บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

ยุง (Mosquitoes) จัดอยู่ใน kingdom *Animalia*, phylum *Arthropoda*, class *Insecta*, order *Diptera*, family *Culicidae* และ genus *Aedes* [42]

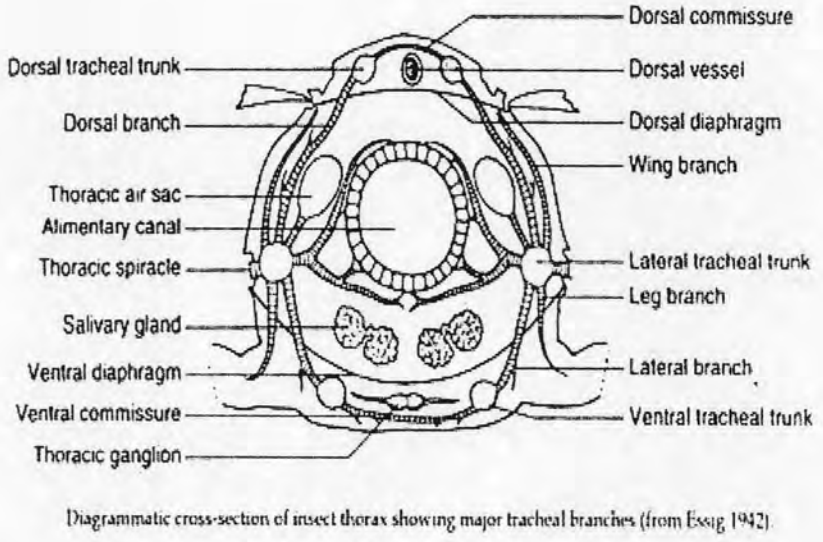
ยุงลายบ้าน *Aedes (Stegomyia) aegypti* พบได้ทั่วโลกแถบเขตร้อนและร้อนชื้น ซึ่งเป็นยุงพาหะที่สำคัญที่สุดของเชื้อไวรัสไข้เลือดออก ไข้เหลือง และซิกุนกุนยา [43]

ภาพที่ 2.1 ยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* [42]

ยุงลาย *Aedes aegypti* เป็นยุงพาหะของโรคไข้เลือดออก ชอบดูดเลือดเวลากลางวันและชอบดูดเลือดคนเพราะจะทำให้ยุงสามารถวางไข่ได้ปริมาณมากและมีชีวิตยืนยาวมากกว่ายุงที่กินทั้งเลือดและน้ำหวานไปพร้อมกัน ซึ่งยุงที่ดูดเลือดบ่อยครั้งจะมีผลต่อการแพร่กระจายของโรคที่มียุงเป็นพาหะได้มากขึ้นแบบ exponential [47] ยุงลายบ้านมักวางไข่ในภาชนะที่มีน้ำขัง ไม่ว่าจะเป็นภาชนะที่มาจากวัสดุธรรมชาติหรือจากวัสดุสังเคราะห์ เช่น กระป๋อง ถ้วย ชาม แทงค์น้ำ ยาง รถทิ้ง และโพรงต้นไม้ [34]

รูปร่างลักษณะ (Morphology)

รูปร่างลักษณะของแมลงและสัตว์ขาข้อที่แตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่ชัดเจนคือ สัตว์พวกนี้ไม่มีกระดูกแต่มีเปลือกหุ้มที่แข็ง (Exoskeleton) หุ้มอยู่ ลำตัวและระยางค์ (appendages) ของสัตว์กลุ่มนี้มีลักษณะเป็นข้อปล้อง และเมื่อดูจากภายนอก ลำตัวสามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ หัว อก และท้อง โดยที่ส่วนหัวและอกจะมีระยางค์ยื่นออกมา ส่วนท้องเป็นส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์ไม่มีระยางค์ยื่นออกมา ภายในตัวแมลงนั้นประกอบด้วยระบบทางเดินอาหาร (Digestive System) อยู่ระหว่างระบบประสาท (Nervous System) ซึ่งอยู่ด้านล่างของลำตัวและ ระบบหายใจ (Respiratory System) ซึ่งอยู่ด้านบนของลำตัว ส่วนระบบเลือดนั้นเป็นระบบเปิด (Opened Circulatory System) คือเลือดหมุนเวียนไปทั่วร่างกายโดยไม่ต้องอยู่ในเส้นเลือด (ภาพที่ 2.2) [51]



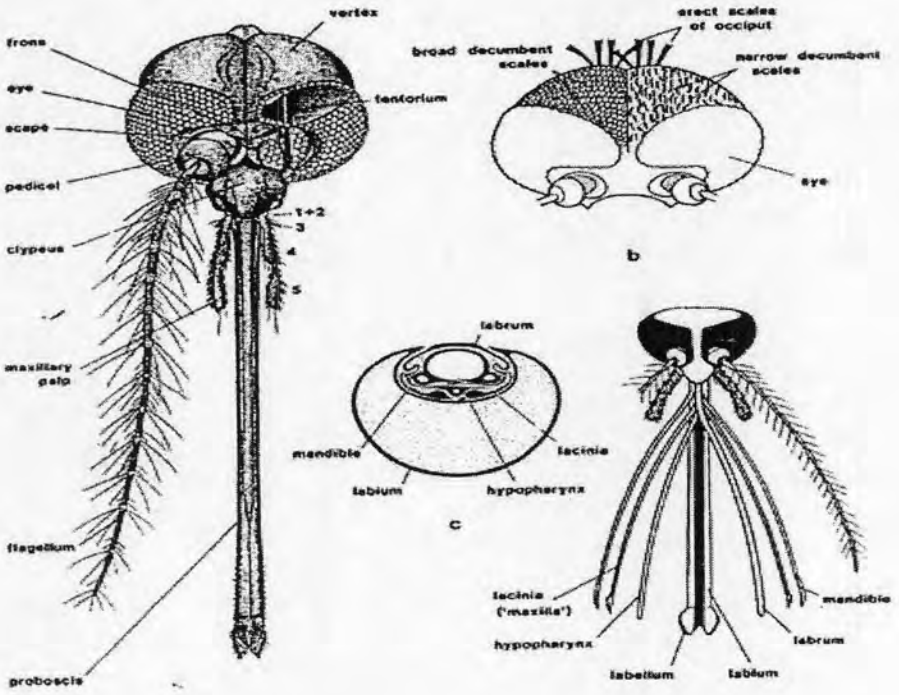
Diagrammatic cross-section of insect thorax showing major tracheal branches (from Essig 1942).

ภาพที่ 2.2 แสดงอวัยวะภายในของแมลง [51]

ส่วนหัว (Head)

หัวของแมลงประกอบด้วยอวัยวะที่สำคัญคือ ตารวมหรือตาประกอบ (Compound eyes) 1 คู่ ตาเดี่ยว (Simple eyes หรือ Ocelli) หนวด (antennae) 1 คู่อยู่นอกสุด หนวดแต่ละเส้นประกอบด้วย ปล้องประมาณ 14-15 ปล้อง และปาก ตาและหนวดของแมลงเป็นอวัยวะที่ใช้ในการรับความรู้สึก (sensory organs) ซึ่งลักษณะของหนวดของยุงสามารถใช้ในการจำแนกเพศด้วย ส่วนปากแมลงใช้ในการกินอาหาร ประกอบด้วยอวัยวะที่สำคัญคือ ริมฝีปากบน (labrum, upper

lip) ริมฝีปากล่าง (labium, lower lip) ถ้าผ่าตามขวางจะเห็นอวัยวะลักษณะคล้ายเข็มรวมกันอยู่ เรียกว่า "fascicle" ฟัน (maxilla) กราม (mandible) ใช้สำหรับตัดผิวหนัง ข้างๆท่อดูดเลือดจะมี labrum-epipharynx หุ้มรอบๆ และอวัยวะที่ทำหน้าที่เหมือนลิ้น (hypopharynx) ยุงซึ่งดูดกินอาหารเหลวและเลือดเป็นอาหารดังนั้นปากของมันจึงมีลักษณะเหมือนท่อยาว ภายในมีส่วนที่ใช้ตัดชั้นผิวหนังและ hypopharynx ทำหน้าที่เหมือนปั๊มน้ำช่วยดูดอาหารเข้าไป ซึ่งลักษณะปากดังกล่าวเรียกว่า piercing-suckling mouthparts (ภาพที่ 2.3) ยื่นออกไปข้างหน้าชัดเจน ประกอบด้วย proboscis ตั้งตรงและแข็งแรง



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของปากยุงที่ใช้ในการดูดกินเลือด [51]

ส่วนนอก (Thorax)

