บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันแม้ว่าโรคติดต่อหลายชนิดสามารถควบคุมได้ แต่โรคติดต่อที่มีแมลงเป็นพาหะยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคไข้เลือดออกซึ่งมีแนวโน้มการเกิดโรคสูงขึ้น เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางสภาวะสิ่งแวดล้อม ทางเศรษฐกิจและสังคม การอพยพของประชากรเข้าสู่ตัวเมือง การขยายตัวของบริการด้านสาธารณูปโภคไม่ได้สัดส่วนสัมพันธ์กับการขยายตัวของชุมชน และนิสัยความเป็นอยู่ของประชาชนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีส่วนทำให้ยุงพาหะชุกชุมและการแพร่กระจายโรคไปได้อย่างรวดเร็วและกว้างขวางโดยเฉพาะในแหล่งชุมชนที่มีประชากรอาศัยอยู่อย่างหนาแน่น [1] [2]

1.1 ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*)

ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) จัดเป็นยุงพาหะนำโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์ชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะการเป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออก โรคไข้เลือดออก (Dengue Hemorrhagic Fever) เป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจาก Dengue virus มีลักษณะโรคที่สำคัญคือ มีไข้ร่วมกับมีอาการเลือดออก อาจเป็นที่ผิวหนังและ/หรืออวัยวะภายใน ตับ ไต และมักมีภาวะช็อคซึ่งทำให้เสียชีวิตได้ ส่วนยุงลายนั้น มีวงจรชีวิต แบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ ไข่ ลูกน้ำ ตัวโม่งและตัวเต็มวัย รวมแต่ละระยะของการเจริญมักจะกินเวลาประมาณ 7-10 วัน ในฤดูฝน และจะยาวนานเป็น 18 – 20 วัน ในฤดูหนาว [1] ยุงมีอายุประมาณ 1 เดือน ตัวผู้ของยุงทุกชนิดไม่ดูดเลือดแต่มีชีวิตอยู่ได้ด้วยการดูดน้ำหวานจากดอกไม้ ส่วนตัวเมียดูดกินเลือดเป็นอาหารเพื่อวางไข่ โดยส่วนใหญ่ยุงจะวางไข่มีลักษณะเป็นกระจายตามพื้นที่ที่มีลักษณะภูมิอากาศแบบร้อนชื้นของโลก ซึ่งยุงลายเป็นยุงบ้านที่อาศัยอยู่ภายในและรอบๆบ้าน ยุงตัวเมียเท่านั้นที่ดูดกินเลือดคนเป็นอาหารเฉพาะเวลากลางวัน เพาะพันธุ์ในน้ำใสในภาชนะ เช่น โอ่งน้ำ ถ้วยรองขาตู้กันมด แจกันดอกไม้ ยางรถยนต์ ปัจจุบันยังขาดวัคซีนหรือมาตรการป้องกันที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมและลดอุบัติการณ์การเกิดไข้เลือดออก ซึ่งในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกประมาณ 100 ล้านคน [32]

จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องพัฒนายุทธวิธีใหม่ๆเพื่อเสริมวิธีการควบคุมพาหะที่มีอยู่ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น หนึ่งในนั้นคือยุทธวิธีการแทนที่ประชากร (Population replacement) ของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ในธรรมชาติด้วยประชากรยุงลายแปลงสายพันธุ์ให้มีความสามารถต่อต้านการส่งถ่ายเชื้อไวรัสไข้เลือดออก เช่น การใช้เทคโนโลยีของ RNA interference และ Genomic Sequencing เพื่อสร้างยุงลายสายพันธุ์ใหม่ที่มียีนต่อต้านเชื้อก่อโรคและสามารถถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวทางพันธุกรรมได้อย่างถาวร [3] [4] [19]

1.2 เชื้อไวรัสไข้เลือดออก (Dengue virus) อาการและอาการแสดงของโรคไข้เลือดออก

ไวรัสไข้เลือดออกเป็น Single-strand positive-polarity RNA virus อยู่ในวงศ์ Flaviviridae แบ่งเป็น 4 ชนิด คือ dengue types 1-4 การระบาดของเชื้อไวรัสเกี่ยวข้องกับการที่ยุงดูดเลือดที่มีเชื้อแล้วไปกัดคนอื่นทำให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อได้ หลังจากยุงได้รับเชื้อจากการดูดเลือดแล้ว ในระหว่าง 8-10 วัน (extrinsic incubation period) ไวรัสในตัวยุงจะมีการเพิ่มจำนวนใน mononuclear phagocyte [32] และแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำลายเพื่อรอถ่ายทอดเชื้ออีกครั้ง นอกจากนี้การดูดเลือดถือเป็นการกระตุ้นให้ยุงเพศเมียวางไข่จึงเป็นโอกาสทำให้ไวรัสสามารถแพร่เชื้อไปยังไข่และติดเชื้อในยุงรุ่นต่อไป และสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านวงจรการดำเนินชีวิตของมนุษย์และวงจรชีวิตของยุงพาหะหรือยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ได้

