รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและนิเวศวิทยาที่มีต่อความหลากหลาย การกระจายตัว ช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตและอัตราการอยู่รอดของยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

Effects of climate and ecological changes to biodiversity, distribution, development time and survival rate of *Wolbachia*-infected and uninfected *Aedes albopictus*

รศ.ดร.อำมร อินทร์สังข์

รศ.ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร

ดร.จรงค์ศักดิ์ พุมนวน

ดร.อิศนันท์ วิวัฒนรัตนบุตร

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2559

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ **การศึกษาผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและนิเวศวิทยาที่มีต่อความหลากหลาย การกระจายตัว ช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตและอัตราการอยู่รอดของยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia***

แหล่งเงิน เงินงบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปีงบประมาณ 2559 **จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน** 482,100 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี **ตั้งแต่** 1 ตุลาคม 2558 **ถึง** 30 กันยายน 2559

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ดร.อำมร อินทร์สังข์ ตำแหน่งวิชาการ รองศาสตราจารย์
ดร.อิศนันท์ วิวัฒนรัตนบุตร

ผู้ร่วมโครงการวิจัย ดร.จรงค์ศักดิ์ พุมนวน ตำแหน่งวิชาการ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการขั้นสูง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ดร.นพ.เผด็จ สิริยะเสถียร รองศาสตราจารย์ คณะแพทย์ศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

สถานการณ์โรคไข้เลือดออกในประเทศไทย มีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปีตามสถานการณ์เปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศหรือภาวะโลกร้อนที่เกิดขึ้น และนำไปสู่การระบาดของแมลงที่มากขึ้น ไข้เลือดออกมียุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ซึ่งสามารถพบได้ตามบ้านเรือน ทั่วไปโดยเฉพาะในเขตเมืองและยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ที่พบได้ทั่วไปในเขตบ้านในเมือง ชนบท และในป่า และในที่นี้เชื้อแบคทีเรีย Wolbachia ที่มักอาศัยอยู่ร่วมกัน (endosymbionts) ในสัตว์ขาปล้องโดยเฉพาะในยุง ก็มีบทบาทสำคัญในพฤติกรรมต่างๆ ของยุงโดยเฉพาะอันตรายรอดชีวิต จากการศึกษาประชากรที่เกิดจากยุงลายสวน ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและนิเวศวิทยาที่มีต่อความหลากหลายกระจายตัวของยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) และการติดเชื้อ Wolbachia ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย พบว่าความหนาแน่นของยุงลายสวน จะมีความหนาแน่นมากในฤดูฝนเนื่องจากมีแหล่งน้ำต่างๆ เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุง และพบมากในจังหวัดทางภาคตะวันออก คือ ระยอง และภาคใต้ คือ สงขลา ที่มีสวนยางกระจายหนาแน่น การติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia ในยุงพบการติดเชื้อ 15.33% ในการศึกษาเทคนิค PCR พบการติดเชื้อทั้งชนิด Super group A, Super group B และ Super group A+B โดยมีขนาด Super group A และ Super group B คือ 550 และ 450 bp เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ มีลำดับของยีน wsp มีความยาวขนาด 572 และ 442 bp และได้มีการขอขึ้นเลขทะเบียนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) คือ KY817476-KY817484 และ KY817485-KY817494 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจพบเชื้อ Wolbachia กับจำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกแล้วพบว่ากรุงเทพมหานครพบผู้ป่วยมีมากในฤดูหนาว และจังหวัดสงขลาพบมากในฤดูฝน โดยจะพบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ Wolbachia ในยุง ในฤดูฝนสูงกว่าในฤดูร้อน

คำสำคัญ : ไข้เลือดออก การเปลี่ยนแปลงสภาวะอากาศโลก ประชากรยุง ฤดูกาล การติดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

Research Title: **Effects of climate and ecological changes to biodiversity, distribution, development time and survival rate of *Wolbachia*-infected and uninfected *Aedes albopictus***

Researcher: Ammorn Insung Itsanun Wiwatanaratanabutr and Jarongsak Pumnuan
Faculty of Agricultural Technology
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
And Padet Siriyasatien Faculty of medicine Chulalongkorn University

ABSTRACT

Dengue fever incidence in Thailand tends to be higher appearance accordingly to the critical of global change or global warming situation bringing to the outbreak of many insect species. Dengue fever causes by virus when *Aedes aegypti* occurring especially in downtown and *Aedes albopictus* abundantly appearing in rural area or forestry ecology, playing as vectors. The bacteria, wolbachia is living as endosymbiont in many arthropod species particularly in mosquito. It affects to the activities or behaviors of insect, especially the effect on survival rate. A survey study of *Aedes albopictus* population and wolbachia infection influenced by global and ecological changes in some area parts of Thailand was performed. The result presented that *Aedes albopictus* abundantly distributed in raining season due to having appropriately reproductive area, particularly found in eastern part as Rayong and southern part as Songkhla provinces wherever rubber tree planted windy. Wolbachia infection at 15.33% was found and by using PCR technique revealed that there were super group A, super group B and super group A+B when super group A and B showed the molecular weight of 550 and 450 bp, respectively. Nucleotide sequencing of wsp gene revealed 572 and 442 bp with the accession number of KY817476-KY817484 and KY817485-KY817494 , respectively. A high number of dengue fever patient in Bangkok was found in cool season when Songkhla province found in raining season. Besides, wolbachia infestation percentage mostly occurred in raining season rather than hot season.

Keywords: dengue, global change, mosquito population, seasoning, infection

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
อำมร อินทร์สังข์ และ คณะ

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน เงินงบประมาณ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

อำมร อินทร์สังข์ และคณะ
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... **iii**
กิตติกรรมประกาศ iv
สารบัญ v
บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 การดำเนินงาน 5
บทที่ 3 ผลการการทดลอง 16
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลอง 35
บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินงาน 37
เอกสารอ้างอิง 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

สภาวะโลกร้อน (Global warming) ได้ส่งผลกระทบต่อโลกเรามากมายหลายประการสิ่งที่เห็นเด่นชัดที่สุดคือการที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตบนโลกโดยตรง รวมทั้งการกลายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตซึ่งในเรื่องนี้ยังไม่มีการศึกษาที่เป็นรูปธรรมมากนัก เนื่องจากการกลายพันธุ์หรือกระบวนการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ย่อมอาศัยระยะเวลาที่ทำงานอันยาวนาน แต่สิ่งหนึ่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นมากและเป็นผลของสภาวะโลกร้อนคือวิวัฒนาการของเชื้อโรคบางชนิดที่เป็นปัญหาอยู่ในปัจจุบันเฉพาะโรคต่างๆ ที่เกิดจากเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย ซึ่งในปัจจุบันเราสามารถพบเชื้อโรคชนิดใหม่ๆ มากมายไม่ว่าจะเป็นโรคเอดส์ ซาร์ ไข้หวัดนก ถึงแม้ว่าจะไม่มีหลักฐานที่พิสูจน์ได้อย่างแน่ชัดว่าโรคเหล่านี้เกิดขึ้นเพราะการเปลี่ยนแปลงจากสภาวะโลกร้อน แต่การเปลี่ยนแปลงไปของระบบนิเวศทำให้สิ่งมีชีวิตมีการปรับตัวและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นได้ เช่นการเปลี่ยนแปลงชีวิตของยุงที่ทำให้เกิดการระบาดของไข้เลือดออก ไข้ซิกาและไข้ชิคุนกุนยากขึ้น หรือการที่อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ทำให้แบคทีเรียสามารถแบ่งตัวของเชื้อก่อโรคมากขึ้น เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อแบคทีเรียมากขึ้นด้วย ตัวอย่างหนึ่งที่เห็นได้ชัดคือสมัยก่อนพบว่ายุงลายออกหากินเฉพาะกลางวัน แต่ปัจจุบันยุงลายออกหากินทั้งกลางวันและกลางคืน สำหรับสาเหตุนั้นนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าเป็นเพราะสภาพอากาศมีการเปลี่ยนแปลง ตอนเย็นอากาศอุ่นและร้อนขึ้น รวมทั้งปริมาณ CO_2 และอุณหภูมิด้วย ซึ่งเป็นภาพค่อนข้างชัดว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงเพราะมีผลกระทบจากสภาวะโลกร้อนด้วย

การแพร่ระบาดของโรคไข้เลือดออก รวมถึงโรคติดเชื้ออื่นๆ ที่มียุงเป็นพาหะนำโรคในประเทศไทยเป็นที่มาของการวิจัยที่ต้องการศึกษาในโครงการนี้ ซึ่งจากการระบาดของโรคไข้เลือดออกในประเทศไทยที่ผ่านมา สถานการณ์ของโรคมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ไข้เลือดออกมียุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ซึ่งสามารถพบได้ตามบ้านเรือนทั่วไปและมักพบในเขตเมือง และยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ที่สามารถพบได้ทั่วไปในเขตชานเมือง ชนบทและในป่าเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ ยุงลายทั้งสองชนิดนี้จะพบได้มากในแถบประเทศเขตร้อนและอบอุ่น (Gould and Higgs, 2009) ซึ่งเหมาะต่อการแพร่พันธุ์และการขยายพันธุ์ของยุงพาหะนำโรคหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) อย่างไรก็ตาม คำตอบของคำถามที่ว่า ทำไมถึงเกิดการระบาดของโรคไข้เลือดออกรวมถึงโรคติดเชื้ออื่นๆ ที่มียุงเป็นพาหะนำโรคในบริเวณบางจังหวัดในประเทศไทยเท่านั้น จะเป็นเพียงเพราะสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงไป (Climate changes) และแตกต่างจากบริเวณอื่นๆเท่านั้น หรืออาจเป็นเพราะมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อม (Environmental factors) อื่นๆ เช่น ปริมาณความหนาแน่นหรือความชุกชุมของลูกน้ำยุงตามที่ต่างๆ ซึ่งทำให้เกิดการระบาดของโรค มีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมอื่นๆ มาเกี่ยวข้อง จะมีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อโรคและจะมีผลต่อพฤติกรรมต่างๆ ของยุงพาหะ เช่น พฤติกรรมการวางไข่ พฤติกรรมการผสมพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมถึงวงจรชีวิตของยุงพาหะนำโรคหรือไม่ นอกจากนี้แล้วมีการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางสภาพแวดล้อมใดที่มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโรคภายในตัวยุงพาหะเป็นต้น

สำหรับประเทศไทยที่อยู่ในบริเวณเขตร้อน จะสามารถพบการแพร่พันธุ์ของยุงพาหะนำโรคได้ทุกภูมิภาคของประเทศ แต่จากสถานการณ์บางครั้ง เช่น การระบาดของโรคชิคุนกุนยา พบว่ามีการระบาดเฉพาะทางภาคใต้เท่านั้น จึงเป็นที่น่าสนใจว่าแม้จะภายในประเทศเดียวกัน แต่การแพร่กระจายและการระบาดของโรคกลับแตกต่างกัน ฉะนั้นน่าจะมีปัจจัยที่สำคัญอื่นๆ อีกเช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณน้ำฝน และแสงสว่าง เป็นต้น ที่ส่งผลให้ยุงลายในท้องถิ่นหนึ่งมีการแพร่พันธุ์มากกว่าอีกท้องถิ่นหนึ่ง ซึ่งจนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาเรื่องผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและสภาวะโลกร้อน ที่มีต่อยุงพาหะนำโรคติดเชื้อต่างๆ ที่พบได้ในประเทศไทย แม้กระทั่งในต่างประเทศ ก็มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาเรื่องดังกล่าวจำนวนไม่มากนักผลกระทบที่เกิดจากสภาวะโลกร้อนต่อสิ่งมีชีวิตนั้นมีอยู่มากมาย แต่ปัจจัยสำคัญที่เกิดจากสภาวะแวดล้อมคือการปรับตัวของเชื้อโรคที่ต้องการดำรงชีวิตอยู่ในสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลง ก็ย่อมทำให้เกิดแนวโน้มและความเป็นไปได้ของการกลายพันธุ์ที่น่าจะมีมากขึ้นในอนาคต ดังนั้นสภาวะโลกร้อนสามารถก่อให้เกิดผลกระทบครั้งใหญ่ต่อโลกและสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จึงจัดได้ว่าสภาวะโลกร้อน (Global warming) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและสภาพแวดล้อม (Climate and environmental changes) เป็นปัญหาที่สำคัญของทุกคนในทุกประเทศทั่วโลกที่ต้องช่วยกันแก้ไขโดยเร็วที่สุด