อกของแมลงเป็นส่วนที่มีระยางค์ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของแมลงได้แก่ขาและปีกของแมลงยื่นออกมา อกของแมลงแบ่งออกเป็น 3 ปล้องคือ ปล้องอกส่วนต้น (Prothorax) ปล้องอกส่วนกลาง (Mesothorax) ทางด้านล่างของส่วนนี้จะมีส่วนที่เรียกว่า scutellum ซึ่งออกกันอย่างชัดเจนโดย transverse suture ปีกจะงอกออกจากส่วนของ mesonotum และปล้องอกส่วนปลาย (Metathorax) อกแต่ละปล้องจะมีขายื่นออกมา 1 คู่ทางด้านข้าง ส่วนปีกของแมลงจะยื่นออกมา

จากปล้องอกส่วนกลางและปล้องอกส่วนปลาย นอกจากนี้ที่ด้านข้างของอกแต่ละปล้องจะมีรูหายใจ (spiracle) อยู่ 1 คู่ ยุงจะมีขาแบบที่เรียกว่า walking legs ที่เดินตามแนวราบ ส่วนปีกมีลักษณะบางใส 1 คู่ โดยที่ปีกคู่หลังดัดแปลงไปเป็นอวัยวะที่ใช้ในการทรงตัว มีเกล็ด (scales) บนลำตัวและปีก จะมีสีสลับกันทำให้เห็นเป็นลาย ช่วยในการแยกชนิดของยุง

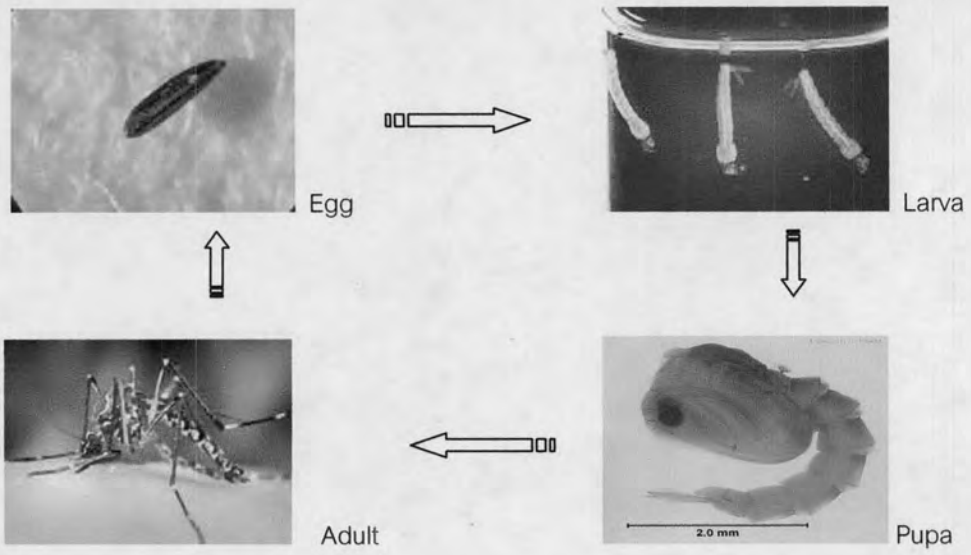
ส่วนท้อง (Abdomen)

ส่วนท้องของแมลงแบ่งเป็นปล้องโดยจะมีอยู่ 11 ปล้องซึ่งเห็นชัดเจนเพียง 8 ปล้องเนื่อง 3 ปล้องท้ายเปลี่ยนแปลงเป็นอวัยวะเพศ แต่ละปล้องจะมีรูหายใจอยู่ 1 คู่ ส่วนท้องของแมลงไม่มีระยางค์ยื่นออกมา แต่ส่วนปลายของท้องดัดแปลงไปเป็นอวัยวะที่ใช้ในการสืบพันธุ์ ซึ่งอวัยวะสืบพันธุ์ของแมลงตัวผู้เรียกว่า aedeagus ส่วนอวัยวะสืบพันธุ์ของแมลงตัวเมียเรียกว่า ovipositor ท้องของแมลงอาจแบ่งออกเป็น 3 ส่วนโดยอาศัยตำแหน่งของอวัยวะสืบพันธุ์คือ pregenital อยู่ระหว่างปล้องท้องที่ 1-7 genital อยู่ระหว่างปล้องท้องที่ 8-9 และ postgenital อยู่ระหว่างปล้องท้องที่ 10-11

การแยกเพศยุง โดยอาศัยลักษณะของเส้นขนบนหนวด และความยาวของ palpi ดังนี้ ยุงเพศผู้หนวดมีขนหนาและยาว (Pulmose hair) ส่วน palpi ยาวกว่า proboscis ในยุงเพศเมียหนวดมีขนบางและสั้น (pilose hair) และ palpi ขนาดความยาวขึ้นอยู่กับ species [51]

การเจริญและการพัฒนา (Growth and Development)

การเจริญและการพัฒนาของยุงนั้น มีการขยายขนาดด้วยการลอกคราบ (molting) แล้วยังมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นระยะๆ (metamorphosis) อีกด้วย เนื่องจากลำตัวของยุงปกคลุมด้วยผนังแข็งที่เรียกว่า exoskeleton ดังนั้นเมื่อแมลงต้องการขยายขนาดมันจึงต้องลอกคราบเพื่อเอา exoskeleton เดิมออกไปก่อน การลอกคราบนั้นถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมน ecdysone ที่หลั่งออกมาจาก ecdysial glands นอกจากการลอกคราบแล้วแมลงยังมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นระยะๆซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง Complete metamorphosis (Holometabolus) คือการเจริญเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงซึ่งประกอบด้วยระยะต่างๆ 4 ระยะได้แก่ ไข่ ลูกน้ำ ตัวโม่ง และตัวเต็มวัย โดยแต่ละระยะมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน (ภาพที่ 2.4) ดังนี้



ภาพที่ 2.4 วัฏจักรชีวิตของ *Aedes aegypti* (Complete metamorphosis) [42] [23]

ไข่ (Egg)

ยุงตัวเมียหลังจากดูดเลือดและผสมพันธุ์แล้วจะวางไข่ ซึ่งจะวางไข่แบบเดี่ยวๆ ตามบริเวณที่ชื้นๆ เช่น โพรงไม้ ต้นไม้ [34] หรือบนผิวน้ำนิ่งๆสะอาด ในภาชนะน้ำขังหรือกักเก็บน้ำไว้ใช้ตามบ้านเรือนหรือในเมือง (Urban area) ไข่นั้นจะฟักตัวออกมาเป็นลูกน้ำ เมื่อมีสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้เวลาเจริญกลายเป็น larva ภายในเวลา 2-3 วัน

ลูกน้ำ (Larva)

สามารถฟักตัวออกจากเปลือกไข่ได้อย่างรวดเร็วในน้ำ กินอาหารโดยปากที่พัฒนาเป็นอวัยวะที่ใช้เก็บและกรองอาหารจากน้ำ [34] จะมีท่อสำหรับหายใจ (siphon) สำหรับเหงือกที่ปล้องสุดท้ายทางด้านล่าง (anal gill) นั้น ทำหน้าที่ควบคุม osmotic pressure มากกว่าเป็นอวัยวะหายใจ ลูกน้ำยุงมี 4 ระยะจากการลอกคราบ 4 ครั้ง ในการลอกคราบแต่ละครั้งจะขยายขนาดโตขึ้น เมื่อถึงระยะที่ 4 (fourth stage larva) ก็จะลอกคราบเป็นตัวดักแด้ เรียกว่า Pupa [6]

ดักแด้หรือตัวโม่ง (Pupa)

ตัวอ่อนของยุงในระยะนี้จะมีความคล้ายคลึงกันในแต่ละ Genus ที่ส่วน cephalothoraxes มีท่อหายใจอยู่ 1 คู่ ท่อหายใจนี้ทำหน้าที่อย่างเดียวกันกับ siphon ของลูกน้ำ ระยะนี้ไม่กินอาหาร จะลอยนิ่งอยู่ที่ผิวน้ำ ระยะนี้กินเวลา 2-3 วัน

ตัวเต็มวัย (Adult)

ใช้เวลา 2 วันเปลี่ยนจากระยะดักแด้เป็นตัวเต็มวัย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ อาหารและความชื้น อาหารที่จำเป็นของยุงทั้งสองเพศคือ น้ำหวาน ยุงที่อาศัยในเขตร้อนส่วนใหญ่ต้องการน้ำหวานจากดอกไม้ โดยทั่วไปยุงตัวผู้มีอายุน้อยกว่า ประมาณ 6-7 วัน แต่ถ้าอุณหภูมิ ความชื้นและอาหารที่เหมาะสม จะมีชีวิตอยู่ได้ 1 เดือน ยุงลายบ้านมักออกหากินในเวลากลางวัน [51]

