลัง) ของจำนวนหลังคาเรือน
ทั้งหมด ยุงลายบ้านเพศเมียในจังหวัดจันทบุรี จำนวน

181 ตัว (กลุ่มทดสอบ 91 ตัว และกลุ่มเปรียบเทียบ 90 ตัว) จากบ้าน 40 หลัง คิดเป็นร้อยละ 19.3 (40/207 หลัง) ของจำนวนหลังคาเรือนทั้งหมด ยุงลายบ้านเพศเมียในจังหวัดชุมพร จำนวน 289 ตัว (กลุ่มทดสอบ 145 ตัว และกลุ่มเปรียบเทียบ 144 ตัว) จากบ้าน 30 หลัง คิดเป็นร้อยละ 34.9 (30/86 หลัง) ของจำนวนหลังคาเรือนทั้งหมด ยุงลายบ้านเพศเมียในจังหวัดพิษณุโลก จำนวน 315 ตัว (กลุ่มทดสอบ 158 ตัว และกลุ่มเปรียบเทียบ 157 ตัว) จากบ้าน 34 หลัง คิดเป็นร้อยละ 20.7 (34/164 หลัง) ของจำนวนหลังคาเรือนทั้งหมด ยุงลายบ้านเพศเมียในจังหวัดนครปฐม จำนวน 225 ตัว (กลุ่มทดสอบ 113 ตัว และกลุ่มเปรียบเทียบ 112 ตัว) จากบ้าน 45 หลัง คิดเป็นร้อยละ 16.7 (45/270 หลัง) ของจำนวนหลังคาเรือนทั้งหมด และยุงลายบ้านเพศเมียในจังหวัดนครราชสีมา จำนวน 263 ตัว (กลุ่มทดสอบ 132 ตัว และกลุ่มเปรียบเทียบ 131 ตัว) จากบ้าน 31 หลัง คิดเป็นร้อยละ 25.4 (31/122 หลัง) ของจำนวนหลังคาเรือนทั้งหมด จากการทดสอบประสิทธิภาพของ

สเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซและสเปรย์ไอโซโพรพานอลอัดก๊าซที่ปริมาณการฉีด 1.00±0.10 กรัม เข้าไปในถ้วยกระดาษ ที่มียุงลายบ้านเพศเมียที่เป็นกลุ่มทดสอบและกลุ่มเปรียบเทียบ ตามลำดับ พบว่าสเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซมีประสิทธิภาพในการกำจัดยุงลายบ้านในพื้นที่ภาคสนาม โดยให้อัตราตายของยุงลายบ้านในพื้นที่ภาคสนามทั้ง 6 จังหวัด ร้อยละ 100 ส่วนสเปรย์ไอโซโพรพานอลอัดก๊าซให้อัตราตายของยุงลายบ้านในพื้นที่ภาคสนามทั้ง 6 จังหวัด ร้อยละ 0 ที่ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 2) โดยในการทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซในการกำจัดยุงลายบ้านในพื้นที่ภาคสนามนี้ ไม่สามารถคำนวณค่า KT50 ของยุงลายบ้านที่หายห้องในถ้วยกระดาษได้ เนื่องจากมีจำนวนยุงลายบ้านในถ้วยกระดาษต่อหลังคาเรือนส่วนใหญ่ไม่เกิน 5 ตัว อย่างไรก็ตาม จำนวนยุงลายบ้านทั้งหมดในถ้วยกระดาษที่เก็บได้จากทุกหลังคาเรือนในพื้นที่ศึกษาทั้ง 6 จังหวัด หายห้องร้อยละ 100 ภายใน 5 นาทีแรกที่สัมผัสกับสารธรรมชาติที่ถูกฉีดออกมาจากสเปรย์อัดก๊าซ

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของสเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซในการกำจัดยุงลายบ้านในพื้นที่ภาคสนาม 6 จังหวัด

Table 2 Efficacy of natural compound aerosol spray against *Ae. aegypti* mosquitoes in the fields of 6 provinces

