

# การจำแนกสปีชีส์ของยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน *Anopheles dirus* ในประเทศไทยโดยวิธี rDNA ITS2 allele-specific PCR (ASPCR) และ sequence characterized amplified region (SCAR) markers

## Identification of the *Anopheles dirus* Species Complex in Thailand Using rDNA ITS2 Allele-specific PCR (ASPCR) and Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) Markers

มณฑิรา มณฑาทอง (Monthira Monthatong)<sup>1\*</sup>

### บทคัดย่อ

จากการทดสอบวิธีการจำแนกสปีชีส์ยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อน *Anopheles dirus* Peyton and Harrison โดยวิธี rDNA ITS2 ASPCR และ SCAR markers พบว่าวิธี rDNA ITS2 ASPCR ให้ผลในการจัดจำแนกที่ชัดเจนกว่า โดยใช้คู่ไพรเมอร์ D-U/D-AC ในการจำแนกสปีชีส์ A และ C ซึ่งสปีชีส์ A ให้ผลแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีขนาด 562 และ 360 คู่เบส ในขณะที่สปีชีส์ C ให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 360 คู่เบส คู่ไพรเมอร์ D-U/D-B จำเพาะต่อการจำแนกสปีชีส์ B โดยให้แถบดีเอ็นเอขนาด 510 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์ D-U/D-D จำเพาะต่อสปีชีส์ D มีแถบดีเอ็นเอขนาด 306 คู่เบส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์เหล่านี้ในการจำแนกสปีชีส์ของยุงก้นปล่อง *A. dirus* จำนวน 327 ตัวอย่าง ที่เก็บจากพื้นที่ 5 แหล่ง จากจังหวัดระยอง กาญจนบุรี และนครพนม ระหว่างเดือนสิงหาคมถึงพฤศจิกายน พ.ศ. 2545 พบว่ามียุงก้นปล่อง สปีชีส์ A จำนวน 300 ตัว สปีชีส์ C จำนวน 11 ตัว และสปีชีส์ D จำนวน 17 ตัว โดยไม่พบสปีชีส์ B จากแหล่งเก็บตัวอย่าง

### Abstract

The identification of *Anopheles dirus* Peyton and Harrison species was initially carried out using the rDNA ITS2 ASPCR and SCAR markers. The former method showed better specific results of amplified DNA bands. The D-U/D-AC primer pair could be used for identification of species A and C, with the amplified products of 562 bp and 360 bp for species A and the single amplified band of 360 bp for species C. In addition, the D-U/D-B and D-U/D-D primer pairs were clearly identified as species B and D respectively. The specific amplified DNA fragment of species B was 510 bp and that of species D was 360 bp. These primer pairs were thus used to identify *A. dirus* species of 327 samples collected from 5 different field sites including Rayong, Kanchanaburi and Nakorn Phanom provinces from August to November 2002. The *A. dirus* samples of 300, 11 and 17 individuals were species A, C and D respectively. However, there were no species B found in our collection.

คำสำคัญ: ยุงก้นปล่อง SCAR ITS2

Keywords: Anopheline mosquito, SCAR, ITS2

<sup>1</sup>อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*corresponding author, e-mail: monmon@kku.ac.th

## บทนำ

ยุงก้นปล่อง *Anopheles dirus* Peyton and Harrison เป็นพาหะนำโรคมาลาเรียที่สำคัญในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การแพร่กระจายของยุงชนิดนี้ครอบคลุมพื้นที่ตั้งแต่ภาคตะวันตกเฉียงใต้ของอินเดียจนถึงประเทศไทย (Rosenberg, 1982; Baimai et al., 1988) *A. dirus* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ซับซ้อน *Anopheles (Cellia) leucosphyrus* Dönitz ซึ่งประกอบด้วยสปีชีส์ต่างๆ อย่างน้อย 7 สปีชีส์ (Peyton, 1989) ในประเทศไทยพบ *A. dirus* จำนวน 5 สปีชีส์ ได้แก่ สปีชีส์ A B C D และ F (Baimai et al. 1987; Baimai et al. 1988a; Baimai et al. 1988b) การแพร่กระจายของสปีชีส์ A พบทั่วไปทั้งภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตกของประเทศไทย แต่ไม่พบที่ภาคใต้ ส่วนสปีชีส์ B และ F พบเฉพาะที่ภาคใต้ของประเทศไทยและเขตติดต่อกับประเทศมาเลเซียเท่านั้น สปีชีส์ C พบบริเวณเขาหินปูนแถบฝั่งตะวันออกของภาคใต้และบางแห่งในจังหวัดกาญจนบุรี (Poopittayasataporn and Baimai, 1995) และสปีชีส์ D จะพบเฉพาะบริเวณป่าดิบเขาแดนประเทศพม่าและป่าเหมือนแร่แถบฝั่งตะวันตกของภาคใต้ (Baimai et al., 1988b) อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่า เฉพาะสปีชีส์ A C และ D เท่านั้น ที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นพาหะที่สำคัญสำหรับเชื้อไข้มาลาเรียทั้ง 2 สปีชีส์ คือ *Plasmodium falciparum* และ *P. vivax* (Dutta et al., 1989; Gingrich et al., 1990; Ratanarithikul et al., 1996) อย่างไรก็ตามความสามารถในการเป็นพาหะของแต่ละสปีชีส์นั้นแตกต่างกัน และเกี่ยวข้องกับกระบวนการวิวัฒนาการร่วมกันระหว่างพาหะและเชื้อก่อโรค ซึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องกับความสามารถนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้ยังพบว่ายุงก้นปล่อง *A. dirus* จะพบเฉพาะในเขตป่าลึก แตกต่างจาก *A. minimus* และ *A. maculatus* พบแพร่กระจายบริเวณชายป่าและเชิงเขา (Van Bortel et al., 2000) และสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพป่าที่เปลี่ยนแปลงเป็นชุมชน และสวนยางพารา ซึ่งแตกต่างจาก *A. dirus* ที่มีจำนวนลด