อาการและอาการแสดงของไข้เลือดออกมี 2 แบบคือ classical dengue fever มีอาการ 3-8 วันหลังจากถูกยุงมีเชื้อกัด อาการที่สำคัญ เช่นว่า อุณหภูมิร่างกายสูงกว่าปกติ ปวดหัว ไข้สูง ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ปวดตามกระดูกหรือข้อต่อ และอีกแบบคือ dengue hemorrhagic fever (DHF)/ dengue shock syndrome (DSS) คือ เป็นไข้เลือดออกชนิดที่รุนแรงซึ่งเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพทางภูมิคุ้มกัน (immunopathology) และเกิดเฉพาะกับผู้ที่เคยได้รับเชื้อ dengue virus มาก่อนแล้ว อาการ คือ อาการทรุดอย่างรวดเร็ว ทำให้มีอาการปวดท้องร่วมด้วย หงุดหงิด กระสับกระส่าย ระคายเคือง เกล็ดเลือดต่ำ และอาการเลือดออกจากเส้นเลือดฝอย เลือดเข้มข้นและความดันต่ำ ปัจจุบันยังไม่มียารักษาที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งวิธีการรักษาเป็นการรักษาแบบประคับประคอง [32]

1.3 การควบคุมพาหะก่อโรค (Vector Control)

สารเคมีกำจัดแมลง (insecticides) ถือเป็นวิธีการเริ่มต้นในการนำมาใช้ควบคุมแมลงพาหะ แต่ยังไม่มีประสิทธิภาพพอเนื่องจากเกิดการดื้อยาของแมลง และมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงเกิดปัญหาทางเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ และส่งผลสะท้อนถึงการดูแลเอาใจใส่ปัญหาสาธารณสุข ทั้งนี้ยังขาดวิธีการควบคุมที่มีประสิทธิภาพมาใช้ป้องกันและรักษาโรคไข้เลือดออกอีกด้วย ปัจจุบันนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการควบคุมยุงพาหะด้วยวิธีการดัดแปลงพันธุกรรมของยุงเพื่อยับยั้งการระบาดของเชื้อก่อโรคในยุงธรรมชาติ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ก็ยังขาดประสิทธิภาพในการขับเคลื่อนยีนให้ถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปสู่ลูกหลานได้ วิธีการการดัดแปลงพันธุกรรมของยุงดังกล่าวอาจประสบผลสำเร็จได้ด้วยการนำเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* มาประยุกต์เป็นพาหนะขับเคลื่อนยีนผ่านไซโตพลาสซึมของยุงในธรรมชาติได้ด้วยอัตราที่สูง ด้วยหลักการติดเชื้อของแบคทีเรีย [5] [48]

1.4 การประเมินสมรรถนะของยุงดัดแปลงพันธุ์

การประเมิน Fitness cost หรือสมรรถนะของยุงลายบ้านหลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* นั้นเป็นการศึกษาความสามารถในการอยู่รอดและความสามารถในการสืบพันธุ์ของยุงเป็นหลัก โดยพิจารณาพารามิเตอร์ต่างๆดังต่อไปนี้คือ ความสามารถในการวางไข่ (fecundity) ความสามารถในการมีชีวิตรอดของลูกน้ำจากการฟักตัว (fertility) จำนวนลูกน้ำที่รอดชีวิตกระทั่งหมดระยะลูกน้ำ (larval biomass productivity) อัตราการพัฒนาไปสู่ระยะต่อไป (developmental rate) และการแข่งขันเข้าคู่ผสมพันธุ์ (mating competitiveness) ในอนาคตอาจจะสามารถนำเชื้อ *Wolbachia* มาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มสมรรถนะของยุงดัดแปลงพันธุกรรม (Transgenic mosquitoes) ด้วยการทำ microinjection ให้มีความสามารถแข่งขันกับยุงตามธรรมชาติได้ [31] ซึ่งยุงที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* นี้ น่าจะมีความแข็งแรงและมีสมรรถนะที่ดีกว่ายุงที่ไม่ได้รับเชื้อ *Wolbachia*