2. การควบคุมแมลงพาหะ (Vector Control)

หลักการการควบคุมแมลงพาหะ

แมลงพาหะยังคงสร้างปัญหาให้แก่มนุษย์ไม่ว่าจะเป็นด้านสาธารณสุข ปศุสัตว์และการเกษตร จากปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าวเมื่อมีการค้นพบว่าแมลงเป็นพาหะนำเชื้อโรคมาสู่คนและสัตว์ในช่วงปลายศตวรรษที่ 18 ทำให้ต้องพัฒนาคิดค้นวิธีการต่างๆเพื่อให้ได้มาซึ่งวิธีการป้องกันและควบคุมความเสียหาย เพื่อลดการถ่ายทอดของโรค ที่อาจเกิดขึ้นจากแมลงพาหะเหล่านี้ ต่อความเป็นอยู่และการดำเนินชีวิต รวมถึงเศรษฐสังคม วิธีการควบคุมรวมถึงการลดปริมาณแมลงพาหะ เช่น การควบคุมสิ่งแวดล้อม (Environmental control) การใช้สารเคมีกำจัดแมลง (Chemical control) การใช้ชีววิธี (Biological control) [50] เพื่อทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ของแมลงและการลดการสัมผัสกับแมลง เหล่านี้เป็นวิธีที่มีทั้งผลดีและผลเสียและมีข้อจำกัดต่อการนำมาประยุกต์ใช้

ปี ค.ศ.	การพัฒนา	หมายเหตุ
1870-1910	ความรู้เรื่องความสัมพันธ์ระหว่างแมลงพาหะและเชื้อซึ่งเป็นสาเหตุของโรค	โรคเท้าช้าง มาลาเรีย ไข้เลือดออก ไข้เหลือง เป็นต้น
1870-1910	วิธีการควบคุมแมลงพาหะ รวมถึงวิธีการป้องกันแมลงกัด	การใช้สารกำจัดแมลงจากธรรมชาติ การใช้มุ้ง มุ้งลวด สารไล่แมลง การทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ของแมลงพาหะ
1930s	สังเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงชนิดแรก	DDT
1940-1960	สังเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มใหม่	Organophosphates Carbamates Synthetic pyrethroids
1960s	กับดักแมลง	เหลือบ แมลงวัน tsetse
1960s	การปล่อยแมลงตัวผู้เพื่อควบคุมปริมาณแมลง	Screwworm
1960s	สารควบคุมการเจริญของแมลง	Methoprene, Juvenile hormone (JH) mimics
1960-ปัจจุบัน	การควบคุมแมลงพาหะโดยวิธีผสมผสาน (Integrated vector management programs)	
1980s	การใช้บัคเตรีในการควบคุมแมลงพาหะ	*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) *Bacillus sphaericus* (*Bs*)
1990s	งานวิจัยทางอณูชีววิทยาและการดัดแปลงพันธุกรรมของแมลงพาหะ	ยุงลาย ยุงก้นปล่อง

ตารางที่ 2.1 พัฒนาการของการควบคุมแมลงพาหะที่สำคัญ

การควบคุมแมลงพาหะต้องคำนึงถึงหลักดังนี้

1. เพื่อลดการถ่ายทอดของโรคหรือลดความเสียหายที่เกิดจากแมลงมิใช่เป็นการกำจัดแมลงให้หมดไป

2. วิธีการที่นำมาใช้จะต้องคำนึงถึงความเหมาะสมกับสถานการณ์ ความคุ้มทุนและต้องคำนึงถึงผลกระทบต่อคนในชุมชน การยอมรับของคนในชุมชนและผลกระทบสภาพแวดล้อมเป็นหลัก

การควบคุมแมลงพาหะสามารถแบ่งเป็น 2 แบบคือ

1. **การควบคุมโดยธรรมชาติ** (Natural Control)

เป็นการปล่อยให้ธรรมชาติเป็นตัวควบคุมแมลงพาหะโดยมนุษย์ไม่มีส่วนเกี่ยวข้อง

2. **การควบคุมแมลงโดยมนุษย์เป็นผู้จัดการ** (applied control)

เช่นการนำสิ่งมีชีวิตอื่นมาควบคุมแมลง (Biological control) การปรับสภาพแวดล้อมเพื่อทำให้ไม่เหมาะสมกับการเจริญของแมลง (environmental control) [59] หรือการใช้สารเคมีมาควบคุมแมลง (chemical control) เป็นต้น

2.1 Biological Control

เป็นการใช้สิ่งมีชีวิตอื่นมาควบคุมจำนวนแมลง เช่น

- เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) [58] เชื้อ *Bacillus sphericus* (*Bs*) มาควบคุมแมลง เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้เป็นเชื้อที่สร้าง spore และในขณะที่มันสร้าง spore มันจะสร้าง Crystal protein (Cry toxin) ซึ่งมีพิษต่อแมลงขึ้นมา เมื่อแมลงกินแบคทีเรียเหล่านี้เข้าไปมันก็จะได้รับพิษและตาย แต่ Cry toxin นี้ไม่มีผลต่อคนและสัตว์อื่น
- การใช้สิ่งมีชีวิตที่กินแมลงเช่น ปลาหางนกยูง (รูปที่ 2.5) ลูกน้ำของยุงยักษ์และไรน้ำ (copepod) มากินลูกน้ำยุง

ภาพที่ 2.5 ลูกน้ำของยุงยักษ์นำมาใช้ควบคุมลูกน้ำยุง [36]

- การใช้หนอนพยาธิบางชนิดเช่น *Romanomermis culicivorax* ซึ่งเป็นหนอนพยาธิในลูกน้ำยุงซึ่งระยะตัวอ่อนเจริญอยู่ในลูกน้ำยุงและเมื่อมันเจริญเต็มที่แล้วมันจะไชออกจากลูกน้ำทำให้ลูกน้ำตาย

การควบคุมโดยชีววิธีนี้มีข้อดีคือมีความจำเพาะต่อแมลงเป้าหมายที่ต้องการควบคุมไม่ทำลายแมลงที่มีประโยชน์หรือสัตว์ชนิดอื่นๆในระบบนิเวศน์และมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยมาก แต่ข้อจำกัดของวิธีการนี้คือ เห็นผลช้าและต้องทำอย่างต่อเนื่องจึงจะได้ผลดี ต้องมีภาวะที่เหมาะสมต่อต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ เช่น ความสะอาดของน้ำ ระดับความเป็นกรด-ด่าง วิธีการนี้จึงจะใช้ได้ผลสำเร็จ [50]

2.2 Environmental Control

เป็นการจัดการสภาพแวดล้อมเพื่อทำให้แมลงไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ เช่น การจัดระบบระบายน้ำไม่ให้มีน้ำขัง การทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ยุงในบ้านเช่น การเปลี่ยนน้ำแจกัน ตุ่มน้ำบ่อยๆ การเก็บทำลายแหล่งเพาะนอกบ้านเช่น ยางรถยนต์ที่ไม่ใช้แล้ว กระป๋องใส่อาหาร ขวดน้ำ รวมทั้งการปิดภาชนะเก็บกักน้ำให้มิดชิดเป็นต้น วิธีการนี้ต้องอาศัยความร่วมมือของคนในชุมชน ซึ่งต้องมีความรู้และให้ความสำคัญต่อวิธีการนี้จึงจะประสบผลสำเร็จได้ [58]

2.3 Physical and Mechanical Control

เป็นการควบคุมแมลงโดยใช้เครื่องมือกลหรือแสงหรืออุปกรณ์อีเล็กโทรนิกส์ต่างๆ มาใช้ในการควบคุมแมลงเช่น ใช้แสงสว่างมาล่อให้แมลงเข้ามาใกล้เส้นลวดซึ่งมีกระแสไฟฟ้าเมื่อแมลงบินมาใกล้จะถูกไฟดูดตาย หรือการใช้อุปกรณ์ที่มีเครื่องปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และความร้อนเพื่อล่อให้แมลงบินเข้ามาใกล้แล้วมีพัดลมดูดให้แมลงเข้าไปอยู่ในถุงจากนั้นจึงนำแมลงไปทำลายเป็นต้น

2.4 Chemical control

เป็นการใช้สารเคมีมาควบคุมแมลงซึ่งสารเคมีที่นำมาใช้สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆคือ

*2.4.1 **สารอนินทรีย์** (Inorganic insecticides)*

เช่นสารหนู Zinc phosphate เป็นต้น ปัจจุบันมีการใช้สารกลุ่มนี้น้อยลงเนื่องจากความเป็นพิษของสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อระบบหายใจและผิวหนัง [58]

