

การพัฒนาผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลง ในระดับห้องปฏิบัติการ

Development of a mosquito repellent spray for insecticide-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes under laboratory conditions

จักรวาล ชมภูศรี¹Jakkrawarn Chompoosri¹จริยา ครุบุตร¹Jariya Krutbut¹ธัญญภัทษณ์ มากรินทร์¹Thanyapak Makruen¹เมเนกา วิวน์²Menaka Vivon²พิไลลักษณ์ อัครไพบูลย์ โอภาตะ¹Pilailak Akkapaiboon Okada¹¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข¹National Institute of Health²สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย²Bureau of Cosmetics and Hazardous Substances,

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Department of Medical Sciences

DOI: 10.14456/dcj.2026.37

Received: October 16, 2025 | Revised: April 21, 2026 | Accepted: May 18, 2026

บทคัดย่อ

ยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงมีรายงานในทุกจังหวัดของประเทศไทยทำให้ผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดยุงมีประสิทธิภาพลดลงในการควบคุมและป้องกันโรคที่นำโดยยุงลายบ้าน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงในระดับห้องปฏิบัติการ โดยพัฒนาสเปรย์กันยุงที่มีสารสำคัญเป็นอิคาริดิน (Icaridin) นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารอิคาริดินด้วยวิธี gas chromatography-flame ionization detection ทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนในสัตว์ทดลองชนิดกระต่ายตาม OECD guideline No.404 สอดคล้องกับ OECD GLP ทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลง โดยดัดแปลงวิธี Repellent testing ในห้องปฏิบัติการ และตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลง ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และ DNA sequencing จากการศึกษา พบว่า สเปรย์กันยุงมีสารอิคาริดินร้อยละ 9.78 โดยน้ำหนัก ไม่ก่อการระคายเคืองทางผิวหนังในสัตว์ทดลองชนิดกระต่าย และให้ค่าเฉลี่ยระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้านที่ดื้อสารเคมีกำจัดแมลงจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา ได้นานระหว่าง 9.9 (SD 1.3) ถึง 12.0 (SD 0) ชั่วโมง และพบมีฐาน 9.50 (IQR 3) ถึง 12.0 (IQR 0) ชั่วโมง โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$) และพบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 1016 (V1016G) ของยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัด โดยมีค่าความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *para* ระหว่าง 0.20-0.33 ผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานตามภารกิจและงานสนับสนุนของหน่วยงานได้

ติดต่อผู้พิมพ์: จักรวาล ชมภูศรี

อีเมล: jakkrawarn.c@gmail.com

Abstract

Insecticide-resistant *Aedes aegypti* mosquitoes have been documented in all provinces of Thailand, reducing the effectiveness of insecticidal products against these vectors. This study aimed to develop and evaluate a mosquito repellent spray against insecticide-resistant mosquitoes under laboratory conditions. The project involved formulating a mosquito-repellent spray with Icaridin as the active ingredient. The formulation was quantified for Icaridin using gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID). An acute dermal irritation study was conducted on rabbits in accordance with OECD Guidelines 404 “Acute dermal irritation/corrosion” and OECD GLP standards. The efficacy of the spray against insecticide-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes was assessed using modified repellency testing procedures. Polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing were performed to identify mutations in the *para* gene (V1016G) in the mosquitoes used in the study. The results demonstrated that the mosquito repellent spray contained 9.78% w/w Icaridin and met the criteria for the skin irritation test in rabbits. Furthermore, the spray provided repellency time against insecticide-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes from six provinces, ranging from 9.9 (SD 1.3) to 12.0 (SD 0) hours, with a median repellency time between 9.50 (IQR 3) and 12.0 (IQR 0) hours. The median repellency time of the spray differed significantly across mosquitoes from six provinces (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). A point mutation at amino acid position 1016 (V1016G) in the *para* gene was identified in mosquitoes from all six provinces, with mutation frequencies ranging from 0.20 to 0.33. The developed repellent spray targeting insecticide-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes will be valuable for tasks related to vector control and the supportive functions of the Department of Medical Sciences.