บนโลกนี้มียุงมากกว่า 4,000 ชนิด จัดอยู่ใน Class Insecta, Order Diptera, Family Culicidae ยุงบางชนิดเป็นพาหะนำโรคมาสู่คนและสัตว์ เช่น ยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) และยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) นำโรคไข้เลือดออก (Dengue haemorrhagic fever) ไข้เหลือง (Yellow fever) และไข้ชิคุนกุนยา (Chikungunya fever) ยุงก้นปล่องนำโรคมาลาเลีย (Malaria) ยุงเสือนำโรคฟีลาเรียซีส (Filariasis) หรือ โรคเท้าช้าง เป็นต้น โรคที่กล่าวมานี้จะเกิดในคน ส่วนในสัตว์นั้นยุงก็มีความสำคัญมากเช่นกัน เนื่องจากเป็นตัวนำโรคต่างๆ หลายชนิดในสัตว์ เช่น ยุงรำคาญบางชนิด นำโรคพยาธิหัวใจสุนัข มาลาเรียในนก ยุงบางชนิดกัดวัว ทำให้น้ำหนักวัวลดลงและผลิตนมได้น้อยลง นอกจากเป็นอันตรายต่อคนและสัตว์เลือดอุ่นแล้ว ยุงยังเป็นอันตรายต่อสัตว์เลือดเย็นอีกด้วย (Paupy et.al., 2009) สำหรับยุงลาย จะมีวงจรชีวิตและการเจริญเติบโตเป็นแบบสมบูรณ์ (Complete metamorphosis) เช่นเดียวกับยุงชนิดอื่นๆ สำหรับในธรรมชาติ ยุงตัวเมียจะมีอายุขัยนานกว่าตัวผู้ ตัวเมียจะอยู่ได้ประมาณ 1 เดือน ส่วนตัวผู้จะอยู่ได้ประมาณ 2 สัปดาห์ถึง 1 เดือน ในการผสมพันธุ์แต่ละครั้งนั้น ตัวเมียจะเก็บน้ำเชื้อตัวผู้ไว้ได้ ดังนั้นยุงตัวเมียจึงต้องการผสมพันธุ์แค่ครั้งเดียว ในขณะที่ตัวผู้สามารถผสมพันธุ์ได้หลายครั้ง (Paupy et al., 2009)

ยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) หรือ Asian Tiger mosquito จัดเป็นยุงลายพาหะนำโรคที่สามารถพบได้ทั่วไปทุกหนแห่งในทุกทวีปบนโลก โดยเฉพาะในทวีปเอเชียซึ่งเป็นจุดกำเนิดของยุงลายพาหะชนิดนี้ ตัวเต็มวัยของยุงลายสวนชนิดนี้ มีลักษณะคล้ายกับยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) มาก แต่จะต่างกันที่เกล็ดสีขาวบนด้านหลังของอกไม่เป็นรูปเคียว เป็นเส้นตรงเส้นเดียวพาดตามยาวตรงกลางและมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกล็ดสีดำที่รยางค์ปาก ที่สำคัญคือสามารถบินไปได้ไกลกว่ายุงลายบ้านมาก เป็นยุงพาหะที่สำคัญชนิดหนึ่งในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya virus, CHIKV) ไปสู่มนุษย์ในหลายประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศในแถบมหาสมุทรอินเดีย ประเทศในทวีปแอฟริกากลาง ประเทศในทวีปยุโรปและทวีปเอเชีย รวมถึงประเทศไทยด้วย (Pardigon, 2009) นอกจากเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาแล้ว ยังมีสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก (Microorganisms) อื่นๆ อีกหลายชนิด ที่มีรายงานว่าอาศัยอยู่ร่วมกัน (Endosymbiosis) กับยุงลายสวนชนิดนี้ เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ซึ่งโดยธรรมชาติแล้ว ยุงลายสวน *Ae.albopictus* จะติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* รวมสองสายพันธุ์คือ A และ B และสามารถพบการติดเชื้อนี้ได้ทั่วไปในประชากรยุงที่พบในธรรมชาติ (Wiwatanaratanabutr et al., 2009) เมื่อเร็วๆ นี้ มีรายงานว่า พบการติดเชื้อร่วมกัน ระหว่างเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาและเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงลายสวน *Ae. albopictus* ตัวเดียวกัน และที่สำคัญคือ จากการศึกษาวิจัยดังกล่าวพบว่าในยุงลายตัวเมียที่ติดเชื้อทั้งสองชนิดจะมีปริมาณและความหนาแน่นของแบคทีเรีย *Wolbachia* ลดลงไปจากเดิมเล็กน้อย (Tortosa et al. 2008)

การศึกษาเรื่องผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและภาวะโลกร้อนที่มีต่อยุงพาหะนำโรคที่พบในปัจจุบัน ยังไม่ได้รับการศึกษาเท่าที่ควร แต่ก็มีรายงานเรื่องดังกล่าวอยู่บ้าง Benitez (2009) รายงานว่า สภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงทำให้สถานการณ์การระบาดของโรคติดเชื้อที่มียุงเป็นพาหะนำโรค เช่น โรคชิคุนกุนยา ที่กำลังระบาดอยู่ในทวีปเอเชียขณะนี้ มีความเลวร้ายลงไปกว่าเดิมและมีความรุนแรงที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับในทวีปยุโรป ที่เริ่มมีการศึกษาเรื่องดังกล่าวข้างต้นกันอย่างจริงจัง (Semenza and Menne, 2009) สำหรับในประเทศไทยยังไม่เคยได้รับการศึกษามาก่อน สภาพอากาศ (Climate) เป็นปัจจัยหลักประการหนึ่งที่สำคัญต่อ 1) การกระจายตัวของยุงพาหะในแต่ละสภาพภูมิศาสตร์ 2) ลักษณะวงจรชีวิตของยุงพาหะ 3) ลักษณะการกระจายตัวของเชื้อไวรัส 4) วิวัฒนาการของเชื้อไวรัส และ 5) ประสิทธิภาพของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากตัวยุงพาหะไปสู่มนุษย์หรือสัตว์ให้อาศัยอื่นๆ (Gould and Higgs, 2009) มีปัจจัยอื่นๆ อีกหลายประการ ที่มีบทบาทต่อการแพร่กระจายและการระบาดของโรคติดเชื้อต่างๆ ที่นำโดยยุงพาหะนำโรคชนิดต่างๆ ได้แก่ ระดับความเจริญทางสังคมและเศรษฐกิจ การขนส่งและการคมนาคมต่างๆ การตัดไม้ทำลายป่า จำนวนประชากรของมนุษย์และยุงพาหะที่เพิ่มขึ้น ความแออัดของการอยู่อาศัยของประชากร และการอพยพเข้า-ออกของมนุษย์ไปยังพื้นที่ต่างๆ เป็นต้น (Gould and Higgs, 2009)

แบคทีเรีย *Wolbachia* จัดเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อริคเกตเซีย (*Rickettsia*-like bacteria) และจัดอยู่ในกลุ่มของ Alpha-Proteobacteria แบคทีเรีย *Wolbachia* อาศัยอยู่ร่วมกัน (Endosymbionts) ภายในเซลล์ส่วนต่างๆ ของสัตว์ให้อาศัย ซึ่งเป็นกลุ่มของสัตว์ขาปล้อง (Arthropods) และหนอนตัวกลม (Filarial nematode) โดยจะพบมากบริเวณเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ (Reproductive tissues) ของสัตว์ให้อาศัยดังกล่าว (Wiwatanaratanabutr, 2013a,b) มีรายงานว่าพบการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มากที่สุดในแมลง โดยเฉพาะในยุงลายพาหะ ซึ่งการติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ส่งผลถึงพฤติกรรมของยุงลายพาหะในด้านต่างๆ เช่น พฤติกรรมการวางไข่ (Oviposition behavior) พฤติกรรมการหาโฮสต์ (Host-seeking behavior) และพฤติกรรมการผสมพันธุ์ (Mating behavior) ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยุงพาหะอีกด้วย (Wiwatanaratanabutr et al., 2010) การแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* จะถ่ายทอดผ่านทางระบบสืบพันธุ์จากแม่ไปสู่ลูก สามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติทางระบบสืบพันธุ์ในสัตว์ให้อาศัยได้หลายรูปแบบ ที่สำคัญคือปรากฏการณ์การไม่เข้ากันของไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic incompatibility) ในยุงพาหะ กล่าวคือเมื่อมีการผสมพันธุ์กันระหว่างตัวผู้ที่ติดเชื้อกับตัวเมียที่ปลอดเชื้อ ตัวอ่อนที่เกิดจากการผสมพันธุ์จะมีพัฒนาการที่ผิดปกติหรืออาจจะไม่เจริญและตายไปในที่สุด การติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ สามารถพบได้ในทุกๆ ระยะการเจริญเติบโตของยุงพาหะ ได้แก่ ระยะลูกน้ำ (Larva) ระยะตัวโม่ง (Pupa) และระยะตัวเต็มวัย (Adult) ซึ่งจะมีปริมาณการติดเชื้อที่แตกต่างกัน ซึ่งในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกกำลังมีความสนใจที่จะใช้แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นเสมือนตัวพาหะนำพายีนต้านเชื้อก่อโรคเข้าไปสู่ในแมลงพาหะ ยุงลายพาหะนำโรคติดเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ แทนที่พลาสมิด (Plasmid) เพราะแบคทีเรีย *Wolbachia* สามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกรุ่นต่อไปได้อย่างต่อเนื่อง ถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาเรื่องผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและนิเวศวิทยาที่มีต่อความหลากหลาย การกระจายตัว ช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโต และอัตราการอยู่รอดของยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ทั้งหมดข้างต้นจึงเป็นความสำคัญและที่มาของการวิจัยในโครงการนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1.1. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) รุ่น Veriti บริษัท GenPlus® ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) รุ่น Master Cyclern PROS บริษัทeppendrof® ประเทศเยอรมนี

1.3. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 ℃ รุ่น LG บริษัท LG® ประเทศไทย

1.4. ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 ℃ รุ่น Whirlpool บริษัท Sanyo® ประเทศไทย

1.5. ตู้เย็นอุณหภูมิ -80 ℃ รุ่น Forma 900 series บริษัท Thermo scientific® ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.6. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ Incubator shaker รุ่น Innova® 43 บริษัท eppendrof® ประเทศเยอรมนี

1.7. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Centrifuge 5430 R บริษัท eppendrof® ประเทศเยอรมนี

1.8. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Centrifuge 5417 R บริษัท eppendrof® ประเทศเยอรมนี

1.9. เครื่องไมโครเวฟ, รุ่น LG บริษัท LG ประเทศจีน

1.10. เครื่องเขย่าผสมสาร Vortex รุ่น FINEVORTEX (FinePCR) ประเทศเกาหลี

1.11. เครื่อง Dry bath Incubator บริษัท Cleaver Scientific® ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.12.เครื่อง gel electrophoresis รุ่น Biorad sub-cell® RT บริษัท Bio-Rad® ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.13. เครื่องถ่ายรูป gel documentation รุ่น Gel Doc™ XR บริษัท Bio-Rad® ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.14. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม spectrophotometer รุ่น Nanodrop 2000c บริษัท Thermo scientific® ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.15. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น Sarteriur ประเทศเยอรมนี

1.16. เครื่อง Autoclave (ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ) รุ่น HIRAYAMA HA-3D ประเทศญี่ปุ่น

1.17. เครื่อง Autoclave (ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ) รุ่น HVE-50 ประเทศญี่ปุ่น

1.18. ตู้ปรับอุณหภูมิสำหรับเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย บริษัท Memmert

1.19. ตู้สำหรับเตรียมสาร PCR (PCR cabinet) รุ่น PCR-01 ประเทศไทย

1.20. ไมโครปิเปตขนาด 0.1-10, 2-20, 20-200 และ100-1000 µl บริษัท eppendrof® ประเทศเยอรมนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

2.1. หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml บริษัท ExtraGene, Inc®

2.2. หลอด PCR ขนาด 0.2 ml บริษัท ExtraGene, Inc®

2.3. ปิเปตทิป ขนาด 0.1-10, 200 และ 1000 µl

2.4. หลอด centrifuge ขนาด 15 และ 50 ml

2.5. ปากคีบ (forceps)