*2.4.2 **สารอินทรีย์** (Organic insecticides)*

*เป็น*สารกำจัดแมลงที่เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีทั้งที่เป็นสารสกัดจากธรรมชาติและที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้นมา สารกลุ่มนี้สามารถแบ่งเป็น 4 ชนิดคือ Organochlorine, Organophosphates, Carbamates, Pyrethroids (รูปที่ 6) รวมถึงสารสกัดจากใบสะเดา ยูคาลิปตัส และสารกลุ่มอื่นๆ เช่นฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโตของแมลง (insect growth regulators; IGRs) เช่น juvenile hormone [45]

ข้อจำกัดของวิธีการนี้คือ การดื้อยาฆ่าแมลง ซึ่งองค์การอนามัยโลกได้ประมาณจำนวนแมลงที่ดื้อต่อยาฆ่าแมลงกว่า 125 ชนิดและดื้อต่อยามากกว่า 1 ชิด จึงยากต่อการควบคุม การใช้สารเคมีในการกำจัดแมลงรวมถึงการใช้สารฆ่าแมลงต่างๆ (Insecticides) ถึงจะสามารถกำจัดแมลงได้อย่างรวดเร็วแต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือสารเคมีเหล่านี้ไม่มีความจำเพาะซึ่งจะทำลายแมลงในธรรมชาติที่มีคุณประโยชน์ระบบนิเวศด้วย นอกจากนี้ยังมีผลเสียโดยตรงต่อผู้ใช้และผลเสียระยะยาวคือสารเคมีตกค้างในธรรมชาติเป็นปัจจัยต่อการเกิดการดื้อยาของแมลง [58]

ภาพที่ 2.6 ดอก pyrethrum [39]

2.5 Genetic control

เป็นการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของแมลง ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 2 แบบคือ

2.5.1 Sterile release

เป็นการทำให้แมลงเป็นหมันแล้วปล่อยแมลงที่เป็นหมันนี้ไปแย่งผสมพันธุ์กับแมลงในธรรมชาติ วิธีการนี้เหมาะที่จะใช้กับแมลงที่ผสมพันธุ์ครั้งเดียว เช่นยุงตัวเมียจะผสมพันธุ์เพียงครั้งเดียวตลอดชีวิตของมัน วิธีการนี้มีข้อจำกัดคือพื้นที่ๆจะใช้วิธีนี้ต้องเป็นพื้นที่ๆแยกจากพื้นที่อื่นอย่างชัดเจน เช่นเกาะหรือที่ๆมีภูเขาล้อมรอบเพื่อป้องกันแมลงจากแหล่งอื่นบินเข้ามา วิธีนี้ต้องปล่อยแมลงที่เป็นหมันเป็นระยะๆเพื่อลดจำนวนแมลงไปเรื่อยๆดังนั้นจะต้องมีโรงงานที่สามารถผลิตแมลงเป็นหมันได้มากพอซึ่งต้องใช้ทุนสูงและต้องการบุคลากรที่เชี่ยวชาญเพื่อประเมินสถานการณ์เป็นระยะๆ [5]

2.5.2 Genetic manipulation of vector

เนื่องจากปัญหาและอุปสรรคของวิธีการควบคุมแมลงดังกล่าวข้างต้น จึงได้มีการคิดค้นวิธีการใหม่ๆเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในกาควบคุมโรคที่นำโดยแมลง โดยได้นำความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์และทางด้านชีวโมเลกุลของแมลงมาพัฒนาวิธีการสร้างแมลงแปลงพันธุ์ (Transgenic insects) เป็นการดัดแปลงพันธุกรรมของแมลงให้แมลงมีความต้านทานต่อเชื้อโรค ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญในตัวแมลงได้ดังนั้นจึงลดความเป็นพาหะของแมลงลง เมื่อสร้างแมลงสายพันธุ์ใหม่ที่มีต้านทานต่อเชื้อโรคนี้ขึ้นมาแล้วปล่อยสู่ธรรมชาติเพื่อกระจายลักษณะทางพันธุกรรมดังกล่าวจะช่วยลดการกระจายของโรคลงได้ [5] เพื่อเป็นอีกแนวทางในการควบคุมเชื้อก่อโรคจากแมลง

Rubin and Spradling ได้ทดลองแปลงพันธุ์แมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) สำเร็จด้วยวิธีการ microinjection โดยการฉีดสารละลายดีเอ็นเอเข้าไปในตัวอ่อนของแมลงหวี่ที่กำลังมีการแบ่งตัว สารละลายดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นสารละลายเวคเตอร์ ณ ที่นี้คือ P element เวคเตอร์นี้อยู่ในกลุ่ม transposable element และได้ใช้ยีน *rosy*$^{+}$ ซึ่งเป็นยีนสร้างเอนไซม์ xanthine dehydrogenase (XDH) เป็น marker gene แล้วตรวจสอบพบว่าแมลงหวี่ที่ได้รับการถ่ายทอดยีน *rosy*$^{+}$ จะมีสีตาปกติ ส่วนแมลงหวี่ที่ไม่ได้รับการฉีดเวคเตอร์ที่ประกอบกับยีน *rosy*$^{+}$ และไม่มีการถ่ายทอดยีน *rosy*$^{+}$ ซึ่งไม่มี XDH ทำให้ตามีสีขาวเพราะไม่มีเอ็นไซม์สร้างสีตา ยีนนี้สามารถถ่ายทอดไปยังแมลงหวี่รุ่นลูกได้ [44]

หลังจากนั้นได้ทดลองสร้างยุงแปลงพันธุ์โดยใช้เวคเตอร์ P element ได้สำเร็จแต่มีการถ่ายทอดยีนในอัตราต่ำ [33] จึงได้มีการหา Transposable element ชนิดอื่นนอกเหนือจาก P element ได้แก่ *Minos* (ได้จากแมลงหวี่ชนิด *Drosophila hydeii*) *Mariner* (ได้จากแมลงหวี่ *Drophila mauritiana*) *piggyBac* (ได้จากผีเสื้อ *Trichoplusia ni*) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่โครโมโซมได้ดีกว่า P element และ*Hermes* (ได้จากแมลงวันบ้าน *Musca domestica*) เป็นยีน marker ที่สร้างเอ็นไซม์สร้างตาสีแดง (*cinnabar* eye color) เช่นเดียวกับ *Mariner* element ที่ทดลองกับยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* สายพันธุ์ตาสีขาว (kh^{w}) ให้สามารถสร้างตาสีแดงได้ [26] นอกจากการใช้ *Hermes* แล้ว ยังสามารถใช้ *Minos* ประกอบกับยีน สร้างสารเรืองแสงสีเขียว (Enhanced Green Fluorescent Protein) หรือ EGFP แล้วทำ microinjection ในยุงก้นปล่อง (*Anopheles stephensi*) พบว่ายุงสามารถเรืองแสงสีเขียวได้และสามารถถ่ายทอดยีน EGFP ไปยังรุ่นลูกหลานได้ ข้อจำกัดของวิธีการแปลงพันธุ์แมลงคือ การถ่ายทอดยีนเป้าหมายไปสู่รุ่นต่อๆไป มีอัตราต่ำประมาณ 3-10 % [8] อาจทำให้ควบคุมการแพร่กระจายเชื้อก่อโรคจากแมลงพาหะได้ในอัตราต่ำไปด้วยจึงสมควรที่จะต้องศึกษาและพัฒนา

วิธีการที่สามารถแพร่กระจายและส่งถ่ายยีนเป้าหมายให้มีเปอร์เซ็นต์สูงๆ จึงน่าจะสามารถควบคุมเชื้อก่อโรคจากแมลงพาหะได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.6 Integrated control

เนื่องจากการควบคุมแมลงแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน วิธีนี้เป็นการนำหลายๆวิธีมาประกอบกันเพื่อใช้ในการควบคุมโรค ซึ่งการเลือกแต่ละวิธีในการควบคุมแมลงจะต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายประการ เช่น สถานการณ์ของโรคในขณะนั้น ข้อดีข้อเสีย เงินทุน การยอมรับของคนในชุมชน เป็นต้น ตัวอย่างเช่นการควบคุมยุงลายซึ่งเป็นยุงที่อาศัยในบ้าน การนำสารกำจัดแมลงไปฉีดพ่นในบ้านอาจเกิดผลเสียต่อผู้อาศัยอยู่และอาจไม่ได้รับความร่วมมือท่าที่ควร การให้ความรู้แก่คนในชุมชนและการทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลายจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามหากเกิดการระบาดของโรคขึ้น การทำลายแหล่งเพาะพันธ์ยุงซึ่งเป็นการกำจัดลูกน้ำยุงจึงไม่ทันการณ์ ดังนั้นอาจจำเป็นต้องเลือกใช้การกำจัดยุงพาหะโดยการฉีดพ่นสารกำจัดแมลงแทนเป็นต้น