ลงตามป่าที่ถูกทำลาย ดังนั้น *A. dirus* จึงได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดสภาพความสมบูรณ์ของป่าดิบชื้นได้อีกด้วย

การจำแนก *A. dirus* เป็นสปีชีส์ต่างๆ นั้นไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ เนื่องจากมีลักษณะที่เหมือนกันมาก (isomorphic species) เดิมใช้ความแตกต่างของ โพลีทีนโครโมโซม (polytene chromosome) และ ไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) มาช่วยในการจัดจำแนกสปีชีส์ของยุงก้นปล่องชนิดนี้ แต่เทคนิคเหล่านี้ต้องอาศัยความชำนาญสูง และยังมีข้อจำกัด คือวิธีแรกต้องใช้ตัวอ่อนวัยที่ 4 (4<sup>th</sup> instar larvae) ของยุงซึ่งมักหาตัวอย่างได้ยากจากยุงที่เก็บในพื้นที่ส่วนการใช้ ไอโซเอนไซม์นั้น ต้องใช้ตัวอย่างที่มีโปรตีนที่ยังคงสภาพ เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องในระดับ DNA จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมและได้รับความสนใจในการนำมาใช้จำแนกสปีชีส์ของยุงก้นปล่องกลุ่มซับซ้อนสปีชีส์ต่างๆ เช่น การใช้เทคนิค RFLP ในการจำแนกสปีชีส์ยุงก้นปล่อง *A. funestus* และ *A. minimus* (Van Bortel, et al. 2002; Garros, et al., 2004) การพัฒนาเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา PCR (Walton et al., 1999; Huong et al., 2001; Manguin, et al., 2002) ในการจัดจำแนก *A. dirus* ทำให้การจัดจำแนกสปีชีส์ของยุงก้นปล่องทำได้ง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้น ดังนั้นในการวิจัย ครั้งนี้มีจุดประสงค์ในหาตัวไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อการจำแนกสปีชีส์ของ *A. dirus* โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้อิทธิ rDNA ITS2 allele-specific PCR (ASPCR) PCR (Walton et al., 1999) และวิธี sequence characterized amplified region (SCAR) markers (Manguin, et al., 2002) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการกระจายพันธุ์ของสปีชีส์ต่างๆ ในพื้นที่ตัวอย่างในภูมิภาคตะวันตก (จังหวัดกาญจนบุรี) ภาคตะวันออก (จังหวัดระยอง) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดนครพนม)

## วิธีการศึกษา

### 1. การเก็บตัวอย่างยุง

ตัวอย่างยุง *A. dirus* เพศเมียถูกรวบรวมโดยใช้วิธี human baited landing จากพื้นที่กระจายพันธุ์ 5 แห่ง ซึ่งอยู่ใน 3 ภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ 1) อำเภอเขาชะเมา จังหวัดระยอง 2) อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดนครพนม 3) อำเภอไทรโยค 4) อำเภอทองผาภูมิ และ 5) อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือนสิงหาคม ถึงพฤศจิกายน 2545 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝนและมีการแพร่กระจายของยุงก้นปล่องมากที่สุด ตัวอย่างที่ยังมีชีวิตจะนำมาผ่าตัดเพื่อตรวจหาเชื้อ *Plasmodium* spp. ในทางเดินอาหารส่วนกลางและต่อมน้ำลาย และเก็บเนื้อเยื่อที่เหลือใน 100% ethanol ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป สำหรับตัวอย่าง *A. dirus* สปีชีส์ A และ B ที่ใช้ทดสอบและเปรียบเทียบวิธีการจัดจำแนกสปีชีส์ในเบื้องต้น ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกีฏวิทยา กองมลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อกระทรวงสาธารณสุข จ.นนทบุรี

### 2. การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการกำจัด 100% ethanol โดยการระเหยที่อุณหภูมิห้องหรือบ่มที่ตู้อบอุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  สกัดดีเอ็นเอโดยบดตัวอย่างยุงใน 400  $\mu\text{L}$  lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl และ 0.5% (w/v) SDS) เติม 200 mg/mL proteinase K และนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ  $55^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3-12 ชั่วโมง สกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 400  $\mu\text{L}$  และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเปิดสารละลายใส่ส่วนบน นำไปสกัดซ้ำด้วย chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาตรเท่ากัน และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายส่วนบน ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 100% ethanol ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายด้วย สารละลาย TE และ

ตรวจสอบคุณภาพโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm ด้วยเครื่อง สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$

### 3. การทดสอบการจำแนกสปีชีส์โดยวิธี rDNA ITS2 ASPCR และ SCAR markers

นำ genomic DNA ที่สกัดได้จากยุง *A. dirus* สปีชีส์ A และ B จากกรมควบคุมโรคติดต่อฯ มาทดสอบวิธีการจัดจำแนกสปีชีส์ โดยวิธี rDNA ITS2 ASPCR และ SCAR markers สำหรับวิธี rDNA ITS2 ASPCR ใช้ไพรเมอร์ 4 สาย คือ D-U, D-AC, D-B และ D-D (ตารางที่ 1) ส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25  $\mu\text{L}$  ได้แก่ 20-30 ng genomic DNA, 1.2 mM แต่ละไพรเมอร์, 200 mM dNTPs, 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 unit Taq DNA polymerase และ 10% DMSO ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR เริ่มจาก pre-denaturation ที่  $94^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที และตามด้วย 3 ขั้นตอน คือ denaturation ที่  $94^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่  $55^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่  $72^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 วินาที โดยทั้ง 3 ขั้นตอนจะทำซ้ำเป็นจำนวน 32 รอบ และสิ้นสุดด้วย final extension ที่  $72^{\circ}\text{C}$  10 นาที อีก 1 รอบ ทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA marker

สำหรับวิธี SCAR markers ใช้ไพรเมอร์ 6 สาย ได้แก่ APS1, APS2, ES1, ES2, ET1 และ ET2 รวมในปฏิกิริยาเดียวกัน (multiplex PCR) (ตารางที่ 2) ส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25  $\mu\text{L}$  ได้แก่ 20-30 ng Genomic DNA, 2 mM แต่ละไพรเมอร์, 200 mM dNTPs, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  และ 1 unit Taq DNA polymerase ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย pre-denaturation ที่  $94^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3 นาที และตามด้วย 3 ขั้นตอน คือ denaturation ที่  $94^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่  $55^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่  $72^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้ 40 รอบ สำหรับ

ทั้ง 3 ขั้นตอน และสิ้นสุดด้วย final extension ที่ 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ ทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA marker

## ผลการศึกษา

### 1. การเก็บตัวอย่างยุงและตรวจหาเชื้อ *Plasmodium* spp.

จากการเก็บตัวอย่างยุงก้นปล่องเพศเมีย *A. dirus* โดยจำแนกตามลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น (Rattarithikul and Panthusiri, 1994) จาก 5 พื้นที่ (ตารางที่ 3) ที่เคยมีการรายงานการกระจายพันธุ์ของยุงสายพันธุ์นี้ พบว่าได้ตัวอย่างยุงทั้งสิ้น 327 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างยุงมาผ่าตัดทางเดินอาหารและต่อมน้ำลาย เพื่อตรวจหา *Plasmodium* spp. ระยะ oocysts และ sporozoites ตามลำดับ ปรากฏว่าไม่พบการติดเชื้อจากยุงตัวอย่าง

### 2. การทดสอบเบื้องต้นในการใช้เทคนิค rDNA ITS2 ASPCR และ SCAR markers ในการจำแนก *A. dirus* สปีชีส์ A และ B

เมื่อนำตัวอย่างยุง *A. dirus* สปีชีส์ A และ B ซึ่งเพาะเลี้ยงโดยห้องปฏิบัติการกีฏวิทยา กรมควบคุมโรคติดต่อซึ่งถูกจำแนกสปีชีส์ใช้วิธีทาง cytogenetics ของรุ่นพ่อ-แม่ มาทำการทดสอบวิธีการจัดจำแนกสปีชีส์โดยวิธี rDNA ITS2 ASPCR ซึ่งใช้ 4 ไพร์เมอร์ คือ D-U, D-AC, D-B และ D-D เมื่อใช้คู่ไพร์เมอร์ D-U/D-AC พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอกับตัวอย่าง *A. dirus* สปีชีส์ A เท่านั้น ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน 1 แถบ ขนาด 562 bp (รูปที่ 1) แต่ในบางปฏิกิริยาเกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจนอีก 1 แถบขนาด 360 bp (รูปที่ 4) และเมื่อใช้คู่ไพร์เมอร์ D-U/D-B พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 510 bp กับสปีชีส์ B เท่านั้น (รูปที่ 2)

เมื่อทดสอบการจัดจำแนกสปีชีส์โดยใช้ 6 ไพร์เมอร์ คือ APS1, APS2, ES1, ES2, ET1 และ ET2 วิธี multiplex PCR ด้วย SCAR markers พบว่าเกิดแถบดี

