บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยฉบับนี้ได้ทดลองและศึกษาประเมินสมรรถนะของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* หลังได้รับการถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ณ ที่นี้ได้ศึกษา *Wolbachia* ที่สกัดจากเรือดที่พบในประเทศไทยและงานวิจัยนี้ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F จัดอยู่ในกลุ่ม alpha-proteobacteria แบคทีเรียนี้จำเป็นต้องอาศัยภายในเซลล์ของโฮสต์ของแมลงสัตว์ขาปล้อง ซึ่งเคยมีรายงานการอุบัติการณ์การติดเชื้อพบว่าติดเชื้อในแมลงถึง 16-22% [20][28] ทั้งนี้ นักวิจัยจึงได้สาธิตให้เห็นถึงบริเวณที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ที่อวัยวะสืบพันธุ์ในยุงลายบ้านพร้อมกันด้วย

เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ใช้ในงานวิจัยเป็นแบคทีเรียที่ติดเชื้อในเรือด *Cimex hemipterus* อยู่แล้วตามธรรมชาติและหาได้ง่ายในประเทศเขตร้อนดังเช่นประเทศไทย จึงเป็นที่สนใจและได้นำมาสกัดเชื้อเพื่อนำมาทำการทดลอง โดยบดไข่ของเรือดในสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วฉีดเข้าบริเวณอกของยุงลายบ้านตัวเต็มวัย อายุ 3 วัน ที่บริเวณระหว่าง Posterior pronotum และ Sternopleuron เพื่อดัดแปลงพันธุกรรม ผลการทดลองของงานวิจัยนี้สามารถนำมาประยุกต์เพื่อแทนที่ประชากรยุงที่เป็นพาหะของเชื้อก่อโรคและลดความเป็นพาหะรวมถึงลดการแพร่กระจายเชื้อก่อโรคได้

อภิปรายผลการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในเรือดและการถ่ายทอดเชื้อในยุงลายบ้าน

ผลการทดลองของงานวิจัยนี้คือสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F เพื่อตรวจสอบหาการติดเชื้อ *Wolbachia* โดยเทคนิค semi-nested PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ WSpecF - WSpecR ขนาด 438 bp [55] และ INTF2 [37] - WSpecR ขนาด 241 bp ภายใต้สภาวะโปรแกรมของ PCR ดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้นแยกสาย DNA คือ 95^{0}C เวลา 5 นาที แล้วตามด้วยอุณหภูมิ 95^{0}C, 55^{0}C และ 72^{0}C อุณหภูมิละ 1 นาที จำนวน

40 รอบ และอุณหภูมิการต่อสายดีเอ็นเอช่วงสุดท้ายที่ 72^{0}C เวลา 5 นาที [45] ซึ่งสุดท้ายได้ชิ้นส่วน DNA ขนาด 241 bp สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้รายงานมาก่อนแล้ว [46] ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ตัวอย่างของชิ้นส่วนยีน 16s rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในเรือดเขตร้อน *Cimex hemipterus* ดังกล่าวไม่มีรายงานฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 241 bp ใน GenBank

ผู้วิจัยได้ทดสอบการติดเชื้อแบคทีเรียนี้ต่อยุงลายบ้านด้วยวิธีการฉีดสารละลายเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ F ที่สกัดจากไข่ของเรือด *Cimex hemipterus* ด้วยเทคนิควิธี microinjection เข้าไปในยุงลายบ้านเพศเมียตัวเต็มวัยอายุ 3 วัน ทั้งหมด 60 ตัว เพื่อนำข้อมูลมาเป็นแนวทางในการประเมินความแข็งแรงและ/หรือสมรรถนะของยุงลายบ้านพาหะของไวรัสไข้เลือดออก ไวรัสไข้เหลือง และเชื้อฟิลาเรีย หลังจากฉีดเชื้อและได้รับสารอาหารประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนรอดชีวิตผลปรากฏว่ารอด 11 ตัว และผลการทดสอบการติดเชื้อด้วยเทคนิคทาง Semi-nested PCR เช่นเดียวกับที่ได้ทดสอบในเรือดพบว่ามีการติดเชื้อ 10 ตัว จากจำนวนที่รอดชีวิต คิดเป็น 90.91% ในรุ่น G_0 แสดงให้เห็นว่าการทำให้ยุงติดเชื้อด้วยเทคนิคการทำ Microinjection กับยุงตัวเต็มวัยเข้าบริเวณระหว่าง Posterior pronotum และ sternoplueron [43] เป็นเทคนิควิธีการที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมต่อการศึกษาวิจัยนี้และงานวิจัยในอนาคตต่อไป ทั้งนี้งานวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสามารถสร้างติดเชื้อ *Wolbachia* ระหว่าง Order ของแมลงแบบแนวราบ (horizontal transmission) ได้ นอกเหนือจากการถ่ายทอดเชื้อแบบแนวดิ่งทางระบบสืบพันธุ์ [56] ถึงแม้ว่ายุงลายบ้านที่ได้รับการฉีดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ F นี้จะรอดชีวิตเพียง 18.33% (11/60) เมื่อเทียบกับจำนวนยุงที่นำมาฉีดทั้งหมด ซึ่งน้อยกว่าวิธีการฉีดเชื้อเข้าตัวอ่อนของแมลงหวี่และหนอนตัวกลม [13] [20] ก็ตาม อาจเนื่องมาจากความไม่เหมาะสมของวัสดุอุปกรณ์บางชนิด เช่น