ในปัจจุบันโรคที่มีแมลงเป็นพาหะของเชื้อก่อโรคควบคุมได้ยากอันเนื่องมาจากยังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญคือ ไข้เลือดออก ในแต่ละปีมีผู้ป่วยและเสียชีวิตจากโรคนี้หลายล้านคน โดยเฉพาะในประเทศเขตร้อนซึ่งแมลงพาหะสามารถเจริญได้ดี ถึงแม้ว่าจะมีการพัฒนาวิธีการต่างในการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคไปมากแต่ยังไม่สามารถควบคุมโรคเหล่านี้ได้ ปัญหาในการควบคุมโรคที่มีแมลงเป็นพาหะนั้นมีอยู่หลายประการได้แก่

- ยังไม่มียารักษาที่จำเพาะ การรักษาจึงเป็นการรักษาตามอาการของผู้ป่วย ดังนั้นเมื่อผู้ป่วยถูกยุงกัดเชื้อจึงถ่ายทอดไปสู่ยุงและยุงนั้นก็จะเป็นพาหะนำโรคต่อไป

- ปัญหาการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรค ปัญหาของการพัฒนาวัคซีนมีสาเหตุหลักอยู่ 2 ประการได้แก่ (1) มีการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนเป้าหมาย (Target antigen changes) เชื้อหลายชนิดมีลักษณะพิเศษคือมีรูปแบบของแอนติเจนหลายรูปแบบ (Antigenic polymorphism or antigenic variations) ทำให้เกิดปัญหาในการพัฒนาวัคซีนที่จะต้องครอบคลุมทุกรูปแบบของแอนติเจนที่เชื้อสร้างขึ้นมา (2) วัคซีนที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้เพราะขาดประสิทธิภาพ [9] [50]

-การเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมและ-ปัญหาทางสังคมและเศรษฐกิจ [15]

จากปัญหาและอุปสรรคดังกล่าวจะเห็นว่าการควบคุมโรคที่มีแมลงเป็นพาหะโดยวิธีการต่างๆนั้นยังต้องการเวลาในการพัฒนาอีกระยะหนึ่ง ดังนั้นการควบคุมโรคเหล่านี้น่าจะเน้นที่การควบคุมปริมาณแมลงพาหะ เนื่องจากโรคสามารถจะถ่ายทอดต่อไปได้ต้องอาศัยแมลงพาหะที่จำเพาะเท่านั้น หากเราสามารถควบคุมปริมาณแมลงพาหะได้ก็จะเป็นการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคไปด้วย

3. เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* spp.

เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* (Class Alphaproteobacteria, Order Ricketsiales) เป็นแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยการอาศัยในเซลล์โฮสที่เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและถ่ายทอดเชื้อสู่ลูกหลานผ่านทางแม่เท่านั้น เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ถูกแบ่งตามสายวิวัฒนาการจากด้วยยีน *ftsZ* prtein-coding gene ออกเป็น 8 supergruop(A-H) และแบ่งตามสายวิวัฒนาการจากด้วยยีน*16s rRNA* ออกเป็น 6 supergroup (A-F) ดังนี้ supergroup A (Hymenoptera; wasp, bees and ants) และ B (Lepidoptera; butterflies and moths) พบในแมลงสัตว์ขาข้อเท่านั้นประกอบด้วย insects, crustacean isopods และ mites ทั้งสอง supergroup อยู่ในโฮสเดียวและสามารถถ่ายทอดเชื้อได้ในแนวราบ (horizontal transfer) [46] [54] [55] [56] ส่วน supergroup C และ D ในหนอนพยาธิตัวกลมกลุ่ม filarial ใน supergroup E พบใน collembolan, primitive insect และ Folsomia candida (springtail) ใน supergroup G พบใน แมงมุม (spider) ส่วนใน supergruop H พบใน ปลวก(termites) และใน supergroup F พบใน แมลงสัตว์ขาข้อ (Arthropod) และตัวเรือด (bed bug) มาหลายทศตวรรษ สามารถพบเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* นี้ได้หลายอวัยวะเช่น อวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) อวัยวะสร้างสเปริร์ม (spermalege ; organ of Berlese), ลำไส้ (gut), ท่อลม (malphigian tubule) และ ระบบเลือด (hemolymph) ซึ่งคำว่า supergroup ถูกกำหนดให้ใช้เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้สับสนกับแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการที่อาศัยยีน *wsp* ในการแบ่งกลุ่ม [63] ซึ่งหลักฐานการพบครั้งในแมลง parasitic wrasp แต่ในทางกลับกัน *Wolbachia* supergroup C และ D สามารถอาศัยในโฮสได้และไม่เกิดปรากฏการณ์ CI กับโฮสซึ่งเป็นกลุ่ม Nematodes โดยยืนยันด้วยการศึกษาลำดับเบส [35] *Wolbachia* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยในเซลล์ของแมลงสัตว์ขาข้อ ประมาณ 16-22% ของแมลงที่ได้มีการสำรวจในประเทศปานามา อังกฤษ และอเมริกาเหนือ (19.3%) โดยมีความเกี่ยวข้องและใกล้ชิดกับเชื้อแบคทีเรีย *Rickettsia* โดยอาศัยส่วนใหญ่เฉพาะบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ของแมลง

แล้วถ่ายทอดเชื้อผ่านทางไซโตพลาสซึมของไข่ซึ่งก่อให้เกิดความผิดปกติในระหว่างการสืบพันธุ์ของแมลงได้หลายประการ กล่าวคือ เกิดความไม่เข้ากันของไซโตพลาสซึม (CI) การเกิดลูกเพศเมียโดยไม่ต้องปฏิสนธิ (Pathenogenesis) และการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะเพศผู้เป็นอวัยวะเพศเมีย (ferminization) การกำจัดแมลงเพศผู้ (male killing) และอาจเป็นกลไกในการแยก species ในแมลงสัตว์ขาข้อได้ [55] เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถสร้างผลกระทบต่อแมลงสัตว์ขาข้อ โดยการดัดแปลงระบบการขยายพันธุ์ (host reproductive alteration) และอาจมีผลต่อการเพิ่มหรือลดสมรรถนะของโฮสที่ให้อาศัยด้วยปรากฏการณ์ที่สำคัญคือ ความไม่เข้ากันของไซโตพลาสซึม (CI) จึงทำให้สามารถแพร่เชื้อได้โดยไม่ทราบกลไกที่แท้จริง แต่ที่การสมมติฐานถึงระบบการถ่ายทอดเชื้อว่ามีสองระบบคือ ระบบการดัดแปลงสเปิร์มในเพศผู้ที่เรียกว่า modification (*mod*) เมื่อมีการปฏิสนธิทำให้เกิดความผิดปกติในของ embryo อีกระบบหนึ่งคือ ระบบ rescue (*resc*) ช่วยให้สเปิร์มไม่ถูกดัดแปลงและสามารถปฏิสนธิได้ embryo ที่มีกระบวนการแบ่งนิวเคลียสที่ปกติและแพร่เชื้อสู่ประชากรโฮสใหม่ได้ [12] [46] ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำแบคทีเรีย *Wolbachia* มาดัดแปลงลักษณะทางพันธุ์กรรมเพื่อขับเคลื่อนยีนยับยั้งการระบาดของเชื้อก่อโรคในแมลงพาหะ [43]

4. การดัดแปลงพันธุกรรมของแมลงด้วยแบคทีเรีย *Wolbachia*

Hoffmann พบว่าแมลงหวี่ที่พบในทวีปอเมริกาเหนือ ทวีปยุโรปและทวีปแอฟริกาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* อัตราการฟักไข่ลดลง เมื่อผสมพันธุ์กันระหว่างเพศเมียติดเชื้อกับเพศผู้ปลอดเชื้อ แต่มีบางสายพันธุ์ที่จับจากนอกห้องทดลองใน California อัตราการตายจาก CI ต่ำกว่าผลการทดลองในห้องปฏิบัติการอาจเนื่องมาจาก แมลงหวี่ที่จับจากนอกห้องทดลองสร้างลูกได้ทั้งตัวที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ แต่แมลงหวี่ในห้องทดลองสร้างลูกที่ติดเชื้อแบบเดียวเท่านั้น

จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปว่ามีหลายปัจจัยที่ก่อให้เกิดแตกต่างกันดังนี้