สเปรย์อัดก๊าซ	ปริมาณที่ฉีด (กรัม)	อัตราตายของยุงลายบ้าน (ร้อยละ)					
		กาญจนบุรี	จันทบุรี	ชุมพร	พิษณุโลก	นครปฐม	นครราชสีมา
ไอโซโพรพานอล	1.00±0.10	0	0	0	0	0	0
สารธรรมชาติ 5 ชนิด	1.00±0.10	100	100	100	100	100	100

การกลายพันธุ์ของยีน *para* และยีน *Rdl* ในยุงลายบ้านที่ตายจากการประเมินผลของสเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซในพื้นที่ภาคสนาม 6 จังหวัด

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA เป้าหมายของยีน *para* และยีน *Rdl* ของยุงลายบ้านที่ตายจากการประเมินผลของสเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซในพื้นที่ภาคสนาม 6 จังหวัด จำนวน 180 ตัวอย่าง (30 ตัวอย่าง/จังหวัด) และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยวิธี PCR และตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *para* ของยุงลายบ้านที่

ตายจากการประเมินผลของสเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซในพื้นที่ภาคสนาม 6 จังหวัดและยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการมีขนาดประมาณ 614-630 bp ขึ้นอยู่กับ intron polymorphism (234-250 bp)⁽¹⁰⁾ ส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *Rdl* ของยุงลายบ้านที่ตายจากการประเมินผลของสเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซในพื้นที่ภาคสนาม 6 จังหวัดและยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการมีขนาด 232 bp จากการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี DNA sequencing แล้วนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ของยีน *para* และยีน *Rdl* โดยการเปรียบเทียบกับลำดับ

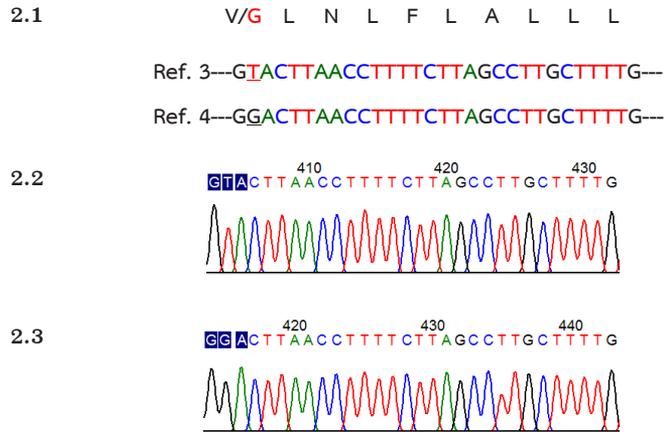
นิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* และยีน *Rdl* ในฐานข้อมูล GenBank และรายงานที่ผ่านมา จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ของยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัดกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติ S989 หรือ Ref. 1 ยุงลายบ้านสายพันธุ์กลายพันธุ์ S989P หรือ Ref. 2 (ภาพที่ 1.1) และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่เป็นสายพันธุ์ปกติ S989 (ภาพที่ 1.2) พบว่า ยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัด มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 989 (S989P) (ภาพที่ 1.3) โดยมีความถี่การกลายพันธุ์ระหว่าง 0.23-0.40 (ตารางที่ 3) และจากเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ของยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัดกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติ V1016 หรือ Ref. 3 ยุงลายบ้านสายพันธุ์กลายพันธุ์ V1016G หรือ Ref. 4