1) ขนาดและลักษณะของปลายเข็มที่ใช้ฉีด นั้น เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดขนาดและลักษณะบาดแผลบนตัวของยุง อาจมีผลต่อการรอดชีวิตของยุงมากที่สุด ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำเข็มสำหรับฉีดเองแต่คุณสมบัติอาจไม่ดีพอ ดังนั้นควรมีเข็มที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการทดลอง

2) ทักษะของผู้วิจัย ต้องมีความเชี่ยวชาญในการฉีด ที่สำคัญคือมุมของเข็มที่สัมผัสกับผิวบริเวณอกของยุงมีผลต่อการเกิดขนาดแผลจากเข็มและสะท้อนถึงการรอดชีวิตของยุงที่นำมาทดลองอย่างมาก

3) ระยะเวลาที่ยุงสลบบนน้ำแข็งที่เหมาะสมก่อนฉีด ควรฉีดยุงทันทีที่ยุงสลบจะทำให้ยุงรอดชีวิตได้มาก

และ 4) ปริมาตร ปริมาณ คุณภาพและความเข้มข้นของสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องใช้ฉีด สำหรับงานวิจัยนี้ใช้ปริมาตรประมาณ 0.2 µl ซึ่งเชื้อแบคทีเรียสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้แสดงให้เห็นว่าปริมาตรที่ใช้ฉีดเชื้อ *Wolbachia* นี้ เหมาะสมต่อการศึกษา อีกทั้งแบคทีเรีย *Wolbachia* สามารถติดเชื้อได้ในหลายอวัยวะของร่างกายแมลงประกอบด้วย เนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ เช่น รังไข่และอัณฑะ ทั้งนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อใน ท่อลม ทางเดินอาหารส่วนกลาง กล้ามเนื้อส่วนนอก ส่วนหัว และส่วน Spermatocyst [43] แต่อัตราการติดเชื้อของงานวิจัยนี้เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์และไม่คงที่อาจเป็นเพราะแบคทีเรียต้องเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมบางชนิดใหม่เพื่อปรับตัวให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมของไซโตพลาสซึมจากเซลล์เรือดเป็นไซโตพลาสซึมของเซลล์ยุงลายซึ่งเป็นแมลงต่าง Order กัน ในการนี้อาจต้องใช้ระยะเวลายาวนานต่อการวิวัฒนาการในการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตด้วยการพึ่งพากันอาศัยกันอย่างถาวรตลอดกาล

ส่วนกรณียุงลายกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อจากการฉีดอาจเป็นเพราะเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ได้ หรืออาจเกิดจากการตายของเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการสกัดหรือรอเตรียมฉีดเข้าในยุง ซึ่งช่วงเวลานี้แบคทีเรียอยู่นอกเซลล์ถึงแม้จะเตรียมเชื้อไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ก็ตามที

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ยืนยันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และศึกษาการเปลี่ยนแปลงเบสบางชนิดเพื่อให้อยู่รอดในเซลล์ของยุงนั้น เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่ติดเชื้อในยุงลายบ้านกับเชื้อแบคทีเรียในไข่เรือดเขตร้อน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกัน ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียจากยุงลายบ้านมีการเปลี่ยนแปลงในบางตำแหน่งที่แตกต่างกันและแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Wolbachia* ในไข่เรือด ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีเบสเปลี่ยนแปลงแบบแทนที่ ดังนี้ ในยุงลายบ้านเพศผู้ มีตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบแทนที่ในตำแหน่งที่ 92 คือ เปลี่ยนแปลงจากเบส A เป็นเบส G ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียจากยุงลายบ้านเพศเมียแบบที่หนึ่ง มีตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงแบบแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 68 คือ เบสเปลี่ยนแปลงจากเบส T เป็นเบส A และลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียจากยุงลายบ้านเพศเมียแบบที่สอง มีตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงแบบแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 95 คือ เบสเปลี่ยนแปลงจากเบส C เป็นเบส T แต่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียจากยุงลายบ้านเพศเมียแบบที่สาม ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเบสใดๆของชิ้นส่วนยีนขนาด 241 bp

ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* บริเวณส่วนของชิ้นยีน 16S rRNA ที่ติดเชื้อในยุงลายบ้านเมื่อเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อแบคทีเรีย *Wobachia* ในไข่เรือด (*Cimex hemipterus*) พบว่าลำดับของกรดอะมิโนในยุงลายบ้านเพศผู้ มีตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงที่

แตกต่างกันในตำแหน่งที่ 31 คือ เปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโน Lysine (K) เป็นกรดอะมิโน Arginine (R) ลำดับของกรดอะมิโนในยุงลายบ้านเพศเมียแบบที่หนึ่ง มีตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกัน ในตำแหน่งที่ 23 คือ เปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโน Valine (V) เป็นกรดอะมิโน Aspartic acid (D) แต่ในลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรียจากยุงลายบ้านเพศเมียแบบที่สองและแบบที่สาม ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนใดๆของชิ้นส่วนยีนขนาด 241 bp ที่มีลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด 79 ชนิด

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์และความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* (F-supergroup) ที่ติดเชื้อในเรือดและติดเชื้อในยุงลายบ้านทั้งเพศผู้และเพศเมียซึ่งส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของในยุงที่แตกต่างจากในเรือดอาจเป็นเพราะว่า เชื้อแบคทีเรียจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อปรับตัวให้สามารถดำงรงชีวิตในเซลล์ของยุงได้ อย่างไรก็ตามสำหรับกรณีที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และ/หรือลำดับกรดอะมิโนแสดงว่าแบคทีเรียสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมใหม่และสามารถดำรงชีวิตต่อไปในเซลล์ยุงดังกล่าวได้ หากศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวกว่านี้หรือศึกษานิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน 16s rRNA น่าจะพบลักษณะของการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์และ/หรือการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในหลายๆตำแหน่งมากขึ้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต เพื่อให้สามารถนำผลการทดลองมาประยุกต์ใช้ได้จริงและแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F อาจเป็นแบคทีเรียอีกหนึ่งสายพันธุ์ที่สามารถเป็นอีกแนวทางเลือกในการนำมาสร้างเวคเตอร์เพื่อขนถ่ายยีนต้านเชื้อก่อโรคเข้าสู่ประชากรของแมลงพาหะนำเชื้อโรค เพื่อแทนที่ และยับยั้งประชากร (population suppress and replacement) แมลงที่ไม่สามารถต้านเชื้อก่อโรคได้ [20]

2. การสาธิตการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในอวัยวะสืบพันธุ์ของยุง

ส่วนของ DNA สายเดี่ยว 2 เส้น ที่ติดฉลากด้วยสาร fluorescence คือ VK INTF probe (5' fluoro TCC ATA AAG GCC ATG ACT) และ VK INTR probe (5' fluoro TCA TGT ACT CGA ATT GCA GAG T) ที่เรียกว่า "labeled probe" ซึ่งมีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับ DNA เป้าหมาย สามารถจับกับ DNA เป้าหมายนั้นเกิดเป็น "hybrids" ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม คือหลักการการสาธิตให้เห็นตำแหน่งบริเวณที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Fluorescence *in Situ* Hybridization (FISH) ปัจจุบันถือว่าเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาการแสดงออกของ DNA ของยีนเป้าหมายโดยที่โครงสร้างเซลล์ไม่ถูกทำลาย ยืนยันได้โดยการย้อมด้วย DAPI ในระหว่างกระบวนการ Hybridization ของโอลิโก