เอ็นเอที่ไม่จำเพาะเจาะจงหลายแถบในตัวอย่างยุงสปีชีส์ A และ B (รูปที่ 3) โดยแถบดีเอ็นเอจำเพาะสำหรับการจำแนกสปีชีส์ A ตามรายงานของ Manguin และคณะ (2002) มีขนาด 471 bp และ 888 bp แต่การทดลองที่ได้ปรากฏชัดเจนเพียงขนาด 471 bp เท่านั้น สำหรับแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับการจำแนกสปีชีส์ B มีขนาด 220 bp ปรากฏชัดเจนอย่างจำเพาะต่อตัวอย่างยุงสปีชีส์ B ถึงแม้ว่ามีการปรับเปลี่ยนสภาวะต่างๆ ในปฏิกิริยา PCR ได้แก่ เพิ่มความเข้มข้น  $MgCl_2$  และ ปรับความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบ และเลือกใช้ไพร์เมอร์ที่ละคู่ คือ ET1/ET2 ในการจำแนก สปีชีส์ A และ ไพร์เมอร์ ET1/APS1 ในการจำแนก สปีชีส์ B ยังคงให้ผลแถบดีเอ็นเอจำนวนมากที่ไม่จำเพาะเจาะจง

ดังนั้นจากผลการศึกษาที่ได้ แสดงให้เห็นว่าการใช้คู่ไพร์เมอร์จากวิธี rDNA ITS2 ASPCR ได้ผลที่ดีกว่าการใช้คู่ไพร์เมอร์จากวิธี SCAR markers ในการจำแนกสปีชีส์ A และ B ของยุง *A. dirus* ทั้งนี้แม้ในการทดลองไม่ได้มีการทดสอบคู่ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อสปีชีส์ C และ D เนื่องจากมีข้อจำกัดจากการไม่มียุงสปีชีส์ C และ D จากห้องปฏิบัติการ แต่ผลในเบื้องต้น คาดว่าวิธี rDNA ITS2 ASPCR น่าจะมีความจำเพาะสูง ดังนั้นจึงเลือกวิธีนี้ในการศึกษาการจำแนกสปีชีส์ของยุง *A. dirus* จากตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆต่อไป

### 3. การจำแนกสปีชีส์ตัวอย่างยุง *A. dirus* ที่เก็บจากพื้นที่ศึกษา โดยวิธี rDNA ITS2 ASPCR

ตัวอย่างยุง *A. dirus* ที่เก็บจากพื้นที่ศึกษาจำนวน 327 ตัวอย่าง ถูกนำมาจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธี rDNA ITS2 ASPCR โดยเลือกใช้ไพร์เมอร์ที่ละคู่ คือ ใช้ D-U/D-AC ในการจำแนกสปีชีส์ A และ C พบว่ายุงสปีชีส์ A แสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะจำนวน 2 แถบ คือ 562 bp และ 360 bp และถ้าเป็นสปีชีส์ C จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 360 bp เท่านั้น (รูปที่ 4b) ซึ่งการทดลองซ้ำให้ผลเช่นเดิม ตัวอย่างที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอได้นำไปทดสอบกับคู่ไพร์เมอร์ D-U/D-B ในการจำแนกสปีชีส์ B และ คู่ไพร์เมอร์ D-U/D-D ในการจำแนกสปีชีส์ D ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 306 bp พบว่ายุงก้นปล่อง *A. dirus* ที่เก็บจากพื้นที่ศึกษา

ส่วนใหญ่เป็นสปีชีส์ A มีจำนวน 300 ตัว สปีชีส์ C จำนวน 11 ตัว และสปีชีส์ D จำนวน 17 ตัว และไม่พบสปีชีส์ B เลย

## สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการเก็บตัวอย่างยุงก้นปล่อง *A. dirus* เพศเมีย จากพื้นที่กระจายพันธุ์ 5 พื้นที่ ระหว่างเดือนสิงหาคม ถึง พฤศจิกายน พ.ศ. 2545 ได้ตัวอย่างยุงทั้งหมด 347 ตัวอย่าง ซึ่งพบจำนวนมากที่สุดจาก อ.เขาชะเมา จังหวัดระยอง จำนวน 121 ตัว จากการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง รองลงมาคือ อ.เภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 102 ตัว จากการเก็บตัวอย่างเพียง 1 ครั้ง มากที่สุด พื้นที่ศึกษาทุกแหล่งอยู่ในภูมิประเทศที่เป็นป่าดิบชื้น มีหมู่บ้านใกล้เคียงจำนวนน้อย แม้บางแหล่งมีการปลูกยางพาราทดแทน แต่ยังคงรักษาสภาพป่าดิบชื้นไว้ จากการสังเกตขณะเก็บตัวอย่างพบว่า จุดที่เก็บตัวอย่างที่อยู่ใกล้บ้านเรือน จะได้จำนวนยุง *A. dirus* น้อยกว่าจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ลึกเข้าไปในป่า แต่ตัวอย่างทั้งหมดไม่พบเชื้อ *Plasmodium* spp. อาจเนื่องจากช่วงเวลาทำการเก็บตัวอย่างเป็นช่วงที่ยังไม่มีการระบาดของโรคมาลาเรียและจำนวนประชาชนที่ทำงานในแหล่งอาศัยของยุงมีจำนวนน้อยลง โอกาสที่เชื้อจะแพร่สู่ยุงสปีชีส์นี้จึงมีน้อย อย่างไรก็ตาม เพื่อให้เข้าใจกลไกการเป็นพาหะของเชื้อ *Plasmodium* spp. ในยุงจำเป็นต้องมีการวิจัยเกี่ยวกับการแพร่กระจายของเชื้อ *Plasmodium* spp. ในยุงพาหะสปีชีส์อื่นๆ เช่น *A. minimus* และ *A. maculatus* ต่อไป