2.6. ถุงมือยาง

2.7. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)

2.8. Loop เขี่ยเชื้อและ spreader

2.9. ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.10. ขวดแก้วสำหรับเตรียมสารเคมี ขนาด 100, 500 และ 1000 ml

2.11. กล่องโฟมสำหรับใส่น้ำแข็ง

2.12. นาฬิกาจับเวลา

2.13. หยอดหยด (dropper)

2.14. พาราฟิล์ม (parafilm)

2.15. กระดาษทิชชูสำหรับทำความสะอาด

3.สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

3.1. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อสำเร็จรูป (Invisorb® Spin Tissue Mini Kit บริษัท STRASTEC Molecular GmbH ประเทศเทศเยอรมนี)

3.2. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Invisorb® Spin Plasmid Mini Two บริษัท STRASTEC Molecular GmbH ประเทศเทศเยอรมนี)

3.3. ชุดโคลนสำหรับ PCR product บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4. ชุดสารเคมีในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR บริษัท Bioline ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.5. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria-bertani (LB medium)

3.6. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร SOB และ SOC medium

3.7. สารเคมีสำหรับเตรียม competent cell

3.8. สารเคมีสำหรับเตรียม gel electrophoresis

3.9. Ethanol ความเข้มข้น 70% และ 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1.โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9 เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) และอ่านกราฟ chromatogram จากผล sequencingและสามารถวิเคราะห์ความเหมือนและความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยแสดงค่าออกเป็นค่า sequence identity matrix

4.2.โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 (MEGA 6.0) เป็นโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

4.3.โปรแกรม nucleotide blast (BLASTN) เป็นโปรแกรมออนไลน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งจะเทียบกับลำดับนิวโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล genbank

4.4.โปรแกรม BankIt เป็นโปรแกรมออนไลน์ที่ใช้สำหรับส่งลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อขอเลขทะเบียน (accession number) เพื่อเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

การเก็บตัวอย่างยุงที่พบอยู่ตามธรรมชาติ

ศึกษาสภาพอากาศและสภาพแวดล้อมของแหล่งที่พบการระบาดของยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ในประเทศไทย จากนั้นออกปฏิบัติการภาคสนามเพื่อเก็บตัวอย่างยุงพาหะนำโรคแบบสุ่มตัวอย่าง ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งอาจติดเชื้อหรือไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในพื้นที่ที่มีการระบาด (Infected area) ของยุงลายสวนจาก 5 ภูมิภาค ได้แก่ ภาคเหนือ (จ.แพร่) ภาคใต้ (จ.สงขลา) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จ.นครราชสีมา) ภาคกลาง (กรุงเทพมหานคร) และภาคตะวันออก (จ.ระยอง) เพื่อใช้ประชากรยุงจากหลากหลายแหล่งดังกล่าวมาเปรียบเทียบกัน โดยทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 ครั้ง ในฤดูหนาว (เดือนมกราคม) ฤดูร้อน (เดือนเมษายน) และฤดูฝน (เดือนสิงหาคม) จังหวัดละ 100 ตัวอย่าง นำยุงที่ได้ทั้งหมดไปสกัดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบและยืนยันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A และ B

การสกัดดีเอ็นเอ การตรวจสอบการติดเชื้อ *Wolbachia*

ดีเอ็นเอที่ถูกสกัดได้จากยุงที่เก็บมาจากพื้นที่และฤดูกาลที่ต่างๆ กัน เพื่อใช้ในการยืนยันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยใช้วิธีทางอณูวิทยาใช้ชุด Kit สำเร็จรูปในการสกัดแยกสารพันธุกรรมดังกล่าว จากนั้นใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จะใช้ยุงแต่ละตัวแยกเพศผู้และเพศเมีย โดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องมือที่มีความสะอาดสูง ดีเอ็นเอที่ถูกสกัดมาจะถูกบดในสารละลายบัฟเฟอร์ และใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ 1-2 µl เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Template) ในการทำ PCR ต่อไป

การตรวจการติดเชื้อ *Wolbachia* โดยใช้เทคนิค PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่รู้แน่นอนว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* เป็น Positive control และใช้น้ำกลั่นเป็น Negative control เพื่อตรวจสอบสิ่งเจือปนอื่นๆ สำหรับแบคทีเรีย *Wolbachia* ยีนที่นำมาใช้เรียกว่า *Wolbachia* Outer Surface gene (wsp) ซึ่งสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในประเทศไทยสามารถพบได้ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ A โดยใช้ Forward primer (136AF) และ Reverse primer (691AR) ขณะที่สายพันธุ์ B โดยมี Forward primer (81F) และ Reverse primer (522R)

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอยุงโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปจาก Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (Invitek Gmbh, ประเทศเยอรมนี)

1. ใส่ Lysis buffer G ปริมาตร 200 µl และ proteinase K ปริมาตร 40 µl จากนั้นใช้ไม้บดตัวอย่างยุงจนละเอียด นำไปผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าบนเครื่อง Vortex จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 52 °C ประมาณ 3-5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มแล้ว 3-5 ชั่วโมง ให้นำตัวอย่างมาปั่นตกตะกอนประมาณ 2 นาที ความเร็ว 11,000 rpm

2. ย้ายส่วนใส (supernatant) ใส่ในหลอด microcentrifuge ใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย Binding buffer A ปริมาตร 200 µl (ผสมให้เข้ากันเบาๆ)

3. ย้ายใส่ในหลอดที่มีชุดตัวกรอง (spin filter) บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที จากนั้นปั่นตกด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสที่ปั่นตกทิ้ง

4. ใส่สารละลาย Wash buffer ปริมาตร 550 µl ปั่นล้างด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสที่ปั่นตกทิ้ง (ทำซ้ำในขั้นตอนการปั่นล้างด้วยสารละลาย Wash buffer อีก 1 ครั้ง)

5. ทำการ Didry filter ที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 2 นาทีเพื่อเอา Ethanol ออก

6. ย้ายชุดตัวกรองไปใส่ในหลอด microcentrifuge จากนั้นใส่ elution buffer ปริมาตร 80 µl (ทำการ prewarm elution buffer ที่อุณหภูมิ 52 °C ก่อนนำมาใช้) บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 นาที จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm อีก 1 นาที นำชุดตัวกรองทิ้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนนำดีเอ็นเอไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำสารละลายดีเอ็นเอของยุงที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) โดยเครื่องจะวัดที่ความยาวคลื่น 260 nm (ความยาวคลื่นที่ดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้มากสุด) และความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ จากสูตร

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (µg/ml) = A_{260} x 50 x dilution factor

ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm นำมาเปรียบเทียบกันเพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ สำหรับค่าอัตราส่วน (A_{260}/A_{280} ratio) ต้องอยู่ในช่วงระหว่าง 1.80-2.00 เมื่อวัดค่าดูดแสงแล้วถ้าค่าอัตราส่วน (A_{260}/A_{280} ratio) มีค่าน้อยกว่า 1.80 แสดงว่าตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอมีโปรตีนและฟีนอลปะปนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอ แต่ถ้ามีค่ามากกว่า 2.00 แสดงว่ามีการปนของอาร์เอ็นเอในสารละลายดีเอ็นเอ

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR

เป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของบริเวณยีนที่เราสนใจให้มีจำนวนมากพอที่จะไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้โดยใช้ primer ที่ได้ทำการออกแบบที่มีความจำเพาะ ซึ่งปฏิกิริยาของวิธี PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 1) และใช้สารละลายสัดส่วนที่พอเหมาะ (ตารางที่ 2) โดยปฏิกิริยาเริ่มจากขั้นตอน initial denaturation เพื่อเป็นการแยกสายดีเอ็นเส้นคู่ออกจากกันเพื่อเป็นการกระตุ้นในการเข้าสู่ขั้นตอนการทำ PCR อย่างสมบูรณ์ โดยใช้อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเป็นขั้นตอน denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 30 วินาที ต่อด้วยขั้นตอน annealing ซึ่งใช้อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจะทำให้ primer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 18-30 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน จากนั้นคือขั้นตอน extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5´ ของ primer ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งใช้อุณหภูมิที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที ซึ่งทั้ง 3 ขั้นตอนนี้จะทำซ้ำกันจำนวน 40 รอบ และสุดท้ายคือขั้นตอน final extension จะใช้อุณหภูมิที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้วนำไปตรวจสอบดู PCR product โดยวิธี gel electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบ PCR product โดยวิธี gel electrophoresis

เตรียมแผ่นเจลสำหรับใช้ในการรันดีเอ็นเอโดยใช้วุ้น Agarose ความเข้มข้น 1.5 % ละลายด้วย 1X TAE Buffer ตามปริมาตรของถาดวุ้นจากนั้นนำไปอบในตู้อบไมโครเวฟเป็นเวลา 3 นาที ที่กำลัง 600 วัตต์ เขย่าเรื่อย ๆ เพื่อให้ผงวุ้นละลายจนใส เทสารละลายวุ้นใส่ในถาดแม่แบบที่มีซี่ฟันสำหรับการรัน gel electrophoresis นำวุ้นที่แข็งตัวแล้วใส่ในอ่างเครื่องรันเจลที่มี 1X TAE Buffer อยู่แล้ว จากนั้นนำ PCR product ที่ผสมกับ 6X loading buffer หยอดลงในช่องวุ้นจนครบทุกตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงใส่ negative control, positive control และ DNA marker ขนาด 100 bp ลงในช่องวุ้นที่เหลือตามลำดับ โดยการวิธี gel electrophoresis นี้รันเจลด้วยไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 2–3 ครั้ง นำเจลที่ได้เข้าเครื่องถ่ายภาพเจลด้วยรังสีอัลตร้าไวโอเลต (gel documentation) ปรับภาพให้เหมาะสมแล้วบันทึกภาพเจล

ตารางที่ 1 แสดงขั้นตอน PCR (Thermal cycle condition) ในการเพิ่มจำนวนยีน wsp

ขั้นตอน PCR	**อุณหภูมิ(°C)**	**เวลา(นาที)**	**จำนวนรอบ(cycle)**
1. Initial denaturation	95	3	1
2. PCR step			
- Denaturation	95	30 วินาที	40
- Annealing	50	30 วินาที	
- extension	72	30 วินาที	
3. Final extension	72	7	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนยีน wsp

สารส่วนประกอบ	ปริมาตรสาร(µl)
10X PCR Buffer	2.5
25 mM $MgCl_2$	2.5
2 mM dNTPs	2.5
Primer F (10 µM)	0.4
Primer R (10 µM)	0.4
Taq polymerase (5U/µl)	0.2
DNA template (50-100 ng/µl)	5
ddH_2O	11.5
รวม	25

ขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ (DNA ligation)

เมื่อเพิ่มจำนวนยีนที่เราสนใจด้วยวิธี PCR แล้วจะนำยีนที่สนใจมาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ (vector) ชนิด plasmid เรียกว่าขั้นตอน DNA ligation โดยใช้ pGEM®-T Easy (Promega® ประเทศสหรัฐอเมริกา) เป็น vector มีลักษณะเป็นพลาสมิดเวคเตอร์เส้นตรง (linearized vector) ซึ่งมีปลายเป็นเบส T (Thymine) ติดที่ปลาย 3´OH ของทั้ง 2 ข้าง เรียกว่า T-overhang (ระบบ TA Cloning) จากในขั้นตอน PCR เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเอนไซม์ *Tag* polymerase จะมีการเติมเบส A (adenine) บริเวณด้านปลาย 3´ เพราะฉะนั้นเมื่อทำการ ligation โดยเอนไซม์ ligase ส่วนปลายของ vector ที่มีเบส T จะสามารถเชื่อมต่อกับเบส A ของ PCR product ได้ ซึ่งจะเรียกว่า ดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA)

ในขั้นตอนการทำ ligation ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 3 เมื่อผสมเรียบร้อยแล้วจึงตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C ประมาณ 12-16 ชั่วโมง ซึ่งจะสามารถเพิ่มปริมาณของ transformed cell ให้มีจำนวนมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงส่วนประกอบของสารส่วนประกอบในขั้นตอน DNA ligation

สารส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
2x Rapid ligation buffer	2.5
pGEM® T easy vector (50 ng/µl)	0.5
T4 ligase enzyme (5 U/µl)	0.5
PCR product (50 ng/µl)	1.5
รวม	10