ก. การเกิด CI อาจไม่แสดงออกภายใต้สภาวะแวดล้อมในธรรมชาติ

ข.ยาฆ่าแมลง สารปฏิชีวนะและอุณหภูมิเป็นปัจจัยต่อการรักษาการติดเชื้อ

ค. มีการทำลายผลกระทบจากปรากฏการณ์ CI ต่ออัตราการรอดชีวิต (Viability) และการวางไข่ (Fecundity)

ง. อาจเนื่องมาจากการแข่งขันของอสุจิและใช้เวลาในการผสมพันธุ์เร็วเกินไป

จ. เกิดปฏิกิริยาระหว่างยีนจากนิวเคลียสต่อเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และการเปรียบเทียบสมรรถนะพบว่าพารามิเตอร์หนึ่งคือ การฟักไข่ได้รับผลกระทบมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพารามิเตอร์อื่น [22]

Braig และคณะ ประสบผลสำเร็จในการส่งถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จากยุงลายสวน *Aedes albopictus* ไปสู่แมลงหวี่สายพันธุ์ *Dosophila simulans* ซึ่งติดเชื้ออยู่แล้วเพื่อแทนที่ประชากรเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติในแมลงหวี่ ด้วยวิธี microinjection แล้วศึกษาการเกิดปรากฏการณ์ CI แบบสองทาง (Bidirectional CI/ Superinfection) ในแมลงหวี่หลังผสมพันธุ์กับแมลงหวี่ที่ไม่ได้ microinjection ด้วยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันนี้ [7]

Sinkins และคณะ ได้นำเสนอการเกิดการติดเชื้อแบบ Superinfection และทดสอบการติดเชื้อแบบสองทางโดยการถ่ายเชื้อด้วยวิธี microinjection แมลงหวี่ *Drosophila simulans* จาก Riverside สายพันธุ์ California (DSR) เข้าสู่ตัวอ่อนของสายพันธุ์ Hawaii (DSH) โดยทั้งสองสายพันธุ์ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* คนละชนิด แล้วปรากฏว่าในรุ่นลูกมีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* เหลือเพียงสายพันธุ์เดียวและเกิด CI ได้ [49]

Zabalou และคณะ ประสบผลสำเร็จในการ microinjection ด้วย capillary needle โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จากแมลง Chery fruit fly (*Rhagoletis cerasi*) ซึ่งติดเชื้ออยู่แล้วในธรรมชาติ เข้าสู่บริเวณ Posterior pole ของไข่แมลง Med fly (*Ceratitis capitaia*) ซึ่งปกติไม่ติดเชื้อ โดยเชื้อแบคทีเรียสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้และเกิด CI อย่างสมบูรณ์ในโฮสต์ใหม่ [62]

Xi และคณะ ได้พัฒนายุทธวิธีการในการควบคุมยุงพาหะที่ความสำคัญทางการแพทย์ ณ ที่นี้คือ ยุงลายสวน *Aedes albopictus* ด้วยการทำ microinjection เชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ *wAlbB* เข้าในไข่ของยุงที่ติดเชื้อแบคทีเรียแล้วแบบ Double infection ด้วยสายพันธุ์ *wAlbA* และ *wAlbB* พบว่าเกิด CI ขึ้นแบบไม่สมบูรณ์จากการติดเชื้อแบบสองทาง จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถนำข้อมูลมาประยุกต์ใช้ในการกดและแทนที่ประชากรยุงพาหะก่อโรคได้ [60]

ยิ่งกว่านั้นในปี 2006 Ruang-areerate และ Kittayapong ส่งถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จากยุงลายเสือ *Aedes albopictus* ที่ติดเชื้อสองสายพันธุ์คือสายพันธุ์ *wAlbA* และ *wAlbB* ด้วยวิธี microinjection เข้าสู่ยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* เพศเมียตัวเต็มวัยที่ไม่มีเชื้อเพื่อให้ติดทั้งสองสายพันธุ์ ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้นำเสนอผลการทดลองว่า ยุงลายบ้านเพศผู้ที่ติด

เชื้อ (AegW) เมื่อผสมพันธุ์กับยุงลายบ้านเพศเมียที่ไม่ติดเชื้อปรากฏว่า มีอัตราการฟักไข่ลดลงมากกว่ายุงในธรรมชาติ ส่วนระดับการเกิด CI นั้นขึ้นอยู่กับความหนาแน่นการติดเชื้อในโฮสต์ นอกจากนั้นยังนำเสนอว่าเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สามารถนำไปประยุกต์ในระบบการขับเคลื่อนยีนที่ประกอบรวมเข้ากับเชื้อแบคทีเรีย แล้วนำไปดัดแปลงพันธุกรรมยุงเพื่อให้ต้านการส่งถ่ายเชื้อก่อโรคที่มียุงเป็นพาหะได้ แต่งานวิจัยนี้การเกิด CI เกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ [43]

กระทั่งปี 2009 Woolfit และคณะ ศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยุง 3 ชนิด (*Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* และ *Culex quinquefasciatus*) เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในแมลงหวี่ (*wMel*) และยุงรำคาญ (*wPip*) ได้รายงานว่าแบคทีเรีย endosymbiont ในที่นี้คือ *Wolbachia* และโฮสต์สามารถถ่ายยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนจากต่อมน้ำลาย (SGS; salivary gland surface protien) ของยุงถึงกันระหว่างยุงกับ *Wolbachia pipientis* ได้แบบในแนวราบเนื่องจากยีน SGS นี้มีความคล้ายคลึงยีนใน *Wolbachia* ที่มีความหลากหลายต่างไปจากในยุง แต่แสดงออกได้อาจเพราะบริเวณ interdomain ของยีนมีส่วนทำให้ยีนวิวัฒนาการเปลี่ยนแปลงเป็นยีนใหม่และสามารถแสดงออกได้ในจีโนมของแบคทีเรีย [59]

งานวิจัยที่ได้นำเสนอมาทั้งหมดดังกล่าวสามารถสร้างการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้อย่างประสบผลสำเร็จในโฮสต์ใหม่อาจเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นเชื้อที่ต้องอาศัยในไซโตพลาสซึมของเซลล์แมลงอยู่แล้วซึ่งบางครั้งอาจต้องอาศัยเวลาในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ๆภายในเซลล์โฮสต์และต้องมีปริมาณและความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียในระดับต่ำที่สุด (Threshold) ที่จะสามารถถ่ายเชื้อให้สำเร็จในหลายๆรุ่น แต่ปรากฏการณ์ CI ยังเกิดได้ไม่สมบูรณ์ดังนั้น การทดลองการถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F จากเรือด (Bed bug) ที่พบในเขตร้อน เข้าสู่ยุงลายบ้านจึงเป็นอีกรูปแบบงานวิจัยที่เป็นอีกทางเลือกในการศึกษาหาแบคทีเรีย *Wolbachia* เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่เหมาะสมในการนำประยุกต์เพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคจากแมลงพาหะ แต่ทั้งนี้และทั้งนั้นจากงานวิจัยทั้งหมดดังกล่าวจำเป็นต้องทำการศึกษาถึงสมรรถนะของแมลงหลังติดเชื้อแบคทีเรียเพื่อยืนยันถึงประสิทธิภาพของระบบการติดเชื้อแบคทีเรียต่อโฮสต์ก่อนประยุกต์ใช้จริง

5. การประเมินสมรรถนะและการแทนที่ประชากรแมลงในธรรมชาติ

สมรรถนะ (Fitness cost) ได้รับการนิยามว่าเกี่ยวข้องกับความสำเร็จของการถ่ายทอดยีนในระบบพันธุกรรมไปยังรุ่นต่อๆไปได้ [31] โดยประเมินสมรรถนะได้จากการศึกษาการรอดชีวิต (Survival) และ การศึกษาการถ่ายทอดความสามารถและลักษณะทางพันธุกรรมไปยังลูกหลาน (Reproduction) ได้ ด้วยการศึกษาวิเคราะห์ประเมินผลจาก Parameter หลายประการดังต่อไปนี้ เช่น การวางไข่ (Fecundity) ความแข็งแรงสมบูรณ์ (Fertility) ผลิตไบโอแมสจากตัวอ่อนหรือลูกน้ำ (Larval biomass productivity) อัตราการเจริญ (Developmental rate) การลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย (Adult emergence) อัตราส่วนเพศผู้ (Male ratio) และ การแข่งเข้าคู่ผสมพันธุ์ (Mating competitiveness)