(ภาพที่ 2.1) และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติที่เป็นสายพันธุ์ปกติ V1016 (ภาพที่ 2.2) พบว่า ยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัด มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง V1016G (ภาพที่ 2.3) โดยมีความถี่การกลายพันธุ์ระหว่าง 0.30-0.47 (ตารางที่ 3) ส่วนการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *Rdl* ของยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัดกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *Rdl* ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติ A302 หรือ Ref. 5 ส่วน Ref. 6 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *Rdl* ของยุงลายสวนและยุงรำคาญสายพันธุ์กลายพันธุ์ A302S ซึ่งเหมือนกับของยุงลายบ้าน⁽¹²⁾ (ภาพที่ 3.1) และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติที่เป็นสายพันธุ์ปกติ A302 (ภาพที่ 3.2) พบว่า ยุงลายบ้านในจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดนครปฐม มีการกลายพันธุ์ A302S (ภาพที่ 3.3) โดยมีความถี่การกลายพันธุ์เท่ากับ 0.13 และ 0.2 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* บริเวณ S5 loop และ S6 loop ใน domain II ของโปรตีนโซเดียมแชนแนลของยุงลายบ้าน (exon 20) 1.1) Ref. 1 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติ (GenBank: AB914690.1) และ Ref. 2 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ของยุงลายบ้านที่มีการกลายพันธุ์ S989P (GenBank: AB914689.1) 1.2) ยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่เป็นสายพันธุ์ปกติ (S989) และ 1.3) ยุงลายบ้านที่ตายจากการประเมินผลของสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงในพื้นที่ภาคสนามทั้ง 6 จังหวัด มีการกลายพันธุ์ S989P (TCC→CCC)

Figure 1 Partial nucleotide sequences of *para* gene at S5 loop and S6 loop in domain II of voltage-gated sodium channel protein in *Ae. aegypti* (exon 20). 1.1) Ref. 1 is a wild-type strain of *Ae. aegypti* (GenBank: AB914690.1) and Ref 2 is *Ae. aegypti* with S989P mutation (GenBank: AB914689.1) 1.2) Wild-type laboratory strain of *Ae. aegypti* (S989) and 1.3) *Ae. aegypti* mosquitoes that died from natural compound aerosol spray in the fields of 6 provinces with S989P mutation (TCC→CCC)



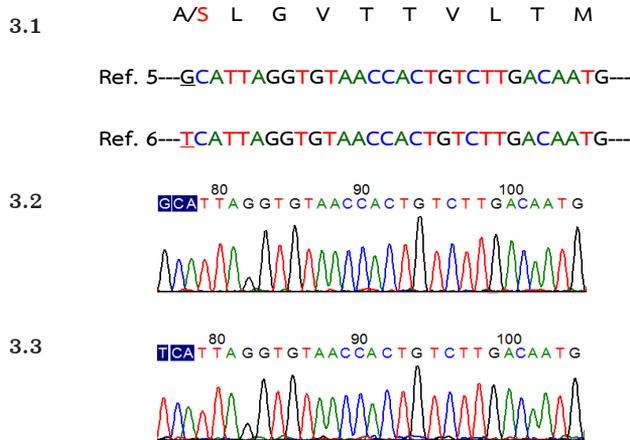
ภาพที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* บริเวณ S6 segment ใน domain II ของโปรตีนโซเดียมแชนเนลของยุงลายบ้าน (exon 20) 2.1) Ref. 3 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติ (GenBank: AB914690.1) และ Ref. 4 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ของยุงลายบ้านที่มีการกลายพันธุ์ V1016G (GenBank: AB914689.1) 2.2) ยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่เป็นสายพันธุ์ปกติ (V1016) และ 2.3) ยุงลายบ้านในพื้นที่ศึกษาทั้ง 6 จังหวัดที่มีการกลายพันธุ์ V1016G (GTA→GGA)

Figure 2 Partial nucleotide sequences of *para* gene at S6 segment in domain II (IIS6) of voltage-gated sodium channel protein in *Ae. aegypti* (exon 20). 2.1) Ref. 3 is a wild-type strain of *Ae. aegypti* (GenBank: AB914690.1) and Ref. 4 is *Ae. aegypti* with V1016 mutation (GenBank: AB914689.1) 2.2) Wild-type laboratory strain of *Ae. aegypti* (V1016) and 2.3) *Ae. aegypti* mosquitoes that die from natural compound aerosol spray in the fields of 6 provinces with V1016G mutation (GTA→GGA)