Correspondence: Jakkrawarn Chompoonsri

E-mail: jakkrawarn.c@gmail.com

คำสำคัญ

สเปรย์กันยุง; ยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลง; ยีน *para*

Keywords

mosquito repellent spray; insecticide-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes; *para* gene

บทนำ

ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) เป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออก โรคไข้ชิก้า และโรคไข้ปวดข้อยุงลายหรือชิคุนกุนยา ที่มีความสำคัญทางสาธารณสุข ปัจจุบันยังมีรายงานผู้ป่วยด้วยโรคที่นำโดยยุงลายบ้านอย่างต่อเนื่อง⁽¹⁾ ปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุทำให้ไม่สามารถป้องกันและควบคุมโรคที่นำโดยยุงลายบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพคือ ยุงลายบ้านดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงหลายชนิดจากกลุ่ม organochlorine เช่น DDT กลุ่ม organophosphate เช่น malathion กลุ่ม carbamate เช่น propoxur และกลุ่ม pyrethroid เช่น cypermethrin, cyfluthrin, 458

deltamethrin, lambda-cyhalothrin, bifenthrin, permethrin, etofenprox และ alpha-cypermethrin ในหลายพื้นที่ทั่วประเทศไทย⁽²⁾ นอกจากนี้ มีรายงานพบยุงลายบ้านจากหลายจังหวัดในประเทศไทยที่ดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์มีการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่สังเคราะห์โปรตีนโซเดียมแชนเนลที่เป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสารไพรีทรอยด์ โดยมีการแทนที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 989 (S989P), 1016 (V1016G) และ 1534 (F1534C)⁽³⁻⁴⁾ ซึ่งมีรายงานยืนยันว่าการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งดังกล่าวมีผลทำให้ลดความไวของโปรตีนโซเดียมแชนเนลในการจับกับสารไพรีทรอยด์สังเคราะห์⁽⁵⁾

สารไพรีทรอยด์จึงออกฤทธิ์ได้ช้าหรือไม่ออกฤทธิ์ ทำให้ยุงลายบ้านไม่ตายและเกิดภาวะการดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ ซึ่งส่งผลให้ไม่สามารถใช้สารไพรีทรอยด์ในการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคที่นำโดยยุงลายบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อิคาริดิน (Icaridin) หรือ Picaridin หรือ KBR 3023) ชื่อทางเคมี 2-(2-hydroxyethyl)-1-piperidine carboxylic acid 1-methylpropyl ester) เป็นสารไล่แมลงที่เป็นเคมีสังเคราะห์ (synthetic chemical insect repellents) ที่องค์การอนามัยโลก แนะนำว่ามีความปลอดภัยในการใช้ไล่แมลงสูง กลไกในการไล่แมลงที่แท้จริงยังไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าอิคาริดินไปรบกวนการรับกลิ่นของแมลงเช่นเดียวกับ DEET และมีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงและเห็บ⁽⁶⁻⁷⁾ อิคาริดินไม่มีกลิ่น ไม่เหนียว และไม่ทำลายพลาสติกหรือเสื้อผ้า ในปัจจุบันมีการใช้อย่างแพร่หลายในยุโรป สหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย⁽⁸⁾ ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับนำมาใช้ป้องกันยุงกัดแทนการใช้สารเคมีกำจัดแมลง เนื่องจากมีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่ออวัยวะภายใน หรือปฏิกิริยาที่ผิวหนัง และแนะนำให้ใช้ในเด็กตั้งแต่อายุ 2 ปีขึ้นไป⁽⁹⁾

จากปัญหายุงลายบ้านดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงหลายชนิดและเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม่สามารถควบคุมและป้องกันโรคที่นำโดยยุงลายบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ อิคาริดินเป็นสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นจะสามารถเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับนำไปใช้ลดความเสี่ยงจากการเจ็บป่วยและเสียชีวิตด้วยโรคที่นำโดยยุงลายบ้าน

วัสดุและวิธีการศึกษา

รูปแบบการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง ที่พัฒนาผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ และดำเนิน

การวิจัยในช่วงเดือนมกราคม 2567 - กันยายน 2568

ประชากร

ลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายบ้านตัวเต็มวัยจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษาที่มีรายงานยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลง⁽²⁾ คือ กาญจนบุรี (GIS: 13° 48' 36" N 99° 16' 52" E) จันทบุรี (GIS: 12° 42' 19" N 102° 14' 15" E) ชุมพร (GIS: 9° 57' 4" N 99° 4' 38" E) พิษณุโลก (GIS: 16° 44' 24" N 99° 56' 57" E) นครปฐม (GIS: 13° 44' 18" N 100° 7' 13" E) และ นครราชสีมา (GIS: 14° 38' 47" N 102° 10' 26" E)