นิวคลีโอไทด์โพรบ (labeled single-stranded fragment of DNA) ซึ่งจะย้อมสีที่บริเวณนิวเคลียสของเซลล์และตรวจสอบการย้อมสีด้วยฟิลเตอร์เฉพาะสำหรับแสงสีน้ำเงินจากกล้องฟลูออเรสเซนต์ ทั้งนี้เทคนิคนี้ยังสะดวก รวดเร็วและปลอดภัยต่อผู้ศึกษาทดลอง ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ใช้วิธีการนี้เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน 16S rRNA (Gene expression) รวมถึงการแสดงออกของโครงสร้างประชากร (Population structure) พลวัตการกระจายเชื้อ (Dynamics) ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวอย่างเป็นสำคัญ วิธีการ Fluorescence *in situ* DNA-DNA hybridization (FISH) นี้อาจจะสามารถศึกษาได้ถึงลักษณะกลไกทางพันธุกรรม สรีระวิทยา วงจรชีวิต และการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมในยุงลายบ้านได้ด้วย พร้อมกันนี้อาจใช้ศึกษาการสร้างสารเมทาบอไลต์ของแบคทีเรียในเซลล์ตัวอ่อน (Germ cell) ของยุงและการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์แบคทีเรียและเซลล์ของโฮสต์ [21] [30] ได้

จากการทดลองศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแบคทีเรียในเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์เนื่องจากเป็นบริเวณที่ติดเชื้ออย่างหนาแน่น [21] และอวัยวะที่ใกล้เคียงดังกล่าวพบว่า มีการแสดงออกของเชื้อแบคทีเรียได้ดังนี้

1) อัณฑะของยุงลายบ้านเพศผู้ พบการกระจายของเชื้อแบคทีเรียจะมีลักษณะเป็นจุดสีเขียวทั่วทั้งพูของอัณฑะซึ่งต้องใช้กำลังขยายมากกว่าการศึกษาในตัวอ่อนและรังไข่ จากผลการศึกษาแสดงให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สามารถดำรงชีพในเซลล์อัณฑะของยุงได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Veneti และคณะ ที่รายงานว่ามีการติดเชื้อ *Wolbachia* ได้ในซีสต์ (Cyst) ภายในอัณฑะของแมลงหวี่และเชื้อจะทำหน้าที่ดัดแปลงพันธุกรรมของเซลล์สืบพันธุ์ (*mod*$^+$) ได้ [53] แต่ในทางตรงกันข้ามจะไม่พบเชื้อแบคทีเรียในตัวอสุจิของยุงเนื่องจากเชื้อมีบทบาทต่อการดัดแปลงสารพันธุกรรมของเซลล์เพศเท่านั้นและเคลื่อนที่ออกจากตัวอสุจิก่อนที่อสุจิจะมีพัฒนาการเป็นระยะตัวเต็มวัยที่พร้อมผสมพันธุ์กับเซลล์ไข่ของเพศเมีย [48] ในการนี้เนื่องจากอสุจิของยุงมีขนาดเล็กจึงยากต่อการเตรียมตัวอย่างและยากต่อการทดลองสาธิตให้เห็นการติดเชื้อด้วยเทคนิคการ hybrid ด้วยโพรบ ดังนั้นอาจจะต้องศึกษาการติดเชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในตัวอสุจิหรือ Spermatocyst ของยุงได้ด้วยเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เพราะเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถแสดงให้เห็นถึงระดับออแกเนลของเซลล์อย่างชัดเจนจึงอาจจะสาธิตเห็นการติดเชื้อได้

2) ตัวอ่อน พบการกระจุกของสีเขียวของสารฟลูออเรสเซนต์ของโพรบที่จำเพาะต่อยีนของเชื้อ *Wolbachia* เกือบทุกบริเวณของเซลล์ตัวอ่อนโดยเฉพาะบริเวณขอบ (cortical region) และส่วนหัว (anterior side) และท้าย (posterior side) สอดคล้องกับงานวิจัยที่เคย

รายงานมาแล้วของ Xi และ คณะ แสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถถ่ายทอดไปสู่ยุงในรุ่นลูกได้ทางระบบสืบพันธุ์ของเพศเมีย [60] [61]

3) รังไข่ ภาพที่ศึกษาจากกล้องฟลูออเรสเซนต์สามารถแสดงให้เห็นการติดเชื้อของแบคทีเรียได้อย่างแตกต่างเมื่อเทียบกับรังไข่ที่ไม่มีการติดเชื้อ ส่วนภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอลนั้น รังไข่ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแยกออกจากกันได้ไม่ชัดเจนอาจเนื่องมาจากมีอัตราการติดเชื้อค่อนข้างต่ำ [60] ในตัวอย่างที่ศึกษา แต่ผลของ Semi-nested PCR สามารถยืนยันได้ว่ามีการติดเชื้อจริง ดังนั้นผู้วิจัยควรต้องมีทักษะในการศึกษาตัวอย่างจากกล้องคอนโฟคอลพอสมควรจึงจะสามารถศึกษาเปรียบเทียบตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง หรืออาจต้องปรับปรุงเทคนิคและวัสดุอุปกรณ์บางอย่างในระหว่างการดำเนินการทดลองให้ได้มาตรฐานและเหมาะสม