ยุงที่ได้รับการแปลงพันธุ์จะมีสมรรถนะลดลงเนื่องจากผลกระทบเชิงลบของยีนจากการส่งถ่ายให้รวมกับโครโมโซม เช่น สารสีเขียว (Fluorescent marker) โปรตีนต้านเชื้อก่อโรค หรือ จากการกลายพันธุ์เนื่องจากการแทรกของยีนกับโครโมโซมของยุง [9] [31] Catteruccia ได้นำเสนอให้เห็นว่ายุงก้นปล่อง *Anopheles stephensi* ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุ์เกิดการกลายพันธุ์บริเวณที่ transgene แทรกรวมกับโครโมโซมของยุงก้นปล่องและการแสดงออกของยีนนี้มีผลทำให้สมรรถนะของยุงก้นปล่องดัดแปลงพันธุ์ลดลง ดังนั้นยุงดัดแปลงพันธุ์ควรได้รับการปรับปรุงสมรรถนะให้มีความสารถในการแข่งขันและมีความสมารถดำรงชีวิตในธรรมชาติก่อนวางแผนเพื่อปล่อยไปแทนที่ยุงในธรรมชาติ [8]

Hurd และคณะ กล่าวว่า มีการกล่าวถึงการค้นหากลไกการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแมลงแปลงพันธุ์กันอย่างกว้างขวางแต่ยังไม่มีการทดสอบถึงสมรรถนะลงลึกซึ้งถึงรายละเอียดอย่างจริงจัง จึงได้สร้างแบบการทดสอบและเปรียบเทียบสมรรถนะของยุงก้นปล่องสายพันธุ์ *Anopheles gambiae* แปลงพันธุ์ (Resistance) กับยุงก้นปล่องที่ไม่ได้แปลงพันธุ์ (Susceptible) หลังจากได้รับเชื้อ *Plasmodium yoelii nigeriensis* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าไม่ปรากฏว่ามีการติดเชื้อมาลาเรียในบริเวณทางเดินอาหารของยุงก้นปล่อง Resistance เมื่อเทียบสมรรถนะด้านความอยู่รอด (Survival) อัตราการวางไข่ การฟักไข่ ของยุงทั้งสองชนิดพบว่ามีอัตราความอยู่รอดตลอดช่วงชีวิต (Life spans) อัตราการวางไข่ และการฟักไข่ ในระดับที่ใกล้เคียงกัน [24]

ก่อนการนำแมลงดัดแปลงพันธุ์ไปประยุกต์ใช้ควรคำนึงถึงประเด็นดังนี้ ประการแรกคือการถ่ายทอดยีนเป้าหมายจากรุ่นสู่รุ่นอย่างถาวรเพื่อให้ยีนนั้นสามารถแสดงออกในการยับยั้งหรือต้านทานการแพร่กระจายเชื้อก่อโรคผ่านทางแมลงพาหะ ประการต่อมาคือควรคำนึงถึงความปลอดภัยของผลกระทบของยีนเป้าหมายต่อแมลงแปลงพันธุ์เองในแง่ของสารพิษจากยีนเป้าหมาย

หรือยีนอาจทำให้แมลงดื้อยาฆ่าแมลงได้ และประการสุดท้ายควรได้รับการพิจารณาถึงสมรรถนะของแมลงแปลงพันธุ์ถือเป็นประเด็นที่สำคัญต้องได้รับการพิจารณาต่อจากกระบวนการการดัดแปลงพันธุ์ ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นว่าการศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* นั้นสามารถนำข้อมูลมาประยุกต์เป็นวิถีทางใหม่อีกวิถีหนึ่งในการใช้เป็นส่วนประกอบของระบบการดัดแปลงพันธุกรรมของแมลงพาหะเพื่อให้ได้มาซึ่งแมลงดัดแปลงพันธุ์ได้ที่สามารถถ่ายทอดยีนไปสู่รุ่นต่อๆไปอย่างตลอดและถาวรได้ โดยเฉพาะเมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติหนึ่งที่เด่นชัดและพบได้บ่อยคือปรากฏการณ์ CI ซึ่งเกิดขึ้นเพื่อทำให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอด สามารถปรับตัวและการเอาชนะสภาวะแวดล้อมภายในไซโตพลาสซึมของโฮสต์ กระทั่งถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไปสู่ลูกหลานได้ จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงเป็นที่น่าศึกษาเพื่อนำเชื้อแบคทีเรียนี้มาแทนที่ Transposable element ในระบบการดัดแปลงพันธุ์แมลง ที่มีประสิทธิภาพในการรวมตัวเข้ากับโครโมโซมของและถ่ายทอดยีนเป้าหมายไปสู่รุ่นลูกหลานได้ในอัตราต่ำ ดังนั้นเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จึงน่าจะสามารถขับเคลื่อนยีนต้านเชื้อก่อโรคที่มีแมลงเป็นพาหะได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า [49] แต่ทั้งนี้และทั้งนั้นจำเป็นต้องศึกษาสมรรถนะของแมลงหลังจากได้รับเชื้อ *Wolbachia* นี้ให้ละเอียดถี่ถ้วนและปลอดภัยต่อประชากรของแมลงที่ต้องการศึกษาและระบบนิเวศรวมถึงความปลอดภัยของประชากรมนุษย์ก่อนนำผลการทดลองมาประยุกต์ใช้จริง

ในการทดสอบสมรรถนะของยุง นอกจากจะมีรายละเอียดหรือมี Parameter มากมายดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นโดย Marreli, M.T และคณะ นั้นคือ การวางไข่ ความแข็งแรงสมบูรณ์ผลิตไบโอแมสจากตัวอ่อนหรือลูกน้ำ อัตราการเจริญ การลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย อัตราส่วนเพศผู้และ การแข่งเข้าคู่ผสมพันธุ์แล้วนั้น ยังมีอีกพารามิเตอร์ที่จำเป็นต้องศึกษาคือ ขนาดของร่างกาย (Body size) และจำนวนอสุจิทั้งหมดของแมลง [31]

เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มีบทบาทหน้าที่ต่อระบบสืบพันธุ์ของโฮสต์สองแบบคือ ดัดแปลงอสุจิของโฮสต์ในระหว่างกระบวนการสร้างอสุจิ (Spermatogenesis) ถูกกำหนดเป็น mod และแบบที่สองคือ เพื่อช่วยชีวิตของตัวอ่อน และถูกกำหนดเป็น Resc (For rescue) จากนั้น Veneti Z และคณะ ได้ศึกษาผลความสัมพันธ์ของการเกิด CI ต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* แบบทางเดียว (Unidirectional CI) ที่บริเวณสเปิร์มซีสต์ (Sperm cyst) ในแมลงหวี่ ซึ่งตรวจติดตามการติดเชื้อด้วย Antibody ต่อโปรตีนที่เซลล์ผิวของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* (*Wolbachia* specific protein; *WSP*) แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ Confocal โดยแบ่งการทดลองออกเป็นสองกลุ่มคือกลุ่มแรกคือ แมลงหวี่ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มที่ติดเชื้อโดยการ Transinfected พบว่า กลุ่มที่หนึ่งมีความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับการเกิด CI กับซีสต์ที่ติดเชื้อ ซึ่งกำหนดฟีโนไทป์ mod^{+} (modified phenotype) กลุ่มที่สองแบ่งผลการทดลองออกเป็นสองกลุ่มย่อยคือ กลุ่มแรกพบว่าซีสต์มีการติดเชื้อแบคทีเรียแต่ไม่เกิด CI และกลุ่มที่สองมีการติด

เชื้อในซีสต์น้อยกว่าและไม่เกิด CI แต่ติดเชื้อในโซมาติกเซลล์มากกว่า จึงสรุปว่า ประการแรก เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สามารถดัดแปลงพันธุกรรมของอสุจิในแมลงหวี่ได้ ประการที่สอง การติดเชื้อแบคทีเรียนี้สามารถก่อให้เกิดปรากฏการณ์ CI ได้ แต่ขึ้นอยู่กับโฮสต์ [53] ต่อจากนั้น Dobson และคณะ ได้ทำการทดสอบการเกิด CI และสมรรถนะของยุงลายสวน *(Aedes albopictus)* เพศเมีย หลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ซึ่งมีพารามิเตอร์ของการทดสอบสมรรถนะคือ ความยืนยาวของชีวิต (Host longevity) ของยุงลายสวน อัตราการฟักไข่ (Egg hatch rate) และการวางไข่ (Fecundity) สรุปผลการทดลองว่า ยุงลายสวนที่ติดเชื้อแบบ Single Infection และ Super Infection มีสมรรถนะไม่แตกต่างกัน นอกจากนั้นยุงลายสวนที่ติดเชื้อแบคทีเรียยังมีความยืนยาวของชีวิตยังมีอัตราการฟักไข่และการวางไข่มากกว่ายุงที่ไม่ติดเชื้อ แต่งานวิจัยนี้ไม่ได้ทดลองในยุงตัวผู้ เพราะยุงตัวผู้ที่ติดเชื้อมีผลเชิงลบต่อพารามิเตอร์ดังกล่าวของการทดสอบสมรรถนะยุง [14]