ทั้งนี้การประเมิน fitness cost ในยุงตัวผู้ประกอบด้วย ประการแรกคือ การนับปริมาณอสุจิเนื่องจากยุงตัวผู้ที่ติดเชื้อ *Wolbachia* ซึ่งอาจมีผลต่อการผลิตปริมาณอสุจิทั้งด้านปริมาณและ/หรือคุณภาพ ประการที่สองคือ การประมาณอายุของยุง เพราะการติดเชื้อในยุงตัวผู้อาจจะมีผลทำให้ยุงมีอายุยืนยาวหรือสั้นลงได้ หากยุงตัวผู้ติดเชื้อแบคทีเรียมีอายุยืน จะทำให้เกิดปรากฏการณ์ Unidirectioal CI ได้มากขึ้น และ/หรืออาจเป็นผลดีหากมีการผสมพันธุ์กับยุงตัวเมีย

ที่ติดเชื้อสายพันธุ์เดียวกันซึ่งลูกยุงจะมีชีวิตรอดและยุงตัวผู้ยังสามารถผสมกับตัวเมียได้หลายครั้ง ประการที่สามวัดขนาดตัวของยุง ด้วยการวัดความยาวของเส้นปีก เนื่องจากแบคทีเรียอาจมีผลต่อขนาดร่างกายของยุงตัวผู้ หากเชื้อแบคทีเรียมีผลกระทบเชิงบวกโดยทำให้ขนาดร่างกายของยุงใหญ่กว่ายุงตามธรรมชาติจะเป็นผลดีต่อการแข่งขันผสมพันธุ์กับตัวเมีย ซึ่งสามารถแพร่กระจายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในประชากรของยุงได้ดีกว่า โดยปกติแล้วปริมาณอสุจิที่ผลิตได้ของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ยังขึ้นอยู่กับอายุ (age) ขนาดของร่างกาย (body size) ชนิดของยุง (strain) และศักยภาพในการขยายพันธุ์ของยุง (potential reproductive fitness) ซึ่งยุงที่มีขนาดใหญ่กว่า (ความยาวเส้นปีก; Winglength) อายุมากกว่าจะมีสมรรถนะและความแข็งแรงต่อการแข่งขันการผสมพันธุ์ที่ดีกว่ายุงที่มีขนาดเล็กเนื่องจากสามารถผลิตอสุจิในอัณฑะ (testes) และถุงน้ำเชื้อ (seminal vesicle) ได้ในปริมาณมากกว่าจึงสามารถผสมพันธุ์กับยุงตัวเมียได้หลายตัวต่อวันและหลายๆวัน การศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของยุงเป็นปัจจัยพื้นฐานสำคัญต่อการควบคุมเชิงพันธุศาสตร์ของยุงลายพาหะได้ในอนาคต [40] ในทางกลับกันยุงลายบ้านสายพันธุ์ Rockefeller (ROCK) อายุ 5 วันสามารถสร้างอสุจิทั้งหมดในปริมาณมากกว่ายุงอายุ 15 วัน เนื่องจากยุงที่แก่กว่าจะมีการเก็บอสุจิไว้ในอวัยวะเก็บอสุจิอย่างดีและแน่นจึงยากที่จะหาปริมาณอสุจิได้อย่างถูกต้อง [10] เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia pipientis* นั้นถือเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งในการกำหนดสมรรถนะของแมลงขาปล้อง เช่น มีผลทำให้การผลิตตัวอสุจิลดลงจึงทำให้ประสิทธิภาพในการแข่งขันการผสมพันธุ์ของ *Drosophila simulans* ที่ติดเชื้อลดลงเนื่องจากถูกเหนี่ยวนำจากปรากฏการณ์ความไม่เข้ากันของไซโตพลาสซึม และพบว่าตัวเมียที่ผสมพันธุ์กับตัวผู้ที่ติดเชื้อสามารถผลิตลูกรุ่นต่อมาได้ร้อยละ 71 ซึ่งน้อยกว่าตัวเมียที่ผสมพันธุ์กับตัวผู้ที่ปลอดเชื้อที่สามารถผลิตลูกได้ถึงร้อยละ 82 ซึ่งตรวจสอบการติดเชื้อด้วย Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในระหว่างการปฏิสนธิ ตัวอสุจิของ *Nasonia vitripennis* ที่ติดเชื้อมีพฤติกรรมเป็นปกติในเซลล์ไข่ คือนอกจากรูปร่างมีลักษณะเป็นแท่ง (Rod-shaped) แล้วจะเห็นเซ็นโตโซมสองอันหลังจากเข้าไปในเซลล์ คล้ายกับตัวอสุจิที่ปลอดเชื้อแสดงว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* ไม่ได้ทำลายเซ็นโตรโซม แต่การเกิด CI นั้นมีการทำลายเยื่อหุ้มโปรนิวเคลียส ในที่สุดจึงเกิดการสูญเสียโครโมโซมทางพ่อในกระบวนการแบ่งนิวเคลียสระยะต้น (First mitosis) แต่ในเซลล์ไข่แบคทีเรีย *Wolbachia* จะยับยั้ง CI ฉะนั้นจึงกล่าวได้ว่าแบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นโปรตีนควบคุม (Regulatory protein) วัฏจักรของเซลล์ [51] อีกปัจจัยหนึ่งที่ช่วยให้ *Wolbachia* ขยายพันธุ์ได้อย่างสำเร็จคือการถ่ายทอดเชื้อทางแม่อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะมีการกระจายเชื้อที่มีความเข้มข้นสูงในระยะกลางของการสร้างไข่ (oogenesis) บริเวณ anterior ของไข่โดยอาศัย microtubule และ Dynein/Dynactin complex [16]