ขั้นตอน Transformation ในการนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell โดยวิธีกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock)

นำแบคทีเรีย competent cell มาแช่ในน้ำแข็งรอให้ละลาย จากนั้นค่อยๆ ดูด competent cell ปริมาตร 50 µl ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมอยู่แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเกาะที่ permeable site บริเวณผนังเซลล์ของ competent cell หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสมถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell โดยกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 ^{O}C นานเป็นเวลา 50 วินาที แล้วรีบนำกลับไปแช่ในน้ำแข็งทันที โดยทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที เมื่อครบเวลาแล้วให้เติมอาหารเหลว SOC medium หลอดละ 950 µl จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 rpm ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C นานประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการตกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ 3,500 rpm อุณหภูมิ 25 ^{O}C เป็นเวลา 4 นาที เมื่อใกล้ถึงเวลาให้นำ LB agar ที่มียา Ampicillin 100 µg/ml มาใส่ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) ปริมาตร 40 µl และ Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG) ปริมาตร 40 µl โดยผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว spread ให้ทั่วจนแห้งแล้วนำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เมื่อครบเวลาบ่มเชื้อ 1 ชั่งโมงแล้วจึงนำเชื้อที่เลี้ยงได้มาดูดจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดแล้ว spread ให้ทั่ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C ประมาณ 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูลักษณะ colony สีฟ้า-สีขาวเพื่อคัดเลือก colony สีขาวเพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนยีน wsp *โดยวิธี Colony PCR*

พลาสมิดชนิด pGEM®-T Easy vector มียีนที่ให้ลักษณะที่ต้านต่อยา Ampicillin ดังนั้น เซลล์ของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดนี้จะสามารถเจริญบนอาหารชนิดแข็ง LB agar ที่มียา Ampicillin ได้ จึงสามารถคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมออกจากเซลล์แบคทีเรียชนิดอื่นที่อาจปนเปื้อนได้ และคุณสมบัติของพลาสมิดมียีน *lacZ* ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ β–galactosidase ที่สามารถย่อยสาร X-gal ซึ่งจะทำให้โคโลนีแบคทีเรียมีสีฟ้า เมื่อส่วนของยีนที่เราศึกษาคือยีน wsp สามารถแทรกเข้าไปในส่วนของยีน *lacZ* บริเวณ clone insert ส่วนของยีน *lacZ* นั้นจึงแยกออกจากกัน ยีน *lacZ* จึงไม่สามารถทำงานได้ทำให้ไม่มีการสร้างเอนไซม์ β–galactosidase มาย่อย X-gal ได้ โคโลนีของแบคทีเรียที่ได้จะมีสีขาว ด้วยเทคนิคนี้จึงสามารถตรวจสอบแยกโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน wsp ออกจากเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มียีน wsp ได้

ทำการเลือกโคโลนีที่มีสีขาวในแต่ละตัวอย่าง เนื่องจากอาจจะมีชิ้นส่วนของยีนที่เราสนใจโดยเลือกหลายๆ colony ประมาณ 3-5 colony ต่อ 1 plate มาตรวจสอบโคลนด้วยวิธี Colony PCR โดยเตรียมส่วนประกอบในขั้นตอน PCR ซึ่งสารที่ใช้ในปฏิกิริยาและสภาวะ PCR ที่เหมาะสมใช้เหมือนในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนยีน wsp ที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันจิ้ม colony ที่เลือกไว้ใส่ในหลอด PCR ที่มี master mix ของ PCR อยู่ ผสมให้เข้ากันแล้วขีดลงบน plate ต้นแบบ (master plate) จากนั้นเมื่อทำ PCR เสร็จแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1.5 % เพื่อดูว่ามีชิ้นส่วนของยีนที่เราสนใจหรือไม่ แล้วเลือกแถบของดีเอ็นเอที่เข้มและชัดที่สุด ส่วน master plate นั้นนำไปบ่มที่ 37 $^{\circ}$C เพื่อรอนำ colony ที่ให้ผลโคลนที่ Positive จากวิธี colony PCR ไปเตรียมเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB-broth ใส่หลอดขนาด 15 ml ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 ml และใส่ยา Ampicillin 3 µg/ml ปริมาตร 3 µl และนำไม้จิ้มฟันจิ้มเชื้อจาก master plate ที่ให้ผลโคลนที่มีชิ้นส่วนยีน wsp ลงใน LB-broth ที่เตรียมไว้ โดย LB-broth ที่มีไม้จิ้มฟันอยู่นำไปบ่มที่ 37 $^{\circ}$C โดยเขย่าความเร็วรอบ 160 rpm ประมาณ 12-16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำไปใช้ในขั้นตอนการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของบริษัท Invisorb® Spin Plasmid Mini Two (Invitek Gmbh, ประเทศเยอรมนี)

1. ก่อนการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอนำเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอที่เราเลี้ยงไว้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เวลาประมาณ 2 นาที เทส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง (ปั่นตกตะกอนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 3 ครั้ง)

2. เมื่อได้ส่วนของตะกอนแล้วให้ใส่สาร Solution A ปริมาตร 250 µl เขย่าโดยใช้ Vortex เพื่อทำการละลายตะกอนให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3. ใส่สาร Solution B ปริมาตร 250 µl ผสมขึ้นลงเบาๆประมาณ 4-6 ครั้ง

4. ใส่สาร Solution C ปริมาตร 250 µl ผสมขั้นลงเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

5. ย้ายส่วนใสใส่ลงในชุดตัวกรอง (Spin filter) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm เวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาจึงเทส่วนใสทิ้ง

6. ทำการล้างตะกอนของพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใส่สารละลาย Wash solution ปริมาตร 750 µl จากนั้นปั่นล้างตะกอนด้วยความเร็ว 11,000 rpm เวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาจึงเทส่วนใสทิ้ง

7. ปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกเอา ethanol ที่ยังมีอยู่ออก

8. ย้ายชุดตัวกรองใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml จากนั้นใส่สารละลาย elution solution หรืออาจใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 50 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที เมื่อครบเวลาปั่นด้วยความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

เมื่อได้พลาสมิดดีเอ็นเอแล้วนำไปวัดความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer ทำเช่นเดียวกับขั้นตอนการสกัดดีเอ็นของยุง จากนั้นแบ่งสารละลายที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาตร 30 µl เพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน wsp ในการทดลองนี้ใช้บริการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย โดยมีบริษัท Ward Medic Ltd. เป็นบริษัทกลางในการจัดส่ง โดยแต่ละตัวอย่างจะทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน wsp ตัวอย่างละ 3 ชุด โดยตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต้องมีความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเออย่างน้อย คือ 100-150 µg/µl และมีปริมาตรอย่างน้อย 10 µl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน wsp

นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างจากบริษัท 1st BASE DNA sequencing services ประเทศมาเลเซีย โดยแสดงในรูปกราฟ chromatogram จากโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9 จากนั้นตัดเอาเฉพาะส่วนของยีนที่เราต้องการคือยีน wsp ออกจากพลาสมิดเวคเตอร์แล้วบันทึกในรูปแบบ Fasta format ไว้ในโปรแกรม notepad

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน* wsp *กับฐานข้อมูล NCBI

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน wsp มาวิเคราะห์ค่าความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม nucleotide blast (BLASTN) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ซึ่งจะนำลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน wsp ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน wsp ของยุงจากฐานข้อมูลใน NCBI (GenBank) โดยจะแสดงค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ความเหมือนและความคล้อยคลึง (percentage identities)

การขอขึ้นทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกโคลนจากทุกตัวอย่างที่ได้จากการศึกษา มายื่นขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) แบบออนไลน์ เพื่อเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าไปในฐานข้อมูลออนไลน์ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BankIt

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

ผลการทดลอง

ผลกระทบของสภาพอากาศทั้ง 5 ภูมิภาคต่อปริมาณและความหนาแน่นของยุงลายสวน

จากการทำการทดลองที่มีการระบาด (Infected area) ของยุงลายสวนจาก 5 ภูมิภาค คือ ภาคเหนือ (จ.แพร่) ภาคใต้ (จ.สงขลา) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จ.นครราชสีมา) ภาคกลาง (กรุงเทพมหานคร) และภาคตะวันออก (จ.ระยอง) เพื่อใช้ประชากรยุงจากหลากหลายแหล่งดังกล่าวมาเปรียบเทียบกัน โดยทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 ครั้ง ในฤดูหนาว (เดือนมกราคม) ฤดูร้อน (เดือนเมษายน) และฤดูฝน (เดือนสิงหาคม) จังหวัดละ 100 ตัวอย่าง โดยรายละเอียดในการเก็บตัวอย่างในแต่ละฤดูเฉลี่ยในการเก็บตัวอย่าง 3 ครั้งในแต่ละจังหวัดซึ่งได้แจกแจงรายละเอียดในตารางที่ 4-6 ซึ่งจะเห็นได้ว่าในฤดูฝน (ความชื้นเฉลี่ย 67.8$\pm$5.7 % และอุณหภูมิเฉลี่ย 28.8$\pm$0.4 $^{\circ}$C) ค่าเฉลี่ยของยุงที่จับได้จะสูงกว่าในฤดูร้อน (ความชื้นเฉลี่ย 42.8$\pm$22.4 % และอุณหภูมิเฉลี่ย 36.4$\pm$4.8 $^{\circ}$C) และฤดูหนาว (ความชื้นเฉลี่ย 55.6$\pm$13.6 % และอุณหภูมิเฉลี่ย 28.2$\pm$2.7 $^{\circ}$C) ตามลำดับ ซึ่งการที่พบยุงมากในฤดูฝนอาจเป็นไปได้ว่าไข่ยุงมีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถอยู่ในสภาวะอากาศที่แห้งแล้ง ไม่มีน้ำได้นานนับเดือน พอมีฝนตกลงมาไข่เหล่านั้นก็เริ่มกระบวนการฟักตัวเป็นลูกน้ำและยุงได้ การพบยุงเยอะมากในฤดูฝนจึงเกิดขึ้นได้มากกว่าฤดูอื่นๆ เมื่อเทียบกับอุณหภูมิเฉลี่ยของฤดูฝนและฤดูหนาวมีค่าไกล้เคียงกันมากแต่ค่าเฉลี่ยของยุงที่จับได้มีค่าค่อนข้างต่างกัน ดังนั้นน่าจะมีปัจจัยอื่นๆในการที่ยุงเข้าหาเหยื่อเช่น ปริมาณ CO_2 เป็นต้น จะเห็นได้ว่าทางภาคตะวันออกที่จังหวัดระยองจะมีปริมาณยุงเฉลี่ยมากกว่าภูมิภาคอื่นๆ รองลงมาเป็นทางภาคใต้ จังหวัดสงขลา อาจเป็นไปได้ว่า ทางภาคตะวันออกและทางภาคใต้มีสวนยางจำนวนมากซึ่งพบยุงลายสวนเป็นส่วนใหญ่ และมีอัตราการแพร่ขยายพันธุ์ที่สูงอันเนื่องมาจากแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารของยุงลายสวนจึงสามารถจับยุงได้ง่ายกว่าในภูมิภาคอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามต้องทำการศึกษาต่อในพื้นที่กว้างขึ้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ตัวอย่างที่เก็บได้ในฤดูหนาว

สถานที่	ความชื้น (%)	อุณหภูมิ (°C)	เปอร์เซ็นต์การเกิดฝน (%)	ค่าเฉลี่ยยุงที่จับได้ (ตัว)/ชั่วโมง
ลาดกระบัง	65	31	30	3-5 ตัว/ 10 ชม.
สงขลา	71	30	35	25-30 ตัว/ 3 ชม.
นครราชสีมา	59	24	0	10-13 ตัว/ 6 ชม.
แพร่	43	28	0	10 ตัว/ 7 ชม.
ระยอง	40	28	0	30-35 ตัว/ 3 ชม.

ตารางที่ 5 ตัวอย่างที่เก็บได้ในฤดูร้อน

สถานที่	ความชื้น (%)	อุณหภูมิ (°C)	เปอร์เซ็นต์การเกิดฝน (%)	ค่าเฉลี่ยยุงที่จับได้ (ตัว)/ชั่วโมง
ลาดกระบัง	19	40	0	0ตัว/ 10 ชม.
สงขลา	49	37	24	5 ตัว/6 ชม.
นครราชสีมา	71	31	11	10-15ตัว/ 3 ชม.
แพร่	21	42	0	0ตัว/ 10 ชม.
ระยอง	54	32	6	8-10ตัว/ 4 ชม.