กลุ่มตัวอย่าง

ลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายบ้านตัวเต็มวัยจากการสุ่มตัวอย่างบ้านเรือนร้อยละ 15-30 ของจำนวนบ้านเรือนทั้งหมดในแต่ละพื้นที่ศึกษา⁽¹⁰⁾

ขั้นตอนการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. จัดทำหนังสือผ่านผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ถึงผู้อำนวยการโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลใน 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา เพื่อชี้แจงวัตถุประสงค์ของงานวิจัยและขอความอนุเคราะห์เข้าปฏิบัติงานวิจัยในพื้นที่ศึกษา

2. ขอความยินยอมจากเจ้าของบ้านในพื้นที่ศึกษาเพื่อเข้าปฏิบัติงานวิจัย โดยชี้แจงวัตถุประสงค์ของงานวิจัย และขอให้กรอกแบบฟอร์มยินยอม (consent form) ให้เข้าเก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายบ้านตัวเต็มวัยในบ้านเรือน

3. เก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงลายบ้านโดยใช้หลอดดูด (dropper) และเก็บตัวอย่างยุงลายบ้านตัวเต็มวัยโดยใช้อุปกรณ์โอบแมลง

4. นำตัวอย่างลูกน้ำยุงลายบ้านและตัวอย่างยุงลายบ้านตัวเต็มวัย กลับมายังห้องปฏิบัติการของกลุ่มกีฏวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

5. เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงลายบ้านและยุงลายบ้านตัวเต็มวัยตามวิธีมาตรฐานการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการในห้องเลี้ยงแมลงของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เพื่อให้ได้ยุงลายบ้านรุ่นลูกรุ่นที่ 1 สำหรับนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

6. ทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา โดยวิธีขององค์การอนามัยโลก (WHO susceptibility test)⁽¹¹⁾ โดยเตรียมสารเคมีกำจัดแมลง 7 ชนิด จาก 3 กลุ่มสารเคมีกำจัดแมลง (สารเคมีกำจัดแมลงซื้อจาก Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany) ในอะซีโตน ที่ความเข้มข้นตามข้อมูลที่รายงานยุงลายบ้านต่อสารเคมีกำจัดแมลง⁽²⁾ ดังนี้ กลุ่ม organophosphate 1 ชนิด คือ malathion ร้อยละ 0.8 กลุ่ม Carbamate 1 ชนิด คือ propoxur ร้อยละ 0.1 และกลุ่ม pyrethroid 5 ชนิด คือ alpha-cypermethrin ร้อยละ 0.08 cypermethrin ร้อยละ 0.22 deltamethrin ร้อยละ 0.05 lambda-cyhalothrin ร้อยละ 0.05 และ permethrin ร้อยละ 0.75 จากนั้นนำกระดาดกรองที่ชุบสารเคมีกำจัดแมลงแต่ละชนิดมาใส่กระบอกทดสอบและให้ยุงลายบ้านจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา รุ่นลูกรุ่นที่ 1 (F1) และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่เป็นกลุ่มเปรียบเทียบสัมผัส เป็นเวลา 60 นาที และตรวจสอบอัตราการตายที่ 24 ชั่วโมง ตามวิธีการทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงขององค์การอนามัยโลก⁽¹¹⁾

7. พัฒนาสเปรย์กันยุงลายบ้านต่อสารเคมีกำจัดแมลง โดยพัฒนาสูตรสเปรย์กันยุงเบื้องต้นเพื่อให้ได้สูตรที่เหมาะสมที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ไม่ต่อสารเคมีกำจัดแมลงได้นานมากกว่า 7 ชั่วโมง จึงนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันยุงลายบ้านสายพันธุ์ต่อสารเคมีกำจัดแมลงจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษาที่มีความแข็งแรงกว่า โดยได้สูตรสเปรย์กันยุงที่เหมาะสมที่มีสารสำคัญเป็นอคาริโนที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก (%w/w) และมีส่วนผสมอื่นเป็นสารที่ให้ความชุ่มชื้น อ่อนนุ่ม แก่ผิว และทำให้สเปรย์กันยุงเคลือบผิวได้นาน ได้แก่ propylene glycol, dicaprylyl ether, glycerin ในตัวทำละลาย ethyl alcohol น้ำปราศจากอออน (deionized water) และแต่งกลิ่นด้วยน้ำหอม (fragrance) เป็น

สารละลายใส ไม่มีสี และมีค่า pH เท่ากับ 5

8. วิเคราะห์ปริมาณสารอคาริโนในสเปรย์กันยุงด้วยวิธี gas chromatography-flame ionization detection, GC-FID ด้วยวิธีมาตรฐาน SOP 06-02-406 (GC) ที่ได้รับการรับรองมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025: 2017 นำสารมาตรฐานอคาริโน (ยี่ห้อ Chem Service ความบริสุทธิ์ >99%) มาเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐาน ทำการเจือจางและปรับปริมาตรด้วย 2-propyl alcohol ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.05 ถึง 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นช่วงของการใช้งาน (working range) สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน ส่วนการเตรียมสารละลายตัวอย่างสเปรย์กันยุง ซึ่งตัวอย่างสเปรย์กันยุง 0.5 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 2-propyl alcohol จนครบปริมาตร จากนั้นเจือจางสารละลายตัวอย่างสเปรย์กันยุงให้อยู่ในช่วงการใช้งาน เช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างสเปรย์กันยุง ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย internal standard ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 2-propyl alcohol จนครบปริมาตร เก็บในขวดแก้ว ขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างสเปรย์กันยุงไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID (ยี่ห้อ Agilent Technologies Model 7890, USA) โดยใช้คอลัมน์ DB -1: 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm film thickness ทำการตั้งอุณหภูมิส่วนที่ฉีดสาร 240 องศาเซลเซียส

ส่วนอุณหภูมิคอลัมน์จะตั้งโปรแกรมใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้นด้วยอัตราเร็ว 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 325 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และตั้งอุณหภูมิส่วนของตัวตรวจวัด 330 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาตรการฉีด 1 ไมโครลิตร เมื่อสภาวะของเครื่อง GC พร้อมใช้งาน ตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability) โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานอคาริโน ที่มีความเข้มข้น

ชั้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 ขั้ว ค่ารวม %RPD ของ peak area ratio, retention time (RT), Theoretical Plate count และค่า tailing factor โดยเกณฑ์ยอมรับค่าการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบดังนี้ %RPD (peak area ratio) $\leq 3\%$, %RPD (RT) $\leq 3\%$, theoretical plate count (EP), $N > 20,000$ และ tailing factor 0.8–1.2 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค ค่าสหสัมพันธ์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination, R^2) โดยค่า r และ R^2 ที่ยอมรับได้ต้องไม่น้อยกว่า 0.995

การวิเคราะห์ปริมาณสารอิคาริดินในตัวอย่างสเปรย์ป้องกันยุง ดำเนินการ 4 ขั้ว แล้วทำการประมวลผลโดยสร้างกราฟจากการ plot ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอิคาริดิน เป็นสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ค่ารวมผลออกมาเป็นปริมาณสารอิคาริดินในตัวอย่างสเปรย์กันยุงได้จากการคำนวณค่า slope กับ intercept ของสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเป็นปริมาณสารอิคาริดิน ในตัวอย่างเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก (%w/w) โดยมีเกณฑ์ค่าความคลาดเคลื่อนของสารสำคัญในวัตถุดิบทรายที่ระบุไว้เป็นร้อยละของน้ำหนักต่อน้ำหนัก (%w/w) ที่มากกว่า 2.5% ถึง 10% โดยอนุญาตให้มีได้ไม่เกิน $\pm 10\%$ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง เกณฑ์ค่าคลาดเคลื่อนจากปริมาณที่กำหนดไว้ในวัตถุดิบทรายที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้รับผิดชอบ พ.ศ.2555 ในราชกิจจานุเบกษา วันที่ 6 กรกฎาคม 2555⁽¹²⁾

9. ทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนังในสัตว์ทดลองชนิดกระต่าย ตาม OECD-guideline No.404 สอดคล้องกับ OECD GLP โดยหน่วยงานศึกษาวิจัย (Test Facility: TF) ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่สอดคล้องกับหลักการ OECD GLP (Good Laboratory Practice)⁽¹²⁾ เตรียมตัวอย่างทดสอบหรือสเปรย์กันยุงและน้ำปราศจากเชื้อ (Sterile water) เป็นตัวควบคุมอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร นำมาทาบบนผิวหนังสัตว์ทดลอง

ชนิดกระต่าย เพศผู้ตัวเดียวกันแต่ละคนละตำแหน่งจำนวน 3 ตัว (0.5 มิลลิลิตร/ตัว) เพียงครั้งเดียว ระยะเวลาการสัมผัสนาน 4 ชั่วโมง ตรวจหาอาการผื่