และ 4) ระบบท่อทางเดินอาหารและระบบสืบพันธุ์ พบว่ามีการติดเชื้ออย่างสูงที่เนื้อเยื่อบริเวณนี้สังเกตได้จากจุดสีเขียวชัดเจนจำนวนมากตามทางยาวของระบบท่อต่างๆ ทั้งภาพจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์และกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล

3. สมรรถนะของยุงลายบ้านหลังติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

การประเมินสมรรถนะหรือความแข็งแรงของยุงที่ติดเชื้อ *Wolbachia* เป็นอีกปัจจัยที่จำเป็นต้องศึกษาเนื่องจากเป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นถึงผลกระทบของการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อแบคทีเรียต่อเซลล์ของโฮสต์ในเชิงการแพร่เชื้อ รวมถึงการส่งถ่ายไปยังรุ่นลูกในหลายต่อหลายรุ่น ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียและความสามารถในการสืบพันธุ์ [31] ของยุงลายบ้านที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยพารามิเตอร์ของการประเมินสมรรถนะซึ่งประกอบด้วย การวัดระยะเวลาของวงจรชีวิต การวางไข่ การฟักไข่ การถ่ายทอดเชื้อจากแม่สู่ลูก ขนาดร่างกาย ความสามารถในการแข่งขันการแย่งอาหาร การแย่งเข้าคู่ผสมพันธุ์ของทั้งเพศผู้และเพศเมีย ปริมาณและคุณภาพของเชื้ออสุจิของยุงที่อายุยังน้อย เพราะ Crespigny และ Wedell กล่าวว่าหากยุงที่มีอายุมากอาจจะมีการเก็บอสุจิไว้ในอวัยวะเก็บอสุจิอย่างดีและแน่นจึงยากที่จะหาปริมาณอสุจิได้อย่างถูกต้อง [10]

ฉะนั้น พารามิเตอร์เหล่านี้เป็นสิ่งจำเป็นต้องดำเนินการศึกษาเพื่อสร้างความน่าเชื่อถือ ความเชื่อมั่นและมีความปลอดภัยก่อนตัดสินใจเลือก *Wolbachia* สายพันธุ์ดังกล่าวมาประยุกต์เป็นเวคเตอร์เพื่อใช้เป็นพาหนะขับเคลื่อนยีนที่สนใจเข้าไปแทนที่ประชากรยุงพาหะที่ไม่สามารถต่อต้านการส่งถ่ายเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาในห้องทดลองก่อนนำไปประยุกต์ใช้นอกห้องทดลองหรือในธรรมชาติต่อไป

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาขนาดของร่างกายยุงอายุ 10 วัน และปริมาณของเชื้ออสุจิที่อายุ 5 และ 10 วัน อัตราการฟักไข่เปรียบเทียบกันระหว่างยุงที่ติดเชื้อกับยุงที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F พารามิเตอร์ดังกล่าวสามารถนำมาประเมินความสามารถของยุงต่อการแข่งขันเข้าคู่ผสมพันธุ์ ซึ่งยุงที่มีขนาดใหญ่ทั้งเพศผู้และเพศเมียอาจมีโอกาสประสบความสำเร็จในการแข่งขันผสมพันธุ์ได้มากกว่ายุงขนาดเล็ก พร้อมกับวัดความสำเร็จในการผสมพันธุ์ด้วยอัตราการฟักไข่นั่นเอง และพบว่า

1) ยุงลายบ้านเพศเมียอายุ 10 วัน ที่ติดเชื้อมีความยาวเส้นปีกเท่ากับ 2.90 ± 0.01 mm ซึ่งความยาวไม่แตกต่างจากยุงที่ไม่ติดเชื้อซึ่งมีความยาวเส้นปีกเท่ากับ 2.82 ± 0.04 mm อย่างมีนัยสำคัญ ที่ *p*-value เท่ากับ 0.115 แสดงว่ายุงติดเชื้อเพศเมียมีขนาดร่างกายไม่แตกต่างจากยุงที่ไม่ติดเชื้อ และนั่นหมายถึงว่ายุงติดเชื้ออาจจะมีความสามารถในการแข่งขันแย่งหาอาหารและแย่งคู่ผสมพันธุ์เท่ากับยุงตามธรรมชาติ ดังนั้นเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ไม่มีผลกระทบต่อขนาดของร่างกายของยุงลายเพศเมีย