ในการทดสอบวิธีการจำแนกยุง *A. dirus* ออกเป็นสปีชีส์ A B C หรือ D โดยใช้เทคนิค rDNA ITS2 ASPCR และ SCAR markers จากการทดสอบกับยุง *A. dirus* สปีชีส์ A และ B ซึ่งเป็นสต็อกที่เลี้ยงไว้ที่กรมควบคุมโรคติดต่อพบว่าวิธี rDNA ITS2 ASPCR เมื่อใช้ปฏิกิริยาที่รวมไพรเมอร์หลายสายพร้อมกัน (multiplex PCR) ได้แถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเป็นจำนวนมาก (ไม่ได้แสดงผล) ซึ่งแตกต่างจากที่มีรายงาน (Walton et al., 1999) แต่หากปรับสภาวะของปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสมและเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ละคู่

ที่จำเพาะกับสปีชีส์ ได้แก่ คูไพรเมอร์ D-U/D-AC ซึ่งจำเพาะต่อ สปีชีส์ A และ สปีชีส์ C และคูไพรเมอร์ D-U/D-B ที่จำเพาะต่อสปีชีส์ B พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสปีชีส์ A จำนวน 2 แถบ ขนาด 562 bp ซึ่งชัดเจนมาก และแถบดีเอ็นเอขนาด 360 bp ที่จางกว่า คูไพรเมอร์ D-U/D-B พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสปีชีส์ B ขนาด 510 bp

สำหรับการทดสอบวิธี SCAR markers ได้แถบดีเอ็นเอเป็นจำนวนมาก ร่วมกับแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสปีชีส์ A และ B คือขนาด 471 bp และ 220 bp ตามลำดับ ถึงแม้ได้ปรับเปลี่ยนสภาวะของปฏิกิริยาและเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ละคู่แล้ว แต่ยังได้ผลไม่ตรงกับรายงานที่มีก่อนหน้านี้ (Manguin, et al., 2002) ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธี rDNA ITS2 ASPCR

ในการจำแนกสปีชีส์ยุงตัวอย่างจากพื้นที่ศึกษาในภูมิภาคตะวันตก (จังหวัดกาญจนบุรี) ภาคตะวันออก (จังหวัดระยอง) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดนครพนม) โดยนำตัวอย่างยุงมาตรวจสอบกับคูไพรเมอร์ D-U/D-AC เป็นอันดับแรก ถ้าเป็นยุงสปีชีส์ A จะแสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ 562 bp และ 360 bp และถ้าเป็นสปีชีส์ C จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 360 bp เท่านั้น แต่ถ้าผลการทดสอบเป็นลบ จะนำไปทดสอบกับคูไพรเมอร์ D-U/D-B และ D-U/D-D ซึ่งจำเพาะต่อสปีชีส์ B และ A ตามลำดับ ซึ่งพบว่ายุง *A. dirus* ที่เก็บจากพื้นที่ศึกษาส่วนใหญ่เป็นสปีชีส์ A ซึ่งมีจำนวน 300 ตัว สปีชีส์ C จำนวน 11 ตัว และสปีชีส์ D จำนวน 17 ตัว แต่ไม่พบสปีชีส์ B นอกจากนี้ยังพบว่าสปีชีส์ A มีการกระจายในทุกแหล่งเก็บตัวอย่าง ในขณะที่สปีชีส์ C และ D พบเฉพาะจังหวัดกาญจนบุรี โดยพบสปีชีส์ C ที่อำเภอสรีสวัสดิ์ และสปีชีส์ D ที่อำเภอทองผาภูมิ จำนวน 15 ตัว และอำเภอไทรโยค 2 ตัว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่าสปีชีส์ D มีการแพร่กระจายอยู่บริเวณชายแดนไทย-พม่า ส่วนสปีชีส์ B พบที่ภาคใต้ของประเทศไทยและในประเทศมาเลเซีย (Poopittayasataporn and Baimai, 1995) ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ครอบคลุมพื้นที่ดังกล่าว ผลที่ได้จากงานวิจัย

ครั้งนี้เป็นข้อมูลยืนยันว่าคูไพรเมอร์ที่ใช้ในวิธี rDNA ITS2 ASPCR เหมาะสมต่อการใช้จำแนกยุงก้นปล่อง *A. dirus* สปีชีส์ A, B, C และ D ที่น่าจะมีประโยชน์ต่อการศึกษาการแพร่กระจายของยุงก้นปล่องสปีชีส์ต่างๆ ในประเทศไทยต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนความร่วมมือ สกว.-CNRS ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศาสตราจารย์วิสุทธิ์ ใบไม้และ ผศ.ดร.พรพิมล รงค์พันธ์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ กองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข จ.นนทบุรี เจ้าหน้าที่ สำนักงานควบคุมโรคติดต่อที่นำโดยแมลง จ.ขอนแก่น และเจ้าหน้าที่จาก AFRIMS รวมทั้งอาจารย์ยั้งศักดิ์ สวัสดิ์พานิชย์ และคุณเฉลา สำราญดี ในการเก็บตัวอย่างยุง