Ponlawat และ Harrington กล่าวว่าความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับชีววิทยาการผสมพันธุ์ของยุงเป็นสิ่งจำเป็นต่อการศึกษาพฤติกรรม การถ่ายทอดยีน โครงสร้างประชากร และการควบคุมแมลงพาหะ ดังนั้นจึงได้ทดลองศึกษาผลของอายุและขนาดร่างกายของยุงต่อจำนวนอสุจิในยุงพาหะไข้เลือดออก *Aedes aegypti* (L.) สายพันธุ์ไทย สายพันธุ์ Rockefeller (ROCK) และสายพันธุ์ที่จับจากประเทศไทย โดยเน้นขนาดร่างกายเป็นปัจจัยสำคัญต่อการศึกษาจำนวนอสุจิทั้งหมด ปรากฏว่ายุงที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีเส้นปีกยาว 2.27 มิลลิเมตร มีปริมาณอสุจิมากกว่ายุงขนาดเล็ก ซึ่งมีเส้นปีกยาวประมาณ 1.85 มิลิเมตรในขณะที่อายุเท่ากัน นอกจากนั้น ยังพบว่าปริมาณอสุจิของยุงแตกต่างกันไปตามอายุดังนี้ ปริมาณอสุจิจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่หนึ่งวันจนอายุสิบวัน ซึ่งจะมีปริมาณอสุจิสูงสุด และจะหยุดสร้างเมื่ออายุยี่สิบวัน จากการทดลองดังกล่าว ยุงที่จับได้ในประเทศไทย มีปริมาณอสุจิมากที่สุดที่อายุเท่ากันเมื่อเทียบสายพันธุ์ไทยกับสายพันธุ์ ROCK อาจเนื่องมาจากยุงที่จับได้ในประเทศไทยได้รับสารอาหารมากกว่า ปริมาณอสุจิเป็นปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จในการเข้าคู่ผสมพันธุ์และชี้ให้เห็นถึงความแข็งแรงของแมลง [40]

เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* คือปัจจัยหนึ่งในการกำหนดความแข็งแรงหรือสมรรถนะของโฮสต์ หนึ่งในนั้นคือความสามารถในการผลิตอสุจิน้อยลงในแมลงหวี่สายพันธุ์ *Drosophila simulans* นั่นหมายถึงแมลงหวี่มีความสมบูรณ์น้อยลง ดังนั้น Crespigny and Wedell จึงทดสอบการติดเชื้อ *Wolbachia* มีผลต่อความสามารถในการแข่งขันของอสุจิของแมลงหวี่ตัวผู้ที่ผ่านการผสมพันธุ์มาแล้ว พบว่าแมลงหวี่ที่ติดเชื้อแบคที่เรีย *Wolbachia* ที่เคยผ่านการผสมพันธุ์มาแล้วในครั้งแรกสิบห้านาที แล้วนำมาผสมพันธุ์ครั้งที่สองสิบห้านาที แล้วนับจำนวนไข่ของตัวเมียพบว่าไข่ที่ได้จากการผสมพันธ์กับแมลงหวี่ตัวผู้ที่ติดเชื้อ *Wolbachia* ประมาณ 71.7 ± 0.005% ซึ่งน้อยกว่าไข่ที่ได้จากการสมพันธุ์กับแมลงหวี่ตัวผู้ที่ไม่ติดเชื้อ ซึ่งนับไข่ได้ 82.3 ± 0.04%

อย่างมีนัยสำคัญ นั่นหมายถึง *Wolbachia* เป็นปัจจัยสำคัญต่อการลดทอนความสามารถในการแข่งขันของอสุจิ อีกประการหนึ่ง แมลงหวี่เพศเมียที่ผสมพันธุ์หลายครั้ง มีความโน้มเอียงต่อการเลือกอสุจิจากตัวผู้ที่ไม่ติดเชื้อ ซึ่งไม่ก่อให้เกิด CI เพราะ *Wolbachia* มีผลต่อการกระจายตัวของประชากรของแบคทีเรียเอง และ CI ทำให้การแพร่กระจายเชื้อลดลง [10] Price รายงานว่าแมลงหวี่เพศเมียที่ผสมกับเพศผู้ที่ผ่านการผสมพันธุ์แล้วหนึ่งครั้งวางไข่ประมาณ 74% [41] แต่ Hoffmann และคณะ แย้งว่าความสามารถของอสุจิจากแมลงหวี่ตัวผู้ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *Wolbachia* ไม่แตกต่างกัน จากการทดลองดังกล่าวสาเหตุที่เลือกตัวผู้ที่ผ่านการผสมพันธุ์แล้วมาทดสอบ เพราะว่าการผสมพันธุ์ครั้งแรกนั้นแมลงหวี่ทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อจะหลั่งจำนวนอสุจิอย่างเต็มที่เพื่อเพิ่มโอกาสการปฏิสนธิ แต่การผสมพันธุ์ครั้งที่สองต่อการติดเชื้ออาจมีผลจำกัดปริมาณอสุจิเพศผู้อาจเห็นความแตกต่างในการสร้างอสุจิ ซึ่งการติดเชื้ออาจมีผลจำกัดปริมาณอสุจิ นอกจากนี้ปัจจัยด้านขนาดตัวผู้ ระยะเวลาในการผสมพันธุ์มีผลต่อความสามารถในการแข่งขันของอสุจิ เพราะอสุจิที่มีอายุมากอาจตายในระหว่างไข่ตก (Oviposition) [22]

Fry และคณะ กล่าวว่าแมลงหวี่เพศเมียสายพันธุ์ *Drosophila melanogaster* ที่ติดเชื้อ *Wolbachia* หลังผสมพันธุ์กับแมลงหวี่เพศผู้ที่ไม่ติดเชื้อวางไข่มากกว่าแมลงหวี่เพศเมียตามธรรมชาติ ซึ่งหมายถึงเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มีผลต่อสมรรถนะของแมลงหวี่ [17]

ตัวเรือดคน และตัวเรือดเขตร้อนมีการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ประมาณ 83 -100% จากการศึกษาในทวีปอเมริกาเหนือไม่พบความแตกต่างของอัตราการติดเชื้อระหว่างภูมิภาค เพศ และระยะการเจริญอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น *Wolbachia* จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็นยุทธวิธีในการควบคุมแมลงพาหะก่อโรคที่สำคัญทางการแพทย์ [62] ด้วยปรากฏการณ์ CI ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น มีผลทำให้โครโมโซมเจริญแบบผิดปกติ แต่มีส่วนช่วยให้ *Wolbachia* สามารถถ่ายทอดเชื้อไปยังแมลงที่ปลอดเชื้อได้เนื่องจากแมลงตัวเมียที่มีเชื้อสามารถผสมพันธุ์กับแมลงตัวผู้ที่ปลอดเชื้อและมีเชื้อได้สำเร็จ เป็นสาเหตุให้เกิดการแทนที่ของประชากรในได้ ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจต่อการนำมาใช้ในระบบการขับเคลื่อนยีนอย่างมีคุณภาพเนื่องจากยีนเป้าหมายจะถูกขนส่งพร้อมกับการแพร่เชื้อของแบคทีเรียโดยตรง จากระบบดังกล่าวจะต้องอาศัยปัจจัยที่จำเป็นดังนี้คือ การเกิด CI ประสิทธิภาพของการแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* และสุดท้ายคือความมีสมรรถนะที่ดีของโฮสต์ [43]

เนื่องจากความก้าวหน้าเกี่ยวกับความรู้ทางด้านชีววิทยาเชิงโมเลกุลของยุงแมลงพาหะและความสัมพันธุ์ระหว่างเชื้อก่อโรคกับยุง เป็นที่มาของการดัดแปลงพันธุ์ยุงที่ต้านเชื้อก่อโรคได้และสามารถถ่ายทอดยีนไปสู่รุ่นถัดไปอย่างถาวรในกรงทดลอง แต่สมรรถนะของยุงแปลงพันธุ์เมื่อเทียบกับยุงที่ไม่ได้รับการแปลงพันธุ์หรือยุงในธรรมชาติยังต่ำ ดังนั้นยุงดัดแปลงพันธุ์จึงต้องได้รับการประเมินสมรรถนะและทดสอบความปลอดภัยก่อนทดลองปล่อยสู่ธรรมชาติ เพื่อให้เกิดคุณประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อมและเกิดประโยชน์ต่อสาธารณชน