ตารางที่ 3 ความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *para* ในยุงลายบ้านที่ตายจากการประเมินผลของสเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซในพื้นที่ภาคสนาม 6 จังหวัด

Table 3 Mutation frequencies of *para* gene in *Ae. aegypti* mosquitoes that died from natural compound aerosol spray in the fields of 6 provinces

ตำแหน่ง	ความถี่การกลายพันธุ์ของยีน <i>para</i> ในยุงลายบ้าน						
	(จำนวนตัวอย่าง DNA ที่พบการกลายพันธุ์/จำนวนตัวอย่าง DNA ที่วิเคราะห์ทั้งหมด)						
กรดอะมิโน	ห้องปฏิบัติการ	กาญจนบุรี	จันทบุรี	ชุมพร	พิษณุโลก	นครปฐม	นครราชสีมา
S989P	0 (0/30)	0.23 (7/30)	0.40 (12/30)	0.27 (8/30)	0.37 (11/30)	0.23 (7/30)	0.27 (8/30)
V1016G	0 (0/30)	0.30 (9/30)	0.47 (14/30)	0.43 (13/30)	0.47 (14/30)	0.37 (11/30)	0.30 (9/30)



ภาพที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *Rdl* บริเวณ GABA receptor ของยุงลายบ้าน 3.1) Ref. 5 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *Rdl* ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติ (GenBank: U28803.1) และ Ref. 6 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *Rdl* ของยุงลายสวนและยุงรำคาญสายพันธุ์กลายพันธุ์ A302S ซึ่งเหมือนกับของยุงลายบ้าน⁽¹¹⁾ 3.2) ยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ไม่มีการกลายพันธุ์ A302 และ 3.3) ยุงลายบ้านในพื้นที่ภาคสนามจังหวัดนครปฐมและจังหวัดกาญจนบุรี มีการกลายพันธุ์ A302S (GCA→TCA)

Figure 3 Partial nucleotide sequences of the *Rdl* gene at GABA receptor in *Ae. aegypti*. 3.1) Ref. 5 is a wild-type strain of *Ae. aegypti* (GenBank: U28803.1) and Ref. 6 is *Ae. albopictus* or *Cx. Quinqüefasciatus* with A302S mutation that contains a partial nucleotide sequence corresponding to that of *Ae. aegypti*⁽¹¹⁾ 3.2) Wild-type laboratory strain of *Ae. aegypti* (A302) and 3.3) *Ae. aegypti* mosquitoes that died from natural compound aerosol spray in the fields of Kanchanaburi and Nakhon Pathom provinces with A302S mutation (GCA→TCA)

ตารางที่ 4 ความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *Rdl* ในยุงลายบ้านที่ตายจากการประเมินผลของสเปรย์สารธรรมชาติสกัดกำจัดในพื้นที่ภาคสนาม 6 จังหวัด

Table 4 Mutation frequencies of the *Rdl* gene in *Ae. aegypti* mosquitoes that died from natural compound aerosol spray in the fields of 6 provinces

ตำแหน่ง	ความถี่การกลายพันธุ์ของยีน <i>Rdl</i> ในยุงลายบ้าน						
	(จำนวนตัวอย่าง DNA ที่พบการกลายพันธุ์/จำนวนตัวอย่าง DNA ที่วิเคราะห์ทั้งหมด)						
กรดอะมิโน	ห้องปฏิบัติการ	กาญจนบุรี	จันทบุรี	ชุมพร	พิษณุโลก	นครปฐม	นครราชสีมา
A302S	0 (0/30)	0.13 (4/30)	0 (0/30)	0 (0/30)	0 (0/30)	0.2 (6/30)	0 (0/30)