2) ยุงลายบ้านเพศผู้อายุ 10 วัน ที่ติดเชื้อมีความยาวเส้นปีกท่ากับเท่ากับ 2.12 ± .02 mm ซึ่งมีค่าแตกต่างจากยุงที่ไม่ติดเชื้อที่มีความยาวเส้นปีกเท่ากับ 2.21 ± .02 mm อย่างมีนัยสำคัญ ที่ *p*-value เท่ากับ .000 ความยาวเส้นปีกของยุงในการทดลองดังกล่าวมีขนาดใกล้เคียงกับที่เคยรายงานไว้ของ Ponlawat และ Harrington คือ 2.27 mm ในกรณียุงขนาดใหญ่ และ 1.85 mm ในกรณียุงขนาดเล็ก [40] ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า เชื้อแบคทีเรียมีผลกระทบต่อขนาดร่างกายของยุงลายบ้านเพศผู้ในระยะยาว เช่นที่อายุประมาณ 10 วัน แล้วทำให้โอกาสในการแข่งขันหาอาหารหรือเข้าคู่ผสมพันธุ์อาจจะน้อยกว่ายุงในธรรมชาติและอาจตายเร็วกว่า จึงนับว่าเชื้อแบคทีเรียนี้สร้างผลกระทบเชิงลบต่อยุงลายเพศผู้นอกเหนือจากผลกระทบในการ modified อสุจิซึ่งเป็นสาเหตุของปรากฏการณ์ความไม่เข้ากันของไซโตพลาสซึม

ขนาดร่างกายของยุง เป็นอีกพารามิเตอร์หนึ่งที่อาจจะเกี่ยวข้องกับความสำเร็จในการผสมพันธุ์และอาจมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับขนาดอวัยวะสืบพันธุ์รวมถึงจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ด้วย แต่โดยทั่วๆไปขนาดร่างกายอาจมีผลเกี่ยวเนื่องมาจากปริมาณลูกน้ำที่เลี้ยงในภาชนะ ยิ่งมีจำนวนลูกน้ำที่เลี้ยงรวมกันมากทำให้พื้นที่ว่างต่อลูกน้ำมีน้อย จึงทำให้ขนาดลูกน้ำเล็กกว่าปกติ

กระทั่งเป็นระยะตัวเต็มวัยจึงมีขนาดเล็กกว่าปกติด้วย ฉะนั้นจึงควรควบคุมปริมาณลูกน้ำในภาชนะเลี้ยงให้เท่ากันระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

3) งานวิจัยนี้ได้ศึกษาปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้อายุ 5 วัน ที่ยังไม่เคยผสมพันธุ์และที่ผสมพันธุ์แล้ว พบว่ามีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ *p*-value เท่ากับ .23 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) 6,592 ± 2,136.50 และ 8,472 ± 2,445.719 ตามลำดับ แสดงว่ายุงที่เคยผสมพันธุ์แล้วมีความสามารถในการสร้างเชื้ออสุจิได้อย่างรวดเร็วและเพียงพอต่อการผสมพันธุ์กับเซลล์ไข่ได้ตลอดเวลา จึงทำให้ยุงลายบ้านเพศผู้สามารถผสมพันธุ์ได้หลายครั้งต่อวัน ดังนั้นจึงผลิตอสุจิได้ในปริมาณใกล้เคียงกันกับยุงที่ไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์มาก่อน