## เอกสารอ้างอิง

- Baimai, V., Andre, R.G., Harrison, B.A., Kijchalao, U. and Panthusiri, L. 1987. Crossing and chromosomal evidence for two additional sibling species within the taxon *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. **Proceedings of the Entomological Society of Washington** 89: 157-166.
- Baimai, V., Kijchalao U., Sawadwongporn, P., and Green, C.A. 1988a. Geographic distribution and biting behaviour of four species of the *Anopheles dirus* complex (Diptera: Culicidae) in Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 19: 151-161.
- Baimai, V., Harbach, R.E. and Kijchalao, U. 1988b. Cytogenetic evidence of a fifth species within the taxon *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association** 4: 333-338.
- Dutta, P., Bhattacharyya, D.R., Sharma, C.K. and Dutta, L.P. 1989. The importance of *Anopheles dirus* (*A. balabacensis*) as a vector of malaria in northeast India. **Indian Journal of Malariology** 26: 95-101.
- Garros, C., Koekemore, L. L., Kamau, L., Awolola, T. S., Van Bortel, W., Coetzee, M., Coosemans, M. and Manguin, S. 2004. Restriction fragment length polymorphism method for the identification of major African and Asian malaria vectors within the *Anopheles funestus* และ *A. minimus* groups. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 70(3): 260-265.
- Gingrich, J.B., Weatherhead, A., Sattabongkot, J., Pilakasiri, C. and Wirtz, R.A. 1990. Hyperendemic malaria in Thai village: dependence of year-round transmission on focal and seasonally circumscribed mosquito (Diptera: Culicidae) habitats. **Journal of Medical Entomology** 27: 1016-1026.
- Green, C.A., Munstermann, L.E., Tan, S.G., Panyim, S. and Baimai, V. 1992. Population genetic evidence for species A, B, C and D of the *Anopheles dirus* complex in Thailand and enzyme electromorphs for their identification. **Medical and Veterinary Entomology** 6: 29-36.
- Huong, N.T., Sonthayanon, P., Ketterman, A.J. and Panyim, S. 2001. A rapid polymerase chain reaction based method for identification of the *Anopheles dirus* sibling species. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health** 32: 615-620.

- Manguin, S., Kengne, P., Sonnier, L., Harbach, R.E., Baimai, V., Trung, H.D. and Coosemans, M. 2002. SCAR markers and multiplex PCR-based identification of isomorphic species in the *Anopheles dirus* complex in Southeast Asia. **Medical and Veterinary Entomology** 16: 46-54.
- Peyton, E.L. 1989. A new classification for the Leucosphyrus Group of *Anopheles* (Cellia). **Mosquito Systematics** 21: 197-205.
- Poopitayasataporn, A. and Baimai, V. 1995. Polytenechromosome relationships of five species of the *Anopheles dirus* complex in Thailand. **Genome** 38: 426-434.
- Rattanaarithikul, R. and Panthusiri, P. 1994. Illustrated keys to the medically important mosquitoes of Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 25(suppl.1): 1-66.
- Rattanaarithikul, R., Konishi, E. and Linthicum, K.J. 1996. Detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* circumsporozoite antigen in anopheline mosquitoes collected in southern Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 54: 114-121.
- Rosenberg, R. 1982. Forest malaria in Bangladesh. III. Breeding habits of *Anopheles dirus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 31: 192-201.
- Van Bortel, W., Trung, H.D., Roelants, P., Harbach, R.E., Backeljau, T. and Coosemans, M. 2000. Molecular identification of *Anopheles minimus* s.l. beyond distinguishing the members of species complex. **Insect Molecular Biology** 9: 335-340.
- Van Bortel W., Sochanta T., Harbach R.E., Socheat D., Roelants P., Backeljau T. and Coosemans M. 2002. Presence of *Anopheles culicifacies* B in Cambodia established by the PCR-RFLP assay developed for the identification of *Anopheles minimus* species A and C and four related species. **Medical and Veterinary Entomology** 16(3): 329-334.
- Walton, C., Handley, J.M., Kuvangkadilok, C., Collins, F.H., Harbach, R.E., Baimai, V. and Butlin, R.K. 1999. Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. **Medical and Veterinary Entomology** 13: 24-32.

**ตารางที่ 1** รายละเอียดลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกสปีชีส์ยุง *A. dirus* โดยวิธี rDNA ITS2 ASPCR

| ไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'→3' | คู่ไพรเมอร์ | จำแนกสปีชีส์ | แถบดีเอ็นเอที่คาดหมาย |
|----------|-------------------------|-------------|--------------|-----------------------|
| D-U      | CGC CGG GGC CGA GGT GG  | D-U/D-AC    | A            | 562 bp                |
| D-AC     | CAC AGC GAC TCC ACA CG  | D-U/D-B     | B            | 514 bp                |
| D-B      | CGG GAT ATG GGT CGG CC  | D-U/D-AC    | C            | 349 bp                |
| D-D      | GCG CGG GAC CGT CCG TT  | D-U/D-D     | D            | 306 bp                |

**ตารางที่ 2** รายละเอียดลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกสปีชีส์ยุง *A. dirus* โดยวิธี SCAR markers