วิจารณ์

การพัฒนากลไกการต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้าน โดยมีการกลายพันธุ์ของยีนเป้าหมายของสารเคมีกำจัดแมลงในยุงลายบ้านเกิดจากการใช้สารเคมีกำจัดแมลงในการควบคุมยุงลายบ้านและป้องกันการระบาดของโรคไข้เลือดออกอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ซึ่งการพัฒนากลไกดังกล่าวในยุงลายบ้านทำให้ยุงลายบ้านมีความแข็งแรงและทนทานต่อสารเคมีกำจัด

แมลงมากกว่ายุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเป้าหมายของสารเคมีกำจัดแมลง และมีความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้ไม่สามารถใช้ผลิตภัณฑ์เคมีกำจัดแมลงที่มีสารออกฤทธิ์เป็นชนิดของสารเคมีกำจัดแมลงที่ยุงลายบ้านได้พัฒนาการต่อแล้วในการควบคุมยุงลายบ้านที่ต่อสารเคมีกำจัดแมลงระดับพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผู้วิจัยและคณะได้รายงานการตรวจพบการกลายพันธุ์

ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 989 (S989P) และ 1016 (V1016G) ในตัวอย่าง DNA เดียวกันของยุงลายบ้านจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา โดยมีความถี่การกลายพันธุ์ที่ 0.30-0.60⁽⁸⁾ ซึ่งได้สนับสนุนรายงานที่ผ่านมาที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนดังกล่าวในตัวอย่าง DNA เดียวกันของยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์จากหลายจังหวัดในประเทศไทย⁽¹³⁻¹⁵⁾ นอกจากนี้ผู้วิจัยและคณะยังได้ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *Rdl* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 302 (A302S) ในยุงลายบ้านจากจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดนครปฐม⁽⁶⁾ โดยมีความถี่การกลายพันธุ์ที่ 0.20 และ 0.30 ตามลำดับด้วยปัจจัยดังกล่าวจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การควบคุมยุงลายบ้านไม่มีประสิทธิภาพดีพอและทำให้ยังมีรายงานการระบาดของโรคไข้เลือดออกในหลายพื้นที่ทั่วประเทศไทยจนมาถึงปัจจุบัน⁽²⁾

งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาสเปรย์อัดก๊าซที่มีสารธรรมชาติ 5 ชนิดในกลุ่ม monoterpenoids เป็นสารสำคัญซึ่งสเปรย์อัดก๊าซที่ได้พัฒนาขึ้นอาจใช้เป็นทางเลือกหนึ่งแทนการใช้ผลิตภัณฑ์เคมีกำจัดแมลงที่มีจำหน่ายในท้องตลาดหลายชนิดที่ผู้วิจัยได้นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงระดับพันธุกรรมจากพื้นที่ศึกษาทั้ง 6 จังหวัดในตู้ทดสอบ โดยพบว่า ผลิตภัณฑ์เคมีกำจัดแมลงหลายชนิดไม่มีประสิทธิภาพดีพอ โดยให้อัตราตายของยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงระดับพันธุกรรมจากพื้นที่ศึกษาทั้ง 6 จังหวัด ต่ำกว่าร้อยละ 50 อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยนี้ พบว่าสเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซมีประสิทธิภาพในการกำจัดยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมในพื้นที่ภาคสนามทั้ง 6 จังหวัด โดยพบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 989 (S989P) และ 1016 (V1016G) ในตัวอย่าง DNA เดียวกันของยุงลายบ้านในพื้นที่ภาคสนามทั้ง 6 จังหวัด รวมถึงมีประสิทธิผลในการกำจัดยุงลายบ้านดื้อสารฟิโพรนิลระดับพันธุกรรมในพื้นที่ภาคสนามของจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดนครปฐม โดยพบการกลายพันธุ์ของยีน *Rdl* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 302 (A302S) จาก