ส่วนการประเมิน fitness cost ในยุงตัวเมียประกอบด้วย ประการแรกคือ นับจำนวนไข่ที่ยังมีชีวิตและนับจำนวนไข่ที่ตาย (Average egg/cross and % egg mortality) เพราะ *Wolbachia* อาจมีผลต่อปริมาณการสร้างไข่ของยุง หากสร้างได้ปริมาณมากจะเป็นผลดีต่อการแพร่เชื้อของ ประชากรยุงในธรรมชาติ ประการที่สองคือ อัตราส่วนของเพศเมียในแต่ละรุ่น (Sex ratio (Female/total)) เพราะหากยุงรุ่นนั้นๆมีเพศเมียมากและมีการติดเชื้อจำนวนมากจะเป็นผลดีต่อการแพร่เชื้อในประชากรยุงในธรรมชาติและลดการเกิด CI และประการที่สามคือ วัดความสามารถในการอยู่รอด (% Survival; Hatch, Pupation and Eclosion) และอายุของยุง (Longevity) ตั้งแต่ระยะ Larva, Pupa กระทั่ง Adult เพื่อประเมินผลของการติดเชื้อแบคทีเรีย หากเป็นผลเชิงบวกโดยเฉพาะระยะตัวเต็มวัย (adult) จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการกระจายเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น และตรวจสอบการติดเชื้อด้วย PCR

เทคนิค semi-nested PCR เป็นวิธีการที่สามารถใช้ในการตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ทั้งในยุงเพศผู้และเพศเมียแต่ละรุ่น ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแคทีเรียซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับควาวามน่าเชื่อถือ และ/หรือ การยืนยันอัตราการติดเชื้อด้วยวิธี Fluorescence *in situ* hybridizations (FISH) ในเซลล์ไข่ของยุงลายที่ติดเชื้อได้ อย่างจำเพาะโดยจะมีปริมาณการติดเชื้อสูงที่บริเวณด้านหน้า (Anterior region) ด้านหลัง (Posterior region) และส่วนเปลือก (Cortical region) ของไข่ แต่ Xi และคณะ (2005) พบว่าปริมาณความถี่ของการติดเชื้อขีดเริ่มต้น (Threshold infection frequency) เท่ากับร้อยละ 20 นั้นเหมาะสมต่อการการแพร่เชื้อต่อไปได้จนถึงรุ่นที่ 7 และพบว่าอัตราการติดเชื้อเท่ากับร้อยละ 100 และคงที่ในระดับเดิมนี้จนรุ่นที่ 9 [60] แต่ถ้าอัตราการติดเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 2 จะพบว่าไม่มีการแพร่เชื้อไปยังรุ่นลูกหลานได้เพราะความถี่ในการถ่ายทอดเชื้อขึ้นกับขีดจำกัดเริ่มต้นของระดับ CI รวมถึงความจำเพาะของการแพร่เชื้อผ่านทางแม่และสมรรถนะของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* เอง [22]