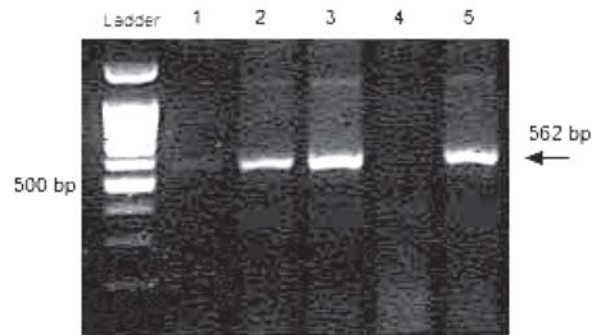
| ไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'→3'    | คู่ไพรเมอร์ | จำแนกสปีชีส์ | แถบดีเอ็นเอที่คาดหมาย |
|----------|----------------------------|-------------|--------------|-----------------------|
| APS1     | AAG TTA ACA CGG ATC ACC GC | ET1/ET2     | A            | 471 bp & 888 bp       |
| APS2     | CGA TCG CCT ATC ATC GAT TT |             |              |                       |
| ES1      | ATC GGC CAA ACA GAT CAC TC | ET1/APS1    | B            | 220 bp                |
| ES2      | ATA TCG GGG AGA GGG AAG G  | ES1/ES2     | C            | 888 bp                |
| ET1      | ATA TCG GAG TAG CAG CGC C  | APS1/APS2   | D            | 555 bp & 929 bp       |
| ET2      | ATA TCG GTC CAC CGA AGA GA |             |              |                       |

ตารางที่ 3 จำนวนยุง *A. dirus* ที่จับได้จากพื้นที่ศึกษา

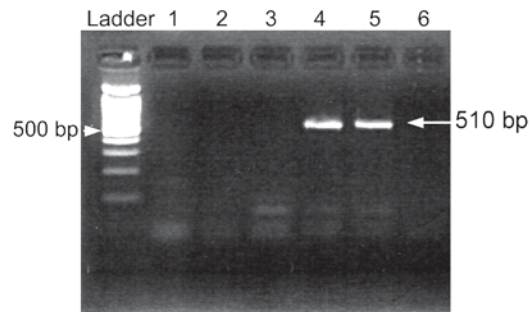
| แหล่งที่ | สถานที่                          | วันที่ทำการเก็บตัวอย่าง     | จำนวนยุง<br><i>A. dirus</i> (ตัว) |
|----------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 1        | อำเภอเขาชะเมา จังหวัดระยอง       | 13-16 สิงหาคม 2545          | 25                                |
|          |                                  | 15-17 ตุลาคม 2545           | 96                                |
| 2        | อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี     | 4-7 กันยายน 2545            | 34                                |
|          |                                  | 30 ตุลาคม -1 พฤศจิกายน 2545 | 9                                 |
| 3        | อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี  | 8-11 ตุลาคม 2545            | 18                                |
| 4        | อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดนครพนม      | 11-14 พฤศจิกายน 2545        | 43                                |
| 5        | อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี | 18-19 พฤศจิกายน 2545        | 102                               |
|          |                                  | รวม (ตัว)                   | 327                               |

ตารางที่ 4 ผลการจำแนกสปีชีส์ยุง *A. dirus* จากพื้นที่ศึกษา โดยวิธี rDNA ITS2 AS-PCR

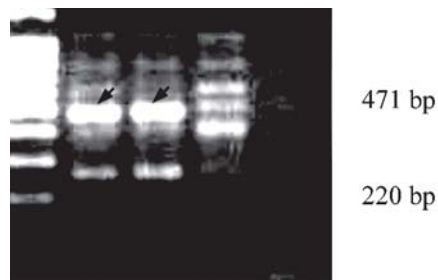
| แหล่งที่  | สถานที่                          | สปีชีส์ |   |    |    | รวม (ตัว) |
|-----------|----------------------------------|---------|---|----|----|-----------|
|           |                                  | A       | B | C  | D  |           |
| 1         | อำเภอเขาชะเมา จังหวัดระยอง       | 121     | - | -  | -  | 121       |
| 2         | อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี     | 41      | - | -  | 2  | 43        |
| 3         | อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี  | 92      | - | 10 | -  | 102       |
| 4         | อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดนครพนม      | 3       | - | -  | 15 | 18        |
| 5         | อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี | 43      | - | -  | -  | 43        |
| รวม (ตัว) |                                  | 300     | 0 | 10 | 17 | 327       |