งานวิจัยนี้ทำให้เกิดความเชื่อมั่นว่าสเปรย์สารธรรมชาติอัดก๊าซที่ได้พัฒนาขึ้นจะสามารถนำไปใช้ในการกำจัดยุงลายบ้านที่ดื้อสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมที่มีรายงานในหลายจังหวัดของประเทศไทยได้จริงและป้องกันการระบาดของโรคไข้เลือดออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ ผลการศึกษาที่ได้ยังสนับสนุนงานวิจัยที่ผ่านมาที่มีรายงานว่าสารในกลุ่ม monoterpenoids มีฤทธิ์ทำให้แมลงตายด้วยการไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase⁽¹⁶⁻¹⁷⁾ ที่ทำหน้าที่ทำลายสารสื่อประสาท acetylcholine เมื่อเอนไซม์ดังกล่าวถูกจับโดยสารในกลุ่ม monoterpenoids จึงทำให้เกิดการสะสมของ acetylcholine ที่รอยต่อประสาท ทำให้แมลงถูกกระตุ้นตลอดเวลาและตายในที่สุด ซึ่งเป็นกลไกการออกฤทธิ์ที่ทำให้แมลงตายเช่นเดียวกับสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและกลุ่มคาร์บาเมต

การควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคไข้เลือดออกและโรคที่นำโดยยุงลายบ้านควรควบคุมยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงระดับพันธุกรรมแบบบูรณาการที่มีความปลอดภัย โดยมุ่งเน้นกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายบ้านอย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่อง กำจัดลูกน้ำยุงลายบ้านโดยหมუნเวียนกลุ่มสารกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน เช่น แบคทีเรียกำจัดลูกน้ำยุงลายบ้าน ชนิด *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) สปินโนแซด (spinosad) และสารควบคุมการเจริญเติบโตของแมลง (insect growth regulators, IGRs) ลดจำนวนยุงตัวเต็มวัยโดยใช้วัสดุอุปกรณ์กำจัดยุงและใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพร เช่น น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน⁽⁷⁾ และสารธรรมชาติในกลุ่ม monoterpenoids⁽⁸⁾ ป้องกันกำจัดยุงลายบ้านที่มีความปลอดภัยเพื่อป้องกันโรคที่นำโดยยุงลายบ้าน ควรลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลงหรือใช้เท่าที่จำเป็นเพื่อลดหรือชะลอการพัฒนาการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุง โดยงานวิจัยนี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นนวัตกรรมผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดยุงพาหะนำโรคที่ดื้อสารเคมีกำจัดแมลงระดับพันธุกรรมแทนการใช้ผลิตภัณฑ์เคมีกำจัดยุงเพื่อป้องกันโรคที่นำโดยยุง

สรุป

งานวิจัยนี้สรุปได้ว่าสเปร์ยสารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านต้อสารไพรีทรอยด์และสารไพโรนิลระดับพันธุกรรมในพื้นที่เสี่ยงโรคไข้เลือดออกในประเทศไทย โดยให้อัตราตายของยุงลายบ้านในพื้นที่ภาคสนาม 6 จังหวัด ร้อยละ 100 ที่ 24 ชั่วโมง โดยพบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง คือ 989 (S989P) และ 1016 (V1016G) ในยุงลายบ้านที่ตายจากการประเมินผลของสเปร์ยสารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านในพื้นที่ภาคสนาม 6 จังหวัด โดยมีความถี่การกลายพันธุ์ที่ 0.23-0.40 และ 0.30-0.47 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบการกลายพันธุ์ของยีน *Rdl* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 302 (A302S) ในยุงลายบ้านที่ตายจากการประเมินผลของสเปร์ยสารธรรมชาติสกัดกำจัดยุงลายบ้านในพื้นที่ภาคสนามจังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดนครปฐม โดยมีความถี่การกลายพันธุ์ที่ 0.13 และ 0.2 ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลในพื้นที่ศึกษา 6 จังหวัด ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Limkittikul K, Brett J, L'Azou M. Epidemiological trends of dengue disease in Thailand (2000–2011): A Systematic Literature Review. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(11):e3241.
2. Department of Disease Control (TH), Division of Epidemiology. DHF total [Internet]. [cited 2023 May 4]. Available from: http://doe.moph.go.th/surdata/506wk/y66/d262766_1766.pdf (in Thai)
3. Saavedra-Rodriguez K, Maloof FV, Campbell CL, Garcia-Rejon J, Lenhart A, Penilla P, et al.