ส่วนยุงลายบ้านอายุ 5 วัน ที่ติดเชื้อกับไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มีค่าเฉลี่ยของปริมาณอสุจิเท่ากับ (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) 7,572.50 ± 441.88 และ 7,794.67 ± 759.90 ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันเช่นเดียวกับข้อมูลข้างต้นอย่างมีนัยสำคัญที่ *p*-value เท่ากับ .810 แสดงว่าเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ไม่มีผลกระทบต่อการสร้างอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้ที่อายุ 5 วัน ในเชิงปริมาณ ข้อมูลดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านอายุ 10 วัน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) 6,963.50 ± 2,740.23 (ติดเชื้อ) และ 5,972.00 ± 3,724.90 (ไม่ติดเชื้อ) ตามลำดับ โดยมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ *p*-value เท่ากับ .564 ผลการศึกษานับปริมาณอสุจิของงานวิจัยนี้มีค่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jones โดยกล่าวว่าปริมาณอสุจิของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* สายพันธุ์กรุงเทพฯมีค่าไม่ผันแปรตามอายุของยุง แต่ทั้งนี้ปริมาณ Spermatocyst ซึ่งเป็นส่วนที่สร้างอสุจิมีจำนวนลดลงจนกระทั่งอายุ 6 สัปดาห์และไม่มีความสัมพันธ์กันกับขนาดร่างกายและขนาดของอัณฑะยุง [27] แตกต่างจากงานวิจัยของ Ponlawat และ Harrington ซึ่งกล่าวว่าปริมาณอสุจิทั้งหมดของยุงลายมีค่าแปรผันตามอายุ จะมีปริมาณการสร้างเพิ่มขึ้นมากที่สุดที่อายุประมาณ 10 วัน ทั้งขนาดร่างกายและอายุของยุงลายมีบทบาทสำคัญต่อความสามารถผสมพันธุ์ของยุงพาหะของไวรัสไข้เหลืองและไวรัสเดงกีด้วย [40]

4) เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการฟักไข่ระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อทั้งคู่หรือ Transinfected×Transfected (46.63 ± 7.17%) กับกลุ่มควบคุมหรือ Uninfected×Uninfected (55.83 ±11.00%) ที่ *p*-value เท่ากับ .478 , คู่ระหว่างกลุ่มติดเชื้อเฉพาะยุงเพศเมียหรือ Transinfected×Uninfeted (53.00 ± 6.87%) กับกลุ่มควบคุมหรือ Uninfected×Uninfected .(55.83 ±11.00%) ที่ *p*-value เท่ากับ .544 และ คู่ระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อทั้งคู่หรือ Transinfected×Transfected (46.63 ± 7.17%) กับกลุ่มติดเชื้อเฉพาะยุงเพศเมียหรือ

Transinfected×Uninfeted (53.00 ± 6.87%) ที่ *p*-value เท่ากับ .831 พบว่าผลการเปรียบเทียบร้อยละของอัตราการฟักไข่ของทั้งสามคู่มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 ดังตารางที่ 4.24 สอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยรายงานมาแล้วของ Ruang-areerate and Kittiyapong แต่ Dobson และคณะ รายงานว่า *Aedes albopictus* ที่ติดเชื้อแบคทีเรียแบบ Superinfection มีอัตราการฟักไข่มากกว่ายุงไม่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ [14] แต่ถึงกระนั้นก็ตามจากข้อมูลผลการทดลองงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อาจไม่มีผลกระทบต่อการฟักไข่ของยุง อาจเพราะว่าเชื้อแบคทีเรียมีบทบาทในการเป็น endosymbionts ที่จำเป็นต้องพึ่งพาอาศัยในเซลล์ของโฮสต์เท่านั้นแต่ไม่มีบทบาทต่อพฤติกรรมการดำรงชีวิตของโฮสต์ดังเช่นยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* เพศเมีย ดังนั้นเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F จากเรือดจึงน่าจะมีคุณค่าและมีคุณสมบัติที่เพียงพอต่อการนำมาประยุกต์เป็นเวคเตอร์เพื่อเชื่อมยีนต่อต้านเชื้อก่อโรคที่มียุงลายเป็นพาหะดังเช่นเชื้อไวรัสเดงกีได้อย่างปลอดภัยและสามารถส่งผลให้ยีนต้านเชื้อก่อโรคมีการแสดงออกในยุงลายบ้านที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรียนี้ได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะและงานศึกษาวิจัยต่อในอนาคต