ตารางที่ 6 ตัวอย่างที่เก็บได้ในฤดูฝน

สถานที่	ความชื้น (%)	อุณหภูมิ (°C)	เปอร์เซ็นต์การเกิดฝน (%)	ค่าเฉลี่ยยุงที่จับได้ (ตัว)/ชั่วโมง
ลาดกระบัง	60	29	30	44 ตัว/ 2 ชม.
สงขลา	74	29	5	100 ตัว/ 20 นาที.
นครราชสีมา	64	29	40	40 ตัว/ 2 ชม.
แพร่	71	28	3	100 ตัว/ 30 นาที.
ระยอง	70	29	50	100 ตัว/ 15 นาที.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

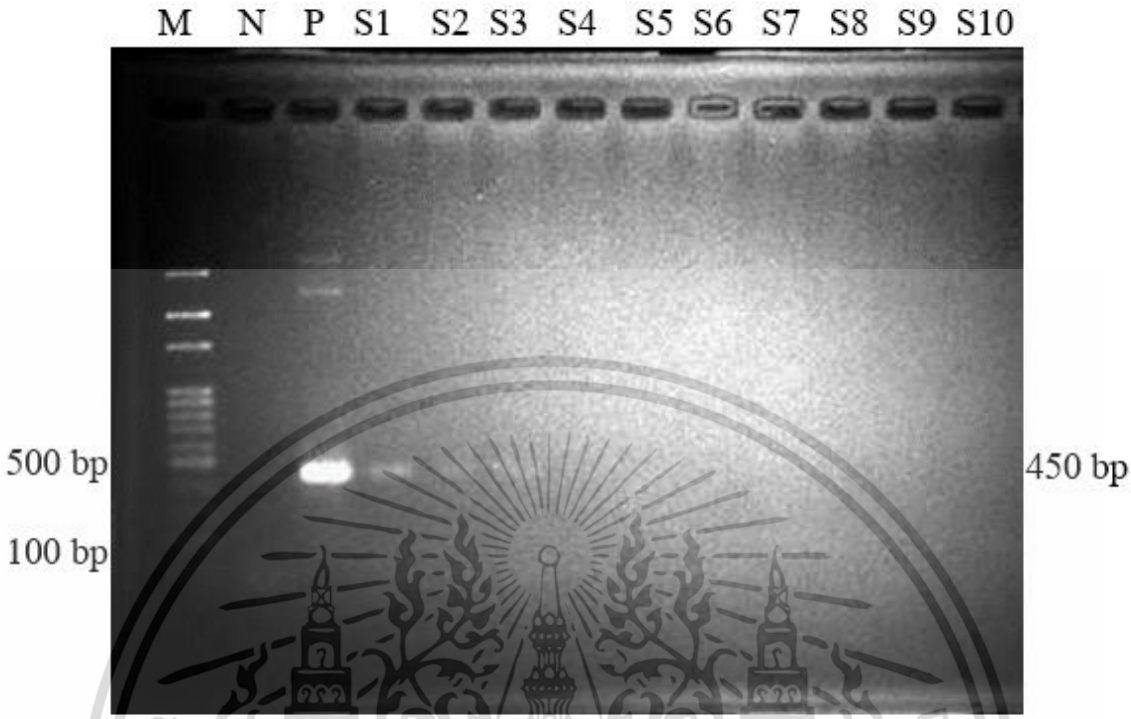
ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน wsp ของแบคทีเรีย *Wolbachia* จากยุงลายสวน โดยเทคนิค PCR

การศึกษาความผันแปรของ wsp ของแบคทีเรีย *Wolbachia* จากยุงลายสวนในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย จากตัวอย่างยุงลายทั้งหมด 450 ตัวอย่างที่เก็บจากภาคเหนือ (จ.แพร่) ภาคใต้ (จ.สงขลา) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จ.นครราชสีมา) ภาคกลาง (กรุงเทพมหานคร) และภาคตะวันออก (จ.ระยอง) โดยเก็บทั้งหมด 3 ฤดู นำมาสกัด DNA จากชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นบริเวณยีน wsp ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A และ B ภายใต้ปฏิกริยา PCR ที่สภาวะเหมาะสม หลังจากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยการทำ 1.5 % agarose gel electrophoresis โดยให้เคลื่อนที่ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้แล้วไปย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเห็น PCR product ของ Supergroup A ที่มีขนาดประมาณ 550 bp (ภาพที่ 1) และ Supergroup B ที่มีขนาดประมาณ 450 bp (ภาพที่ 2) โดยเปรียบเทียบขนาดของยีนกับแถบดีเอ็นเอมาตราฐานขนาด 100 bp พบตัวอย่างยุงลายสวนมีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ทั้งหมด 69 ตัวอย่าง เป็น Supergroup A จำนวน 28 ตัวอย่าง Supergroup B จำนวน 35 ตัวอย่าง และติดเชื้อร่วมกัน Supergroup A+B จำนวน 6 ตัวอย่าง จังหวัดระยองพบเชื้อมากที่สุดทั้ง Supergroup A และ Supergroup B จังหวัดนครราชสีมาพบการติดเชื้อร่วมกัน Supergroup A + B มากที่สุด (ตารางที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 1 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน wsp ในยุงลายสวนที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* Supergroup A ด้วยวิธี gel electrophoresis (1.5 % agaroes gel) ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp ; Lane S1-S10 คือ PCR product ของยีน wsp ในตัวอย่างยุงลายสวน ; Lane P คือ Positive control ; Lane N คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน wsp ในยุงลายสวนที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* Supergroup B ด้วยวิธี gel electrophoresis (1.5 % agaroes gel) ภายใต้ความศักย์ไฟฟ้า 100 โวต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Lane M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp ; Lane N คือ Negative control (ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์แทนดีเอ็นเอต้นแบบ) ; Lane P คือ Positive control ; Lane S1-S10 คือ PCR product ของยีน wsp ในตัวอย่างยุงลายสวน)

ตารางที่ 7 ผลรวมของยุงที่พบเชื้อ *Wolbachia*

จังหวัด	สายพันธุ์ *Wolbachia*		
	Supergroup A	Supergroup B	Supergroup A+B
แพร่	3	6	1
กรุงเทพมหานคร	11	1	1
นครราชสีมา	2	11	3
ระยอง	11	12	1
สงขลา	1	5	0
รวม	28	35	6

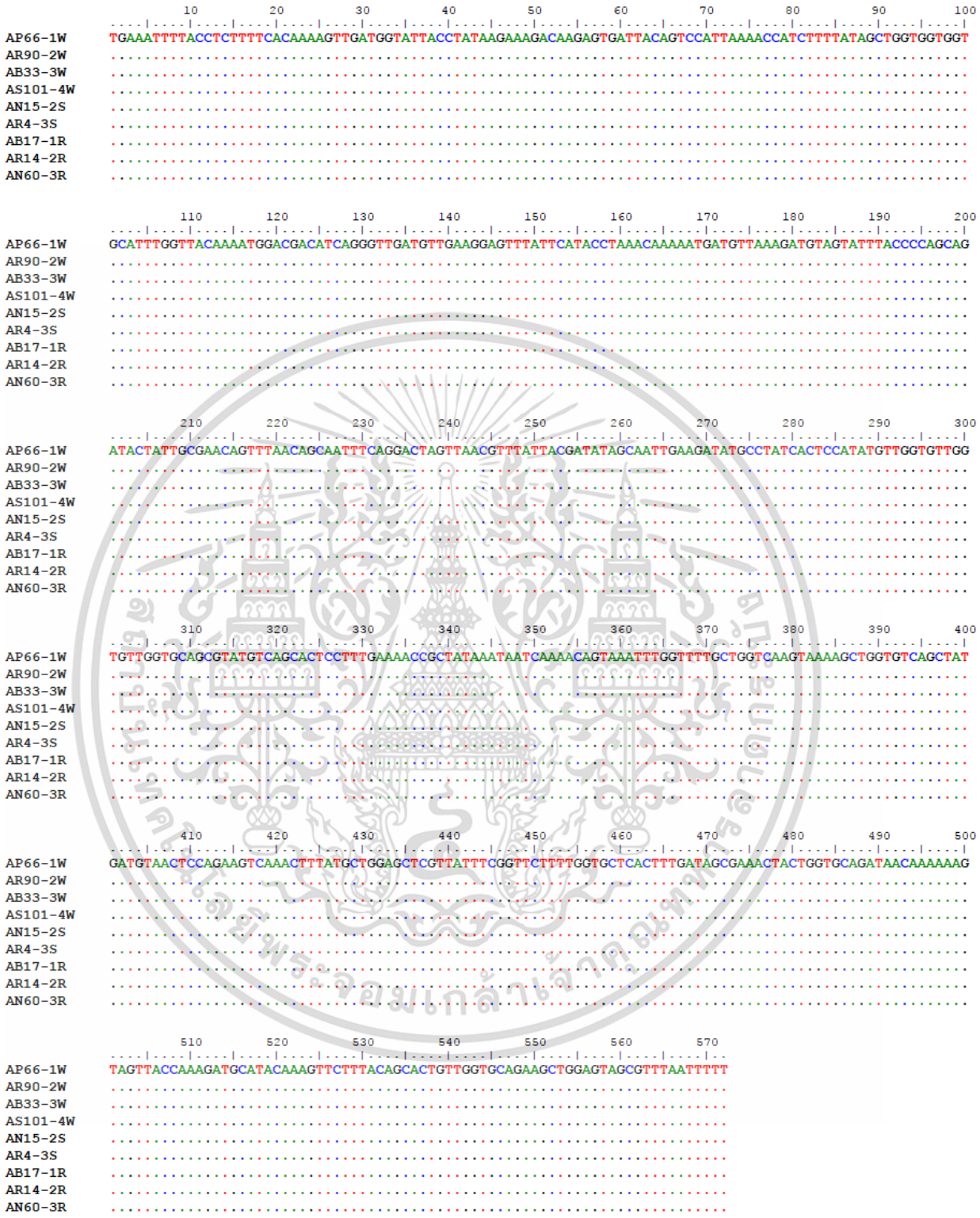
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลจากการตรวจโคลนที่มีชิ้นส่วนยีน wsp ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* Supergroup A และ B ในตัวอย่างยุงลายสวนด้วยเทคนิค colony PCR นำ colony ที่มีชิ้นส่วนยีน wsp มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวัดปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอโดยตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต้องมีความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเออย่างน้อยคือ 100-150 µg/µl และมีปริมาตรอย่างน้อย 10 µl ก่อนนำส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท AIT biotech ประเทศสิงคโปร์ โดยใช้ primer T7 (5´GTAATACGACTCACTATAGGGC3´) และส่งเพื่อยันยืนความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการทำ sequencing มาแล้วจะแสดงในรูปของกราฟ chromatogram จากนั้นทำการวิเคราะห์เส้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เนื่องจากตัวอย่างที่ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะมีบางส่วนของพลาสมิดเวคเตอร์ติดบริเวณหัวและท้ายของเส้น insert gene อยู่ เราจึงทำการตัดส่วนของเวคเตอร์ออกโดยวิเคราะห์จากโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Program Version 7.1.9 จากนั้นเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ลงในโปรแกรม notepad