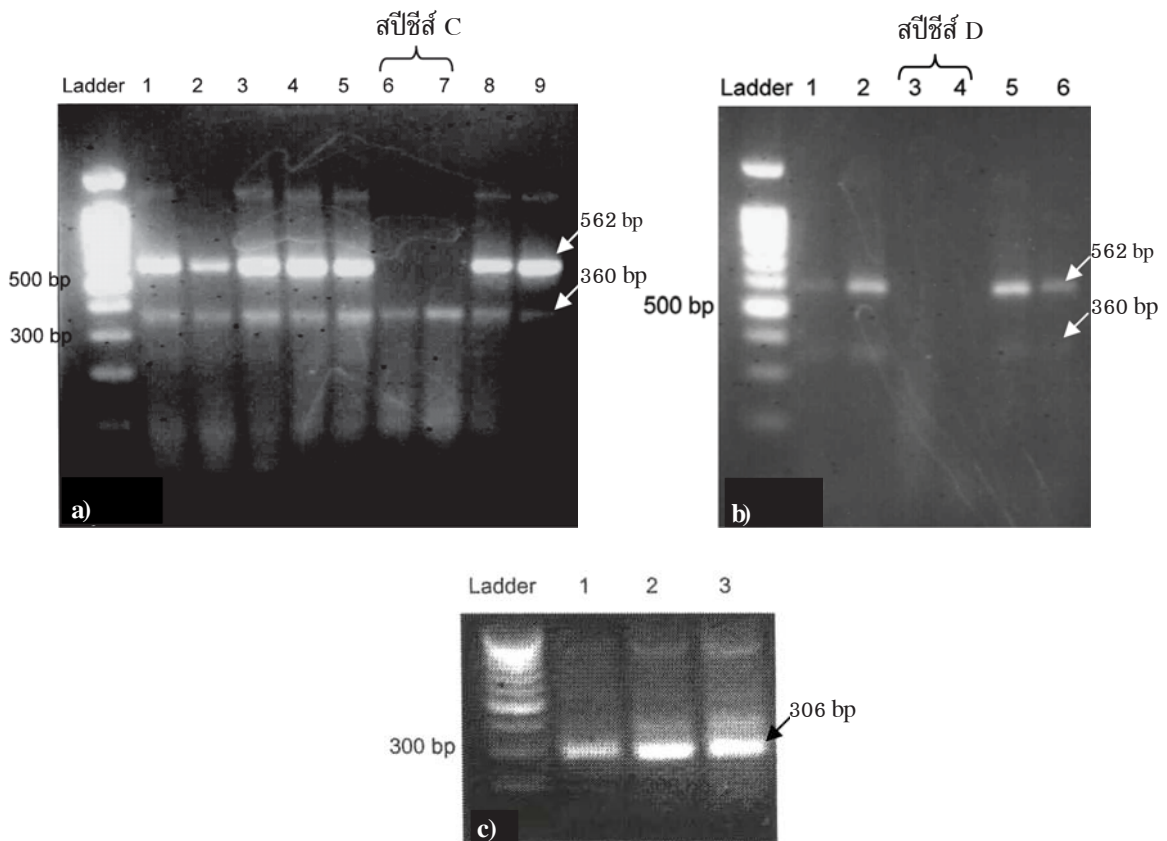
รูปที่ 1 ผลการใช้วิธี rDNA ITS2 ASPCR ด้วยไพรเมอร์คู่ D-U/D-AC ในการทดสอบกับยุง *A. dirus* สปีชีส์ A (แถวที่ 2, 3 และ 5) และ สปีชีส์ B (แถวที่ 1 และ 4) ซึ่งแสดงผลบน 1.5% agarose gel พบแถบดีเอ็นเอ ขนาด 562 bp จากตัวอย่างยุง *A. dirus* สปีชีส์ A เท่านั้น



รูปที่ 2 ผลการจำแนกยุง *A. dirus* สปีชีส์ A และ B โดยใช้วิธี rDNA ITS2 ASPCR ด้วยไพรเมอร์คู่ D-U/D-B แสดงผลบน 1.5% agarose gel พบแถบดีเอ็นเอขนาด 510 bp เกิดขึ้นเฉพาะตัวอย่างยุง *A. dirus* สปีชีส์ B เท่านั้น โดยในการทดลองใช้ดีเอ็นเอจากยุง *A. dirus* สปีชีส์ A (แถวที่ 1, 2 และ 3) สปีชีส์ B (แถวที่ 4) และใช้ดีเอ็นเอจากทั้งสปีชีส์ A และ B (แถวที่ 5) ส่วนชุดควบคุม (negative control) แสดงในแถวที่ 6



รูปที่ 3 ผล Multiplex PCR โดยใช้ SCAR markers ในการจำแนกยุง *A. dirus* สปีชีส์ A และ B แสดงผลบน 1.5% agarose gel พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ *A. dirus* สปีชีส์ A (แถวที่ 1 และ 2) ขนาด 471 bp (หัวลูกศรชี้) และ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสปีชีส์ B (แถวที่ 3) ขนาด 222 bp (หัวลูกศรชี้) และชุดควบคุม (negative control) (แถวที่ 4)



**รูปที่ 4** ตัวอย่างผลการจำแนกสปีชีส์ยุง *A. dirus* จากตัวอย่างในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรีด้วยวิธี rDNA ITS2 AS-PCR บน 1.5% agarose gel

- เป็นการใช้คู่ไพรเมอร์ D-U/D-AC ในการจำแนก สปีชีส์ A และ C โดยสปีชีส์ A ได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 562 bp และ 360 bp (แถวที่ 1-5 และ 8-9) ส่วนสปีชีส์ C ได้ดีเอ็นเอขนาด 360 bp เพียง 1 แถบ (แถวที่ 6-7)
- แสดงผลของบางตัวอย่างที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ D-U/D-AC (แถวที่ 3-4)
- เมื่อใช้ดีเอ็นเอจากแถวที่ 3-4 รูป b ไปทดสอบกับคู่ไพรเมอร์ D-U/D-D ซึ่งจำเพาะต่อสปีชีส์ D ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 306 bp