- Parallel evolution of *vgsc*. mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. Sci Rep. 2018;8(1):6747.
4. Muthusamy R, Shivakumar MS. Susceptibility status of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos from three districts of Tamil Nadu, India. J Vector Borne Dis. 2015;52:159–65
 5. Thompson M, Steichen JC, Ffrench-Constant, RH. Conservation of cyclodiene insecticide resistance-associated mutations in insects. Insect Mol Biol. 1993;2:149–54.
 6. De Souza, L da Silva MJF, Macêdo LJ, Lacerda-Neto MAC, dos Santos HDM, Coutinho FAB, et al. Adulticide and repellent activity of essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)—A review. S Afr J Bot. 2019;124:160–5.
 7. Chompoonsri J, Khamsawads C, Tacharoenmuang R, Krutbut J, Makruen T, Rojanawiwat A, Efficacy of lemongrass aerosol sprays against insecticide-resistant *Aedes aegypti* mosquitoes from dengue risk areas. Dis Control J. 2022;48:83–98. (in Thai)
 8. Chompoonsri J, Khamsawads C, Krutbut J, Makruen T, Rojanawiwat A, Efficacy of natural compounds against genetically insecticide-resistant *Aedes aegypti* mosquitoes from dengue-risk areas in 6 provinces, Thailand. Beyond Resilience 2022 “Sustainable health development: Post Covid-19 pandemic crisis”; 2022 Sep 14–16; The 60th Anniversary of His Majesty the King's Accession to the Throne International Convention Center, Prince of Songkla University, Songkla province; 2022. P. 98. (in Thai)
 9. Sri-ard B. Preliminary research. 10th Ed. Bangkok:

- Suweriyasan Printing; 2017. (in Thai)
10. Chompoonsri J, Tacharoenmuang R, Khamsawads C, Methawanitphong N, Krutbut J, Makruen T, et al. Insecticide susceptibility of genetically pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* mosquitoes. *Dis Control J*. 2021;47:1303-18. (in Thai)
11. Tantely ML, Tortosa P, Alout H, Berticat C, Berthomieu A, Rutee A, et al. Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Reunion Island. *Insect Biochem Mol Biol*. 2010;40(4): 317-24.
12. Abbott W. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol*. 1925; 18:265-7.
13. Sirsawat R, Komalamisra N, Apiwathnasorn C, Paeporn P, Roytrakul S, Rongsriyam Y, et al. Field-collected permethrin-resistant *Aedes aegypti* from central Thailand contain point mutations in the domain IIS6 of the sodium channel gene (*kdr*) Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 2012;43(6):1380-6.
14. Srisawat R, Komalamisra N, Eshita Y, Zheng M, Ono K, Itoh TQ, et al. Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Appl Entomol Zool*. 2010;45:275-82.
15. Plernsub S, Saingamsook J, Yanola J, Lumjuan N, Tippawangkosol P, Sukontason K, et al. Additive effect of knockdown resistance mutations, S989P, V1016G and F1534C, in a heterozygous genotype conferring pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Parasit Vectors*. 2016;9:417.
16. Zarrad K, Laarif A, Ben Hamouda A, Chaieb I, Mediouni-Ben Jemia J. Anticholinesterase potential of monoterpenoids on the whitefly *bemisia tabaci* and their kinetic studies. *J Agr Sci Tech*. 2017;19:643-52.
17. Georgiev B, Nikolova M, Aneva I, Dzhurmanski A, Sidjimova B, Berkov S. Plant products with acetylcholinesterase inhibitory activity for insect control. *BioRisk*. 2022;17:309-15.