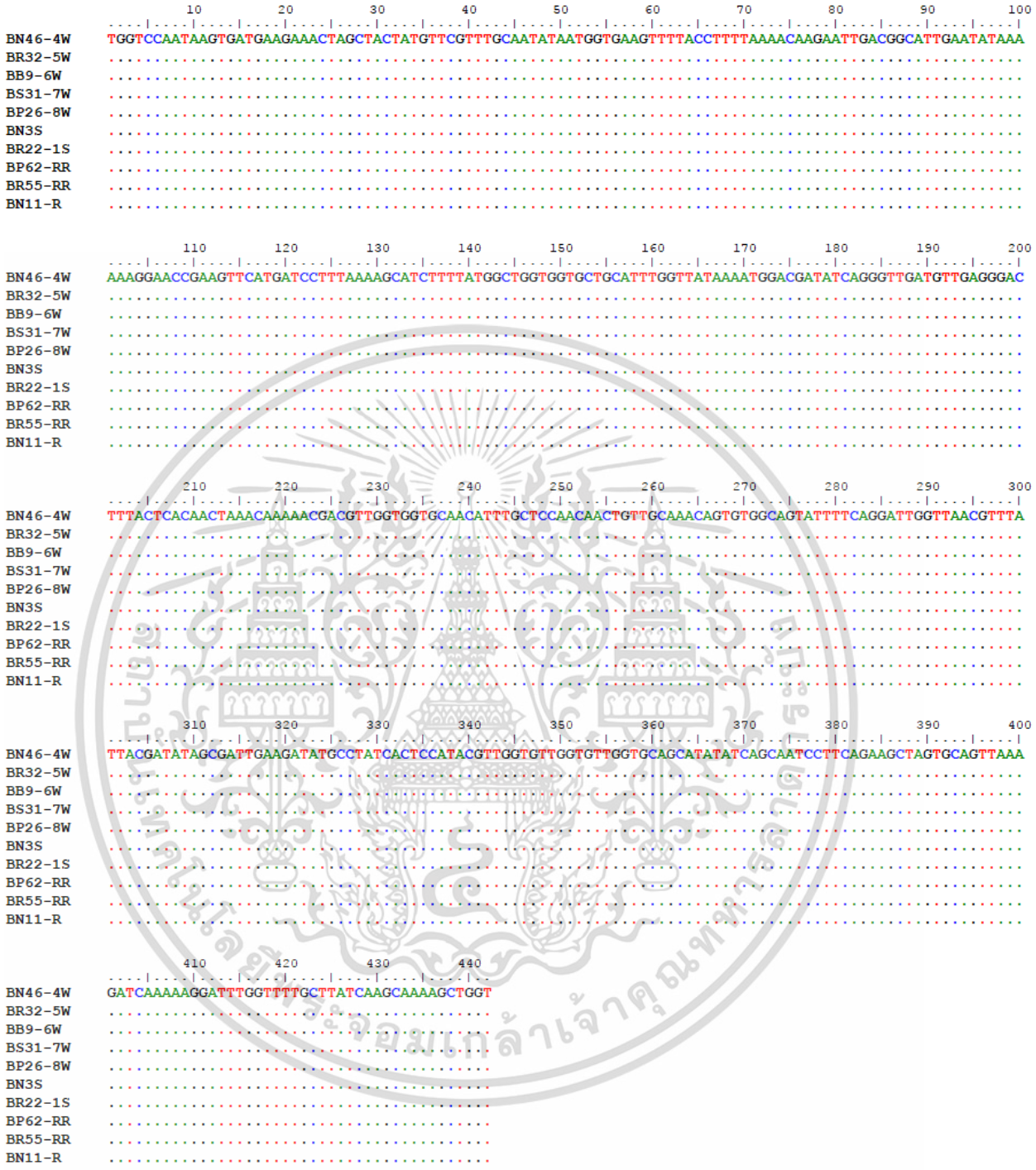
เมื่อวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตัดแต่งแล้วพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน wsp ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* Supergroup A และ B ในตัวอย่างยุงลายสวนมีความยาวขนาด 572 และ 442 bp ตามลำดับ ซึ่งทั้ง *Wolbachia* Supergroup A (ภาพที่ 3) และ B (ภาพที่ 4) ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ในยุงที่เก็บในแต่ละภูมิภาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 ผลการเปรียบเทียบ multiple sequence alignment แสดงตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ แบคทีเรีย *Wolbachia* Supergroup A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 ผลการเปรียบเทียบ multiple sequence alignment แสดงตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ แบคทีเรีย *Wolbachia* Supergroup B

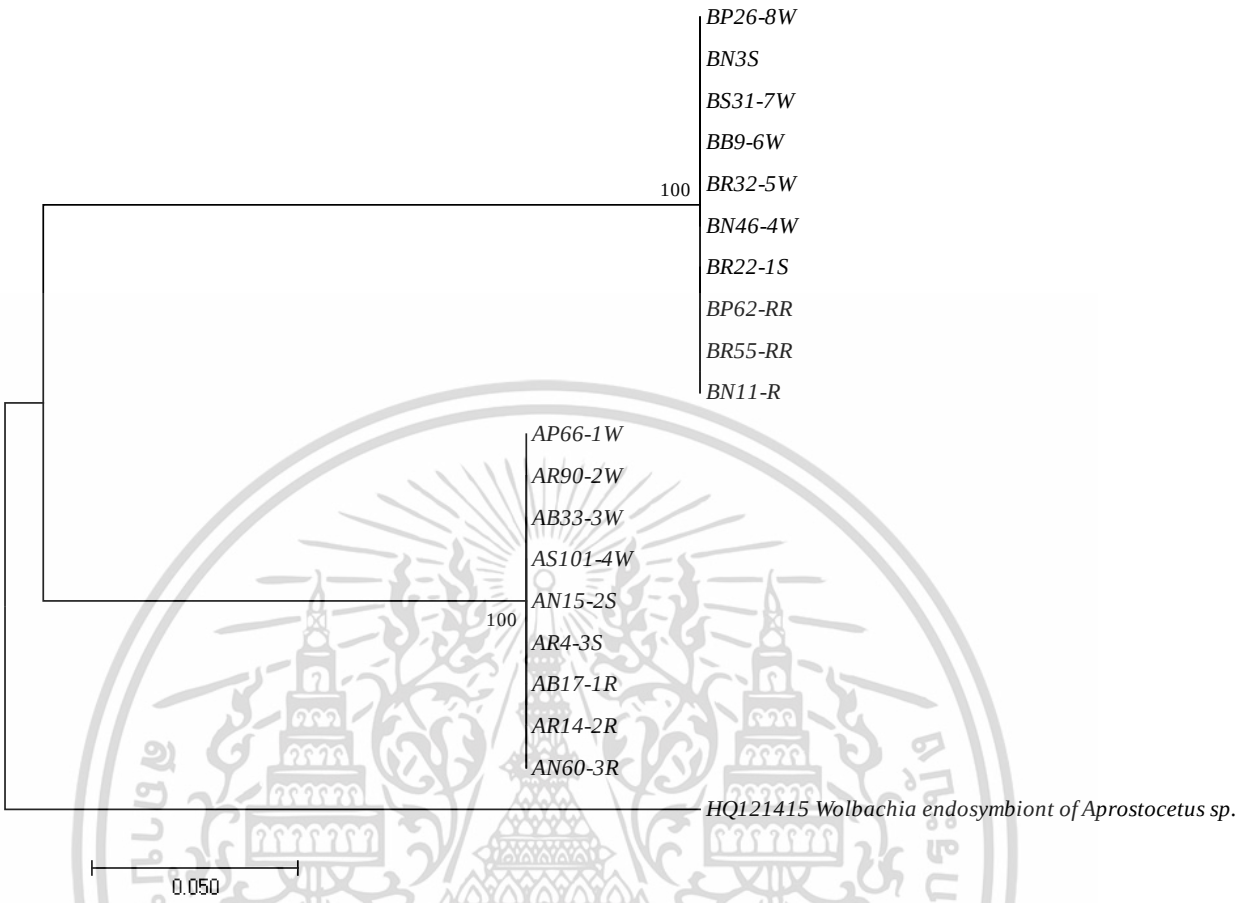
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการสร้างและวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ

ทำการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน wsp ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในตัวอย่างยุงลายสวนที่เก็บจากภูมิภาคต่างๆ ในประเทศไทยโดยทำการทดสอบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน wsp โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 โดยวิธี Maximum Likelihood และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อพิจารณาการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) และตรวจความน่าเชื่อถือทางสถิติโดยใช้ bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ และใช้ *Wolbachia endosymbiont of Aprostocetus sp.*accession no. HQ121415 เป็น out group

ผลการวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิต้นไม้พบว่า cladogram ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน wsp จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกสามารถแบ่ง clade อย่างชัดเจนโดยที่แบคทีเรีย *Wolbachia* Supergroup A แยกเป็น monophyly อย่างสมบูรณ์ด้วยค่า bootstrap test 100 % เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *Wolbachia* Supergroup B จากการวิเคราะห์ cladogram ดังกล่าวนี้ตัวอย่างที่ศึกษาในงานวิจัยทั้งหมดพบว่าถูกจัดอยู่ใน 2 clade คือ แบคทีเรีย *Wolbachia* Supergroup A และ แบคทีเรีย *Wolbachia* Supergroup B ซึ่งแบ่งเป็น clade อย่างชัดเจน (ภาพที่ 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 แสดง Phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน wsp ของแบคทีเรีย *Wolbachia* Supergroup A และ B ที่เก็บจากภูมิภาคต่างๆ จากการใช้ Maximum Likelihood แบบ Kimura-2-parameter model โดยกำหนดค่า bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการขอขึ้นเลขทะเบียนของลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน wsp ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงลายสวนที่ได้จะทำการเตรียมข้อมูลเพื่อส่งลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยื่นขอเลขทะเบียน (accession number) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่างโดยเข้าใช้แบบออน์ไลน์จากโปรแกรมออนไลน์ BankIt เพื่อเพิ่มข้อมูลและเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน wsp แบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A และ B ของยุงลายสวนในประเทศไทยลงไปในฐานข้อมูล NCBI (GenBank) โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการส่งตัวอย่างจำนวน 19 ตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ได้ทำการศึกษา สำหรับผลการการยื่นขอเลขทะเบียน (accession number) แบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A คือ KY817476 – KY817484 และแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup B คือ KY817485 - KY817494 (ตารางที่ 8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

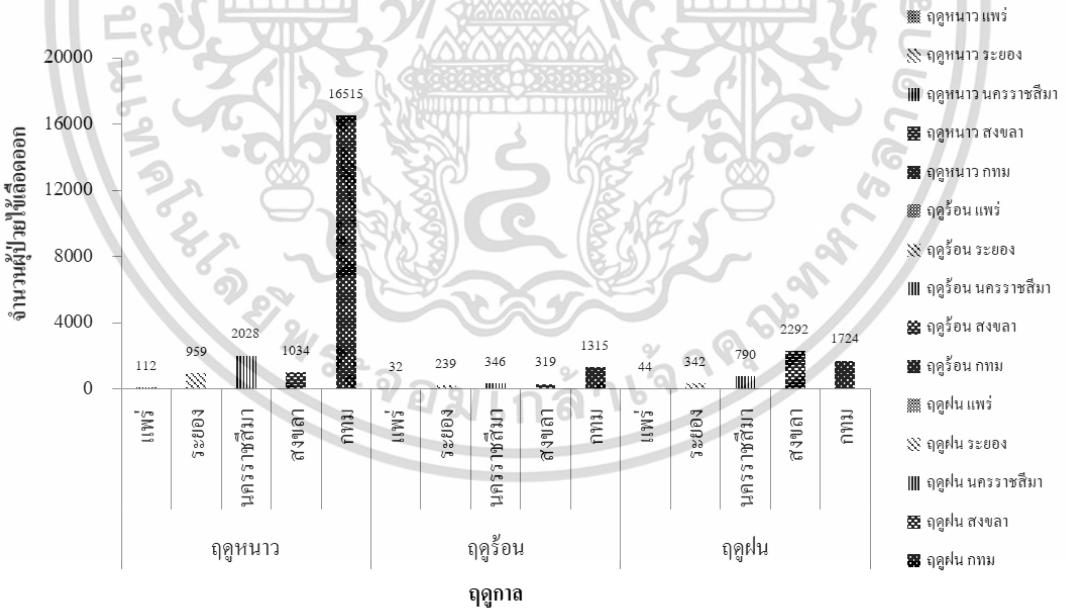
ตารางที่ 8 แสดงผล percentage identity เลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ การระบุ species ของเชื้อ Acinetobacter และเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลอ้างอิง