การประเมินสมรรถนะของยุงลายบ้านติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ถือเป็นสิ่งจำเป็นพื้นฐานที่ต้องศึกษา หลังจากการทดลองศึกษาความสามารถในการติดเชื้อและการถ่ายทอดเชื้อในโฮสต์ใหม่ [43] ดังเช่น *Wolbachia* สายพันธุ์ F จากเรือดเขตร้อนนี้ เพื่อสร้างความเชื่อมั่นในการนำเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในอนาคต งานวิจัยนี้ได้ทดลองความสามารถของการติดเชื้อโดยสามารถสาธิตให้เห็นตำแหน่งที่ติดเชื้อในเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ของยุงลายบ้านที่ติดเชื้อทั้งเพศเมียและเพศผู้ รวมถึงได้ทดสอบและประเมินพารามิเตอร์ที่จำเป็นต่อความสามารถในการส่งถ่ายเชื้อแบคทีเรียผ่านไปสู่รุ่นลูกหลานอย่างมีประสิทธิภาพ อันได้แก่ 1. การวัดประเมินขนาดของร่างกายโดยวัดความยาวเส้นปีก 2. การนับปริมาณเชื้ออสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้เพียงอย่างเดียว ซึ่งได้ผลที่ไม่แตกต่างกันระหว่างยุงติดเชื้อกับยุงไม่ติดเชื้ออาจเป็นเพราะอสุจิถูกสร้างแทนที่ได้อย่างรวดเร็ว แต่แบคทีเรีย *Wolbachia* อาจมีผลต่อปริมาณการสร้างซีสต์ได้ในปริมาณแตกต่างกัน หรือขนาดของซีสต์อาจแตกต่างกันได้ ฉะนั้นในอนาคตอาจจำเป็นต้องศึกษาการสร้างซิสต์ในอัณฑะของยุงเพิ่มเติมเพื่อศึกษาว่ายุงที่ติดเชื้ออาจมีการสร้างจำนวนซีสต์มากกว่าปกติ เพราะซีสต์เป็นอวัยวะที่สร้างอสุจิขึ้นใหม่และทดแทนจำนวนที่ใช้ไปในระหว่างการเข้าคู่ผสมในแต่ละครั้งได้ตลอดเวลาและรวดเร็ว จึงน่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการ

ส่งถ่ายเชื้อ *Wolbachia* ในอัตราสูงๆหรืออาจเกิด CI ได้อย่างสมบูรณ์ และ 3. การศึกษาอัตราการฟักไข่ของยุงที่ติดเชื้อแบคทีเรียเทียบกับยุงที่ไม่ติดเชื้อ แต่พารามิเตอร์ในการประเมินสมรรถนะของยุงดังกล่าวเป็นเพียงแค่บางส่วนของพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับสมรรถนะด้านการสืบพันธุ์เท่านั้น ฉะนั้น จึงควรศึกษาประเมินพารามิเตอร์ที่เกี่ยวกับการรอดชีวิตของยุงที่ติดเชื้อด้วยจึงจะถือว่าศึกษาพารามิเตอร์ทั้งหมด [46] และในการฟักไข่ของยุงลายบ้าน ควรนำแผ่นไข่มาฟักใหม่ในน้ำหลายๆครั้งเพื่อเป็นการกระตุ้นการฟักและจะทำให้ได้อัตราการฟักเพิ่มสูงขึ้น แต่ผลการทดลองดังกล่าวก็มีความน่าเชื่อถือได้ว่า เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F จากเรือดนั้นไม่สร้างผลกระทบด้านลบต่อยุงลายบ้านเพศเมียแต่อย่างใด *Wolbachia* เป็นเพียงแค่แบคทีเรียที่จำเป็นต้องอาศัยในเซลล์โฮสต์เท่านั้น ซึ่ง อาจมีผลกระทบเชิงบวกต่อโฮสต์ได้เช่นกัน

จากคุณสมบัติทั้งหมดดังกล่าวแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียนี้มีประสิทธิภาพต่อการนำไปประยุกต์เป็นเวคเตอร์นำยีนต้านโรคที่มียุงลายเป็นพาหะได้ เพื่อแทนที่ประชากรยุงที่ติดเชื้อก่อโรคในธรรมชาติได้ [11] [60] [61]

แต่ทั้งนี้และทั้งนั้นจากการศึกษาในห้องทดลองพบว่าอัตราการถ่ายทอดเชื้อแบคทีเรียไม่คงที่ ฉะนั้นควรศึกษาปริมาณสารละลายเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับฉีดยุงลายเพื่อให้มีอัตราการถ่ายเชื้ออย่างคงที่และถาวรเพื่อให้ได้เวคเตอร์ที่สามารถนำพายีนต้านเชื้อก่อโรคไปสู่รุ่นลูกได้ในอัตราคงที่ตลอดไป นอกจากนี้ควรจะศึกษาความสามารถของการติดเชื้อและประเมินสมรรถนะของเชื้อแบคทีเรียหลายๆสายพันธุ์หรือควรศึกษาผลกระทบต่อกันระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ที่สนใจต่อถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยตรงด้วย ดังเช่น ไวรัสเดงกีเพราะเชื้อแบคทีเรียอาจมีปฏิกิริยาต่อจำนวนไวรัสได้โดยตรง เพื่อเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งต่อการนำมาเป็นเวคเตอร์ที่ดีที่สุดต่อสิ่งแวดล้อมและประชากรมนุษย์บนโลก