1.5 เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* spp. และการแทนที่ประชากร (Population Replacement)

Wolbachia เป็นแบคทีเรียที่อยู่อาศัยร่วม (endosymbiosis) กับสัตว์ขาปล้องโดยเฉพาะแมลงและ crustacean พบได้ที่บริเวณเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ (reproductive tissues) จากการศึกษาลำดับเบส (sequencing) โดยใช้ยีน 16s rRNA พบว่า *Wolbachia* จัดอยู่ในกลุ่ม alpha-Proteobacteria เป็น subdivision ของ purple bacteria และมีความใกล้ชิดกับ

ส่วนการประเมิน fitness cost ในยุงตัวเมียประกอบด้วย ประการแรกคือ นับจำนวนไข่ที่ยังมีชีวิตและนับจำนวนไข่ที่ตาย (Average egg/cross and % egg mortality) เพราะ *Wolbachia* อาจมีผลต่อปริมาณการสร้างไข่ของยุง หากสร้างได้ปริมาณมากจะเป็นผลดีต่อการแพร่เชื้อของ ประชากรยุงในธรรมชาติ ประการที่สองคือ อัตราส่วนของเพศเมียในแต่ละรุ่น (Sex ratio (Female/total)) เพราะหากยุงรุ่นนั้นๆมีเพศเมียมากและมีการติดเชื้อจำนวนมากจะเป็นผลดีต่อการแพร่เชื้อในประชากรยุงในธรรมชาติและลดการเกิด CI และประการที่สามคือ วัดความสามารถในการอยู่รอด (% Survival; Hatch, Pupation and Eclosion) และอายุของยุง (Longevity) ตั้งแต่ระยะ Larva, Pupa กระทั่ง Adult เพื่อประเมินผลของการติดเชื้อแบคทีเรีย หากเป็นผลเชิงบวกโดยเฉพาะระยะตัวเต็มวัย (adult) จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการกระจายเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น และตรวจสอบการติดเชื้อด้วย PCR

เทคนิค semi-nested PCR เป็นวิธีการที่สามารถใช้ในการตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้ทั้งในยุงเพศผู้และเพศเมียแต่ละรุ่น ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแคทีเรียซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความน่าเชื่อถือ และ/หรือ การยืนยันอัตราการติดเชื้อด้วยวิธี Fluorescence *in situ* hybridizations (FISH) ในเซลล์ไข่ของยุงลายที่ติดเชื้อได้ อย่างจำเพาะโดยจะมีปริมาณการติดเชื้อสูงที่บริเวณด้านหน้า (Anterior region) ด้านหลัง (Posterior region) และส่วนเปลือก (Cortical region) ของไข่ แต่ Xi และคณะ พบว่าปริมาณความถี่ของการติดเชื้อขีดเริ่มต้น (Threshold infection frequency) เท่ากับร้อยละ 20 นั้นเหมาะสมต่อการการแพร่เชื้อต่อไปได้จนถึงรุ่นที่ 7 และพบว่าอัตราการติดเชื้อเท่ากับร้อยละ 100 และคงที่ในระดับเดิมนี้จนรุ่นที่ 9 [60] แต่ถ้าอัตราการติดเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 2 จะพบว่าไม่มีการแพร่เชื้อไปยังรุ่นลูกหลานได้เพราะความถี่ในการถ่ายทอดเชื้อขึ้นกับขีดจำกัดเริ่มต้นของระดับ CI รวมถึงความจำเพาะของการแพร่เชื้อผ่านทางแม่และสมรรถนะของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* เอง [22]

1.5 เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* spp. และการแทนที่ประชากร (Population Replacement)

Wolbachia เป็นแบคทีเรียที่อยู่อาศัยร่วม (endosymbiosis) กับสัตว์ขาปล้องโดยเฉพาะแมลงและ crustacean พบได้ที่บริเวณเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ (reproductive tissues) จากการศึกษาลำดับเบส (sequencing) โดยใช้ยีน 16s rRNA พบว่า *Wolbachia* จัดอยู่ในกลุ่ม alpha-Proteobacteria เป็น subdivision ของ purple bacteria และมีความใกล้ชิดกับ

Escherichia และ *Rickettsia* ที่เป็นแบคทีเรียที่อาศัยในสัตว์ขาปล้องพาหะนำโรคเช่นกัน [37] จากการศึกษาทาง Phylogeny พบว่า *Wolbachia* กระจายอยู่ทั่วไปในแมลงให้อาศัยหลายชนิดซึ่งน่าจะเป็นการบ่งชี้ว่ามีการถ่ายทอด *Wolbachia* ข้ามสายพันธุ์ (Horizontal transmission) และระหว่างชนิดของแมลงขาปล้องได้ [57] [63] ปัจจุบันยังขาดวัคซีนหรือมาตรการป้องกันที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมและลดอุบัติการณ์การเกิดไข้เลือดออก ในแต่ละปีมีผู้ติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกประมาณ 100 ล้านคน [32] จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องพัฒนายุทธวิธีใหม่ๆเพื่อเสริมวิธีการควบคุมพาหะที่มีอยู่ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น หนึ่งในนั้นคือยุทธวิธีการแทนที่ประชากร (Population replacement) ของยุงลาย *Aedes aegypti* ในธรรมชาติด้วยประชากรยุงลายดัดแปลงสายพันธุ์ให้มีความสามารถต่อต้านการส่งถ่ายเชื้อไวรัสไข้เลือดออก เช่น การใช้เทคโนโลยีของ RNA interference เพื่อสร้างยุงลายสายพันธุ์ใหม่ที่มียีนต่อต้านเชื้อก่อโรคให้สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ [3] [4] [19] แต่วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการดัดแปลงพันธุกรรมยุงนี้กลับประสบความสำเร็จในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปในประชากรยุงในธรรมชาติในอัตราต่ำ เนื่องจากยุทธวิธีการดังกล่าวนั้นจำเป็นต้องมีพาหนะ (Vehicle) ในการขับเคลื่อนยีนต้านเชื้อก่อโรคที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม เพื่อให้มีการแพร่กระจาย Transgenes (ยีนที่ใส่เข้าไปใหม่ในยุงหรือยีนที่ต้องการให้มีการแสดงออกในยุงเช่นยีนที่ไปยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส) ไปยังประชากรเป้าหมายในธรรมชาติได้อย่างอัตโนมัติและรวดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับการปล่อยให้ถ่ายทอดยีนทางพันธุกรรมตามกฎของเมนเดล (Mendelian inheritance) และมีสมรรถนะ (Fitness cost) ในระบบของการขับเคลื่อนยีนต้านเชื้อไวรัสที่สูง เพื่อให้ระบบดังกล่าวสามารถแทนที่ประชากรยุงในธรรมชาติได้

ดังนั้น ด้วยความสามารถและคุณสมบัติของการแพร่เชื้อของ *Wolbachia* สู่ประชากรแมลงขาปล้องในธรรมชาติด้วยกลไก CI ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงควรแก่การนำข้อดีนี้มาประยุกต์เป็นส่วนหนึ่งในยุทธวิธีการควบคุมและแทนที่ประชากรของแมลงพาหะของเชื้อก่อโรค (Population replacement and repression) [61] จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้เพื่อประเมินและศึกษาผลกระทบของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ที่สกัดจากตัวเรือด (Bedbugs; *Cimex hemipterus*) ต่อสมรรถนะของประชากรยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ในธรรมชาติ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการนำพาและขับเคลื่อนยีนต้านและ/หรือยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ถูกเชื่อมกับแบคทีเรีย *Wolbachia* แล้วส่งถ่ายยีนเข้าไปในประชากรของยุงพาหะได้อย่างมีประสิทธิภาพและสมรรถนะที่สูงเพียงพอ

คำถามสำหรับงานวิจัย

<u>คำถามหลัก</u> การส่งถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จากเรือดสู่ยุงลายบ้าน สามารถเหนี่ยวนำให้ยุงลายบ้านมีสมรรถนะแตกต่างจากยุงลายบ้านที่ปลอดเชื้อหรือไม่

<u>คำถามรอง</u> วิธี Fluorescence *in situ* hybridizations (FISH) สามารถแสดงให้เห็นการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงลายบ้านอย่างจำเพาะในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ได้หรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาสมรรถนะของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* จากการส่งถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ข้ามสายพันธุ์ที่สกัดได้จากเรือด (bed bug) โดยวิธี direct microinjection

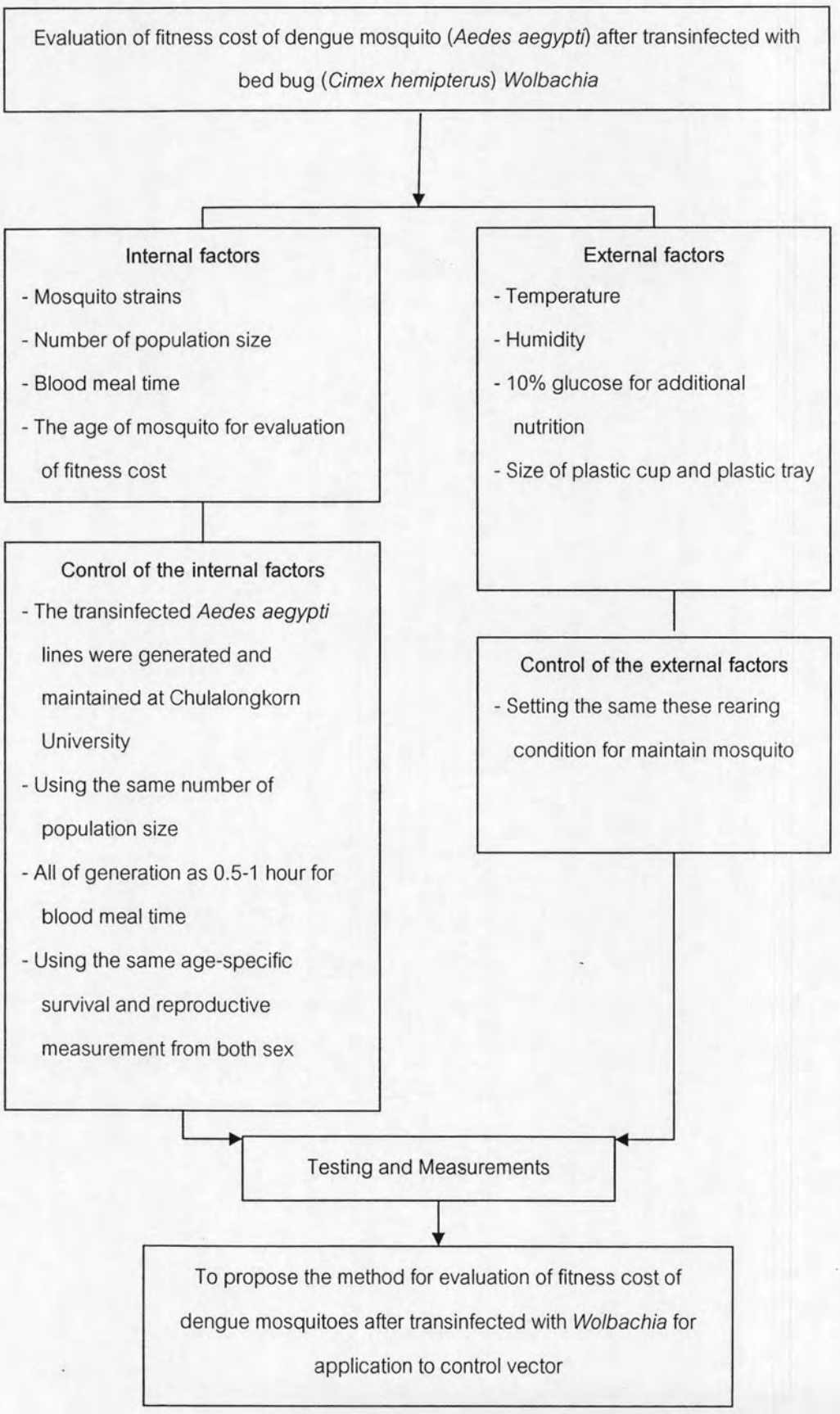
เพื่อแสดงให้เห็นการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จากเรือดในยุงลายบ้านโดยวิธี Fluorescence *in situ* hybridizations (FISH)

สมมติฐาน (Hypothesis)

ยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ที่ได้รับการส่งถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จากเรือดโดยวิธี direct microinjection จะมีสมรรถนะในการปรับตัวให้มีชีวิตอยู่ในธรรมชาติแตกต่างจากยุงลายบ้านที่ปลอดเชื้อ และถ่ายทอดการติดเชื้อสู่ลูกหลานได้

สามารถแสดงให้เห็นการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในเซลล์ของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ได้โดยวิธี Fluorescence *in situ* hybridizations (FISH)

กรอบแนวความคิดในงานวิจัย (Conceptual Framework)



คำสำคัญ (Key Words)

Cytoplasmic incompatibility (CI), Fitness cost, *Aedes aegypti*, *Cimex hemipterus* and *Wolbachia*

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

CI (Cytoplasmic Incompatibility) คือ ปรากฏการณ์การไม่เข้ากันของ cytoplasm ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงเพศผู้ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* กับแมลงเพศเมียที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ทำให้เกิดความผิดปกติของลูกหลาน เช่น ตัวอ่อนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และตายในที่สุด หรือเกิดความพิการ

Fitness cost คือ ความสามารถในการอยู่รอด (survival) และ/หรือสมรรถนะในการแข่งขันสืบพันธุ์ (reproduction) เพื่อส่งถ่ายยีนไปสู่รุ่นต่อไป ซึ่งจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาตัวเองให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดในธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้

Aedes aegypti คือ ยุงลายบ้าน (Mosquitoes) จัดอยู่ใน kingdom *Animalia*, phylum *Arthropoda*, class *Insecta*, order *Diptera*, family *Culicidae* และ genus *Aedes* จัดเป็นยุงพาหะนำโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์ชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะโรคไข้เลือดออก มีวงจรชีวิตแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ ไข่ ลูกน้ำ ตัวโม่งและตัวเต็มวัย รวมแต่ละระยะของการเจริญมักจะกินเวลาประมาณ 7-10 วัน

Cimex hemipterus คือ เรือดเป็นปรสิตภายนอกร่างกายที่ดำรงชีวิตอยู่ได้ด้วยการดูดเลือดของโฮสต์ ดังเช่น นก ค้างคาวและมนุษย์ ซึ่งไม่ถือเป็นพาหะของโรค โดยถูกจัดอยู่ใน family *Cimicidae*

Wolbachia คือ แบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacillus) ชนิดหนึ่ง ซึ่งดำรงชีวิตโดยจำเป็นต้องอาศัยอยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (host) ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปได้ และถ่ายทอดลักษณะผ่านทางแม่เท่านั้น พบในสัตว์ขาปล้อง (arthropods) และ filarial nematodes พบครั้งแรกในยุง *Culex pipiens* สามารถทำให้เกิดความแตกต่างด้านการผสมพันธุ์ของ host

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำผลการเปรียบเทียบสมรรถนะของยุงลายบ้าน *Aedes aegypti* ที่ได้รับการส่งถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จากเรือดโดยวิธี direct microinjection ไปเป็นข้อมูลมาประยุกต์เป็นยุทธวิธีในการควบคุมและแทนที่ประชากร (Population replacement and repression) ประชากรยุงพาหะเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันการเป็นพาหะนำโรคของยุง (disease-blocking transgenes) โดยมี *Wolbachia* เป็นพาหนะ (Vehicle) ในการขับเคลื่อนยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสม

2. เป็นข้อมูลสำหรับโครงการวิจัยอื่นต่อไปในการศึกษาทดลองเปรียบเทียบการแข่งขันความสามารถในการแข่งขันผสมพันธุ์ของตัวอสุจิจากยุงที่ติดเชื้อกับยุงตามธรรมชาติได้ ในการควบคุมทางพันธุกรรมของยุงลายบ้าน พาหะของ *Arbovirus* ที่สำคัญในอนาคต

ข้อจำกัดของการวิจัย

1. ในการทดลองทำ PCR จำเป็นต้องทำการทดลองซ้ำ จึงจะปรากฏแถบบนอะกาโรสเจลที่จำเพาะต่อ DNA ของเชื้อแบคทีเรีย อาจเนื่องมาจากมีการถ่ายทอดการติดเชื้อปริมาณน้อยในแต่ละรุ่น จึงทำให้เสียเวลาในการยืนยันผลการทดลอง

2. การดูสไลด์ด้วยกล้อง Fluorescence และ/หรือ confocal microscope ของการทดลอง Fluorescence *in situ* Hybridization ต้องอาศัยประสบการณ์อย่างมากเพื่อยืนยันผลบวกจริง

3. ในการนับปริมาณอสุจิของยุงลายบ้านเพศผู้ จำเป็นต้องใช้สไลด์ที่ได้มาตรฐาน เพื่อให้ได้ปริมาณที่ใกล้เคียงกับปริมาณที่มีอยู่จริงในอัณฑะของยุงมากที่สุด

4. นอกจากนี้การนับอสุจิของยุงต้องใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงต่อสไลด์หรือมากกว่านั้นอาจทำให้เสียเวลาในการนับ