ลำดับ	รหัสตัวอย่าง	จังหวัด	Acc no.	% identity	*Wolbachia* Isolate	ฐานข้อมูลอ้างอิง
1	AP66-1W	แพร่	KY817476	99	*Ae. albopictus*	KJ140127
2	AR90-2W	ระยอง	KY817477	99	*Ae. albopictus*	KJ140127
3	AB33-3W	กรุงเทพมหานคร	KY817478	99	*Ae. albopictus*	KJ140127
4	AS101-4W	สงขลา	KY817479	99	*Ae. albopictus*	KJ140127
5	AN15-2S	นครราชสีมา	KY817480	99	*Ae. albopictus*	KJ140127
6	AR4-3S	ระยอง	KY817481	99	*Ae. albopictus*	KJ140127
7	AB17-1R	กรุงเทพมหานคร	KY817482	99	*Ae. albopictus*	KJ140127
8	AR14-2R	ระยอง	KY817483	99	*Ae. albopictus*	KJ140127
9	AN60-3R	นครราชสีมา	KY817484	99	*Ae. albopictus*	KJ140127
10	BN46-4W	นครราชสีมา	KY817485	99	*Anastrepha fraterculus*	EU651895
11	BR32-5W	ระยอง	KY817486	100	*Anastrepha fraterculus*	EU651895
12	BB9-6W	กรุงเทพมหานคร	KY817487	100	*Anastrepha fraterculus*	EU651895
13	BS31-7W	สงขลา	KY817488	100	*Anastrepha fraterculus*	EU651895
14	BP26-8W	แพร่	KY817489	100	*Anastrepha fraterculus*	EU651895
15	BN3S	นครราชสีมา	KY817490	100	*Anastrepha fraterculus*	EU651895
16	BR22-1S	ระยอง	KY817491	100	*Anastrepha fraterculus*	EU651895
17	BP62-RR	แพร่	KY817492	100	*Anastrepha fraterculus*	EU651895
18	BR55-RR	ระยอง	KY817493	100	*Anastrepha fraterculus*	EU651895
19	BN11-R	นครราชสีมา	KY817494	100	*Anastrepha fraterculus*	EU651895

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

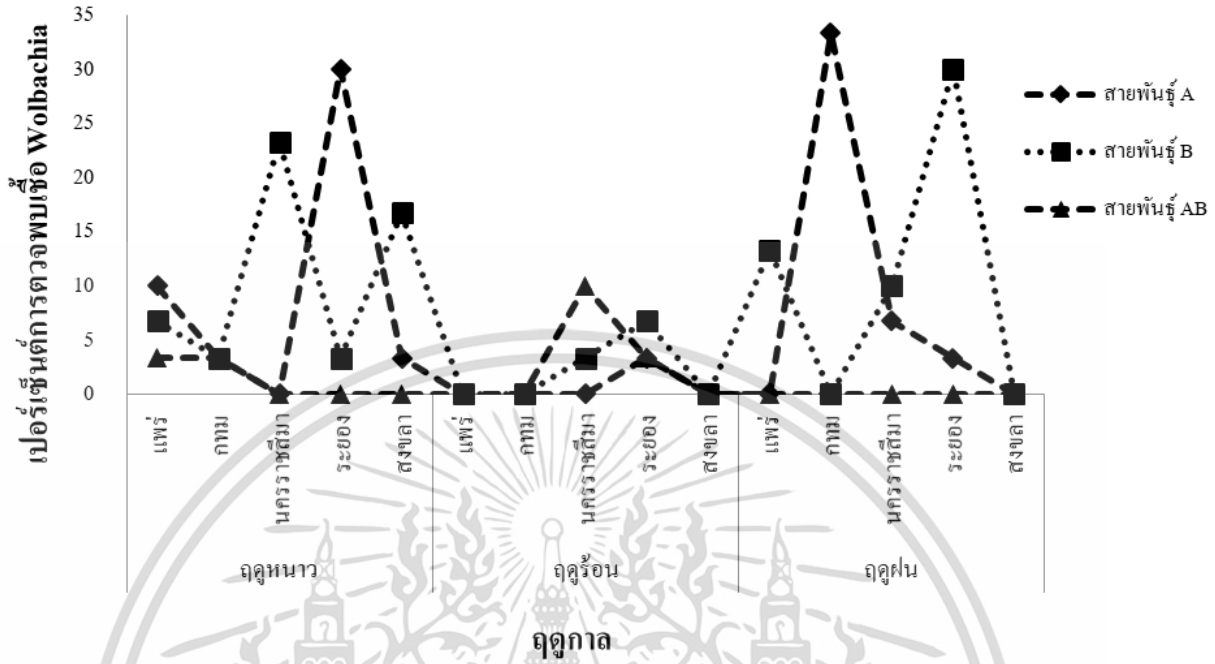
ศึกษาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ *Wolbachia* และจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกในฤดูกาลต่างๆ

จำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกในแต่ละภูมิภาคและในแต่ละฤดูกาลพบว่าในช่วงเดือนตุลาคม 2558-เดือนตุลาคม 2559 ข้อมูลจากสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรคกระทรวงสาธารณสุข ในช่วงฤดูหนาวพบผู้ป่วยไข้เลือดออกสูงที่สุดในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ฤดูฝนและ ฤดูร้อนตามลำดับ (ภาพที่ 6) และทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์การพบแบคทีเรีย *Wolbachia* จากยุงลายสวนในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย จากตัวอย่างยุงลายทั้งหมด 450 ตัวอย่างโดยแยกตามแต่ละภูมิภาคและในแต่ละฤดูกาล พบแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A มากที่สุดประมาณ 33 % ที่กรุงเทพมหานครในช่วงฤดูฝน แบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup B พบมากที่สุดประมาณ 30 % ที่จังหวัดระยองในช่วงฤดูฝนเช่นกัน และช่วงฤดูหนาวพบแบคทีเรีย *Wolbachia* ลองลงมาจากฤดูฝน ซึ่งช่วงฤดูร้อนพบแบคทีเรีย *Wolbachia* จากยุงลายสวนน้อยที่สุดแต่พบทั้งแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A และ B และพบเชื้อร่วม AB อีกด้วย (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 6 แสดงจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกในแต่ละฤดูกาลทั้ง 5 ภูมิภาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ *Wolbachia* ในฤดูกาลต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ *Wolbachia* ในแต่ละภูมิภาคและ ฤดูกาลต่างๆ เทียบกับจำนวนการพบผู้ป่วยไข้เลือดออกพบว่า

ภาคเหนือ จังหวัดแพร่ ช่วงฤดูหนาวพบแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A และ B และพบเชื้อร่วม AB ในยุงลายสวน 10%, 7% และ 3% ตามลำดับซึ่งจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกประมาณ 23% ในขณะที่ช่วงฤดูร้อนไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และพบจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกประมาณ 17% ในช่วงฤดูฝนพบเพียงพบแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A สูงถึง 33%และพบจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกสูงเช่นกันประมาณ 60% (ภาพที่ 8)

ภาพที่ 8 แสดงเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ *Wolbachia* และผู้ป่วยไข้เลือดออก ในภาคเหนือ จังหวัดแพร่ ในฤดูกาลต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคกลาง กรุงเทพมหานคร ช่วงฤดูหนาวพบแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A และ B และพบเชื้อร่วม AB ในยุงลายสวน 3%, 3% และ 3% ตามลำดับ ซึ่งจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกประมาณ 9% ในขณะที่ช่วงฤดูร้อนไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* และพบจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกประมาณ 7% ในช่วงฤดูฝนพบเพียงพบแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup B 13%และพบจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกสูงประมาณ 84% (ภาพที่ 9)

ภาพที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ *Wolbachia* และผู้ป่วยไข้เลือดออก ในภาคกลาง กรุงเทพมหานคร ในฤดูกาลต่างๆ

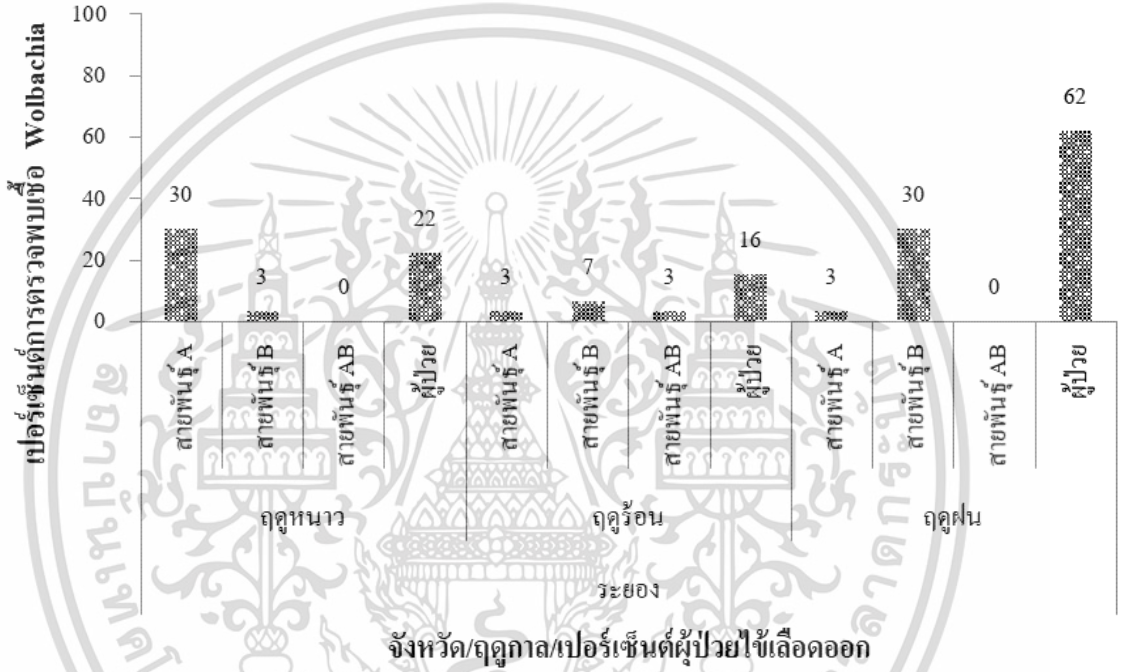
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดนครราชสีมา ช่วงฤดูหนาวพบเพียงแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup B 23% ซึ่งจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกประมาณ 25% ในขณะที่ช่วงฤดูร้อนพบเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup B 3% และเชื้อร่วม AB 10% จำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกประมาณ 11% ในช่วงฤดูฝนพบแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A และ B ในยุงลายสวน 7% และ 10% ตามลำดับและพบจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกสูงประมาณ 64% (ภาพที่ 10)

ภาพที่ 10 แสดงเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ *Wolbachia* และผู้ป่วยไข้เลือดออก ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดนครราชสีมา ในฤดูกาลต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

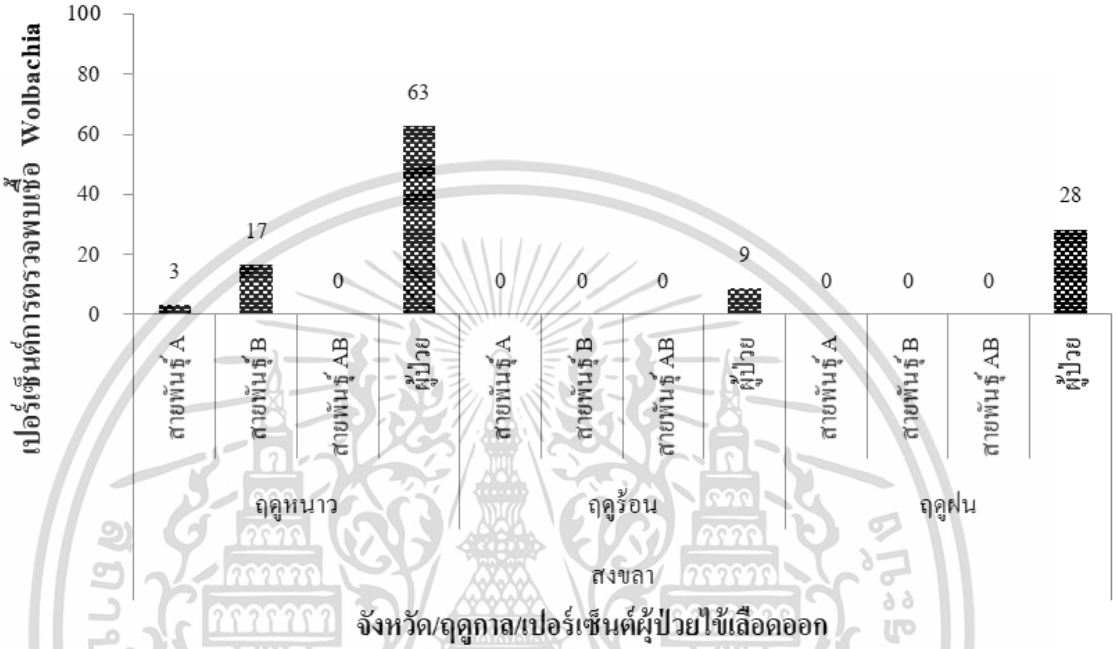
ภาคตะวันออก จังหวัดระยอง ช่วงฤดูหนาวพบแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A และ B 30% และ 3% ตามลำดับ ซึ่งจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกประมาณ 22% ในขณะที่ช่วงฤดูร้อนพบเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A, B และเชื้อร่วม AB 3% 7% และ 3% จำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกประมาณ 16% ในช่วงฤดูฝนพบแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A และ B ในยุงลายสวน 3% และ 30% ตามลำดับและพบจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกสูงประมาณ 62% (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ *Wolbachia* และผู้ป่วยไข้เลือดออก ในภาคตะวันออก จังหวัดระยอง ในฤดูกาลต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในภาคใต้ จังหวัดสงขลา ช่วงฤดูหนาวพบแบคทีเรีย *Wolbachia* supergroup A และ B 3% และ 17% ตามลำดับ ซึ่งจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกประมาณ 63% ในขณะที่ช่วงฤดูร้อนและฤดูฝนไม่พบเชื้อแบคทีเรีย พบจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกประมาณ 9% และ 28% ตามลำดับ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แสดงเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ *Wolbachia* และผู้ป่วยไข้เลือดออก ในภาคใต้ จังหวัดสงขลา ในฤดูกาลต่างๆ

จากการศึกษาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ *Wolbachia* และจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกในฤดูกาลต่างๆ พบว่าการตรวจพบ *Wolbachia* จะพบมากที่สุดช่วงฤดูฝน รองลงมาคือฤดูหนาวและฤดูร้อนในส่วนของผู้ป่วยไข้เลือดออกพบมากที่สุดในช่วงฤดูหนาว ฤดูฝนและฤดูร้อน อย่างไรก็ตามข้อมูลยังไม่มากพอที่จะสามารถสรุปได้ว่า *Wolbachia* ในยุงลายสวนที่เก็บจากธรรมชาติจะมีผลต่อการเกิดโรคไข้เลือดออกในคนได้หรือไม่จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาในพื้นที่เพิ่มขึ้นและสุ่มจำนวนตัวอย่างของยุงที่เพิ่มขึ้นด้วยและทำการ isolate เชื้อ *Wolbachia* ในยุงเพื่อทำการศึกษาต่อยอดในอนาคตข้อมูลที่ได้สามารถเพิ่มเป็นฐานข้อมูลของ *Wolbachia* ที่พบในประเทศไทยได้และเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปในอนาคตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ความหนาแน่นของยุงลายสวน จะเห็นได้ว่ามีความหนาแน่นสูงในฤดูฝนมากกว่าในฤดูร้อน และฤดูหนาว เนื่องจากในฤดูฝนมีแหล่งน้ำเพื่อการเพาะพันธุ์ยุงลายสวนหรือยุงชนิดอื่นๆ ได้มากมาย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Boonklong and Bhumiratana (2016) ที่พบว่าปริมาณยุง *Aedes aegypti* และ *Aedes albopictus* จะพบได้มากในฤดูฝนมากกว่าในฤดูแล้งมาก นอกจากนี้ภูมิภาคตะวันออกของประเทศ เช่น จังหวัดระยอง มีปริมาณยุงเฉลี่ยสูงกว่าภูมิภาคอื่นๆ รองลงมา เป็นจังหวัดทางภาคใต้ ซึ่งทั้งสองภูมิภาคมีลักษณะคล้ายคลึงกันคือมีสวนยยาง ซึ่งเป็นแหล่งที่มักเป็นที่อยู่อาศัย หลบซ่อนและแพร่พันธุ์ ของยุงลายสวน ขณะที่ Boonklong and Bhumiratana ยังรายงานว่าความแตกต่างทางกายภาพพื้นที่ของยุง Aedes ในแหล่งเพาะพันธุ์ยุง ยังมีความแตกต่างกันตามลักษณะของภาชนะที่บรรจุน้ำที่ตั้งอยู่ในแหล่งที่อยู่อาศัยของมนุษย์ และมักมีการขยายพันธุ์ที่แตกต่างกันระหว่างภายในและภายนอกที่อยู่อาศัย ส่วนในกรณีของยุงลายสวนการแพร่กระจายและการระบาดของโรคได้มีความหลากหลายขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพ พื้นที่ ฤดูกาล รวมถึงการเพิ่มขึ้นของประชากรมนุษย์ ทั้งในเขตตัวเมืองหรือบ้านเรือน (Banu *et al*., 2011 ; Beebe *et al*., 2009) นอกจากนี้จากรายงานของ Chumsri et al (2007) ยังพบว่าในภาคใต้ของไทยลักษณะภาชนะน้ำขังที่เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุง ยังมีความแตกต่างกันในฤดูกาลต่างๆ โดยจะพบลูกน้ำของยุง *Aedes albopictus* มากกว่า *Aedes aegypti* และพบในฤดูฝนมากกว่าในฤดูแล้ง และพบภายนอกที่อยู่อาศัยมากกว่าภายใน

ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน wsp ของแบคทีเรีย Wolbachia จากยุงลายสวนโดยเทคนิค PCR จะพบ PCR product ของ Super group A มีขนาดประมาณ 550 bp และ Super group B มีขนาดประมาณ 450 bp ซึ่งจะเห็นได้ว่าจากยุงทั้งหมด 450 ตัวอย่างมีการติดเชื้อ Wolbachia ทั้งหมด 69 ตัวอย่าง คิดเป็น 15.33% ซึ่งส่วนใหญ่เป็นชนิด Super group B โดย Gloria-Soria *et al*. (2018) กล่าวว่าแมลงถึง 66% ของจำนวนชนิดแมลงทั้งหมดติดเชื้อ Wolbachia ซึ่งจากพื้นที่ศึกษาจังหวัดระยองจะมีการพบเชื้อมากที่สุด และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตัดแต่งแล้วพบว่ามีลำดับของยีน wsp ของเชื้อ Wolbachia Super group A และ B ยุงลายสวนมีความยาวขนาด 572 และ 442 bp ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางพันธุ์กรรมกันระหว่างยุงที่เก็บในแต่ละภูมิภาค อย่างไรก็ตามการติดเชื้อ Wolbachia ในยุงลายสวนของประเทศไทยนี้ นับว่าต่ำกว่ามากกับการศึกษาในประเทศมาเลเซียซึ่งพบมีการติดเชื้อ Super group A และ B ในยุงเพศเมีย และเพศผู้ถึง 98.6 และ 95.1% (Ahmad *et al*., 2017) นอกจากนี้ได้มีการขอขึ้นเลขทะเบียนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) แบคทีเรีย Wolbachia Super group A คือ KY817476-KY817484 และ Wolbachia Super group B คือ KY817485-KY817494

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการเปรียบเทียบการตรวจพบเชื้อ Wolbachia และจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออก ในพื้นที่และฤดูกาลต่างๆ พบว่าผู้ป่วยไข้เลือดออกในกรุงเทพมหานครมีมากที่สุดในฤดูหนาว และมักมีผู้ป่วยมากทุกฤดูกาล ซึ่งสอดคล้องกับการพบเชื้อ Wolbachia น้อยมากในฤดูหนาวในกรุงเทพมหานคร ซึ่งโดยทั่วไปทุกจังหวัด ได้แก่ แพร่ กรุงเทพมหานคร นครราชศรีมา ระยอง และสงขลา จะพบผู้ป่วยไข้เลือดออกมากในฤดูฝน และมีเปอร์เซ็นต์การพบเชื้อ Wolbachia สายพันธุ์ A หรือ B ร่วมด้วยค่อนข้างสูงคือ 0-33% ขณะที่ฤดูร้อนมักพบผู้ป่วยไม่มากนักและมักไม่พบหรือพบการติดเชื้อ Wolbachia ในยุงน้อยคือ 0-10% เท่านั้น ดังนั้นฤดูกาลจึงมีแนวโน้มว่ามีผลต่อการติดเชื้อ Wolbachia ในยุง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและนิเวศวิทยาที่มีต่อความหลากหลายกระจายตัวของยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) และการติดเชื้อ Wolbachia ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย พบว่าความหนาแน่นของยุงลายสวน จะมีความหนาแน่นมากในฤดูฝนเนื่องจากมีแหล่งน้ำต่างๆ เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุง และพบมากในจังหวัดทางภาคตะวันออก คือ ระยอง และภาคใต้ คือ สงขลา ที่มีสวนยางกระจายหนาแน่น การติดเชื้อแบคทีเรีย Wolbachia ในยุงพบการติดเชื้อ 15.33% ในการศึกษาเทคนิค PCR พบการติดเชื้อทั้งชนิด Super group A, Super group B และ Super group A+B โดยมีขนาด Super group A และ Super group B คือ 550 และ 450 bp เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ มีลำดับของยีน wsp มีความยาวขนาด 572 และ 442 bp และได้มีการขอขึ้นเลขทะเบียนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) คือ KY817476-KY817484 และ KY817485-KY817494 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อ Wolbachia กับจำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกแล้วพบว่ากรุงเทพมหานครพบผู้ป่วยมากในฤดูหนาว และจังหวัดสงขลาพบมากในฤดูฝน โดยจะพบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ Wolbachia ในยุง ในฤดูฝนสูงกว่าในฤดูร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Ahmad, N. A., Vythiligam, I. Lim, Y. A. L., Zabari, N. Z. A. M., and Lee, H. L. 2017. Detection of Wolbachia in *Aedes albopictus* and their effects on chikungunya virus. Am J Trop Meed Hyg. 96(1): 148-156.

Banu, S., Hu, W., Hurst, C., and Tong, S. 2011. Dengue transmission in the Asia-Pacific region: impact of climate change and socio-environmental factors. Tropical Medicine and International Health. 16(5):598-607. doi: 10.1111/j.1365-3156.2011.02734.x.

Beebe, N. W., Cooper, R. D., Mottram, P and Sweeney, A. W. 2009. Australia's dengue risk driven by human adaptation to climate change. PLoS Neglected Tropical Diseases. 3(5, article e429) doi: 10.1371/journal.pntd.0000429.

Boonklong, O., and Bhumiratana, A. 2016. Seasonal and geographical variation of dengue vectors in Narathiwat, South Thailand. Can J Infect Dis Med Microbiol.

Chumsri, A., Tina, F. W., Jaroensutasinee, M., and Jaroensutasinee, K. 2018. Seasons and socio-cultural practices affecting *Aedes* mosquito larvae in southern Thailand. Tropical Biomedicine 35(1): 111-125.

Gloria-Soria, A., Chiodo, T. G., and Powell, J. R. 2018. Lack of evidence for natural Wolbachia infections in *Aedes aegypit* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 55(5): 1354-1356.

Gould, E.A. and Higgs, S. 2009. Impact of climate change and other factors on eme diseases. Trans R Soc Trop Med Hyg. 103:109-121.

Pardigon, N. 2009. The biology of chikungunya: A brief review of what we still do not know. Pathol. Biol. (Paris), 57(2): 127-132.

Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V. and Fontenille, D. 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. Microbes Infect. 11:1177-1185.

Semenza, J.C., and Menne, B. 2009. Climate change and infectious diseases in Europe. Lancet Infectious Diseases. 9(6):365–375

Tortosa, P., Courtiol, A., Moutailler, S., Failloux, A.B., and Weill M. 2008. Chikungunya–*Wolbachia* interplay in *Aedes albopictus*. Insect Mol Biol. 17: 677–684.

Wiwatanaratanabutr, I. 2013a. Geographic distribution of *wolbachial* infections in mosquitoes from Thailand. J. Invertebr. Pathol. 114, 337–340.

Wiwatanaratanabutr, I. 2013b. Distribution, diversity and density of *wolbachial* infections in cladocerans and copepods from Thailand. J. Invertebr. Pathol. 114, 341–345.

Wiwatanaratanabutr, I., Allan, S., Linthicum, K., and Kittayapong, P. 2010. Strain-specific differences in mating, oviposition, and host-seeking behavior between *wolbachai-*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

infected and uninfected *aedes albopictus*. Journal of the American Mosquito Control Association, 26(3):265–273.

Wiwatanaratanabutr, I., Kittayapong, P., Caubet, Y., and Bouchon, D. 2009. Molecular phylogeny of *Wolbachia* strains in arthropod hosts based on groE-homologous gene sequences. Zoolog Sci. 26: 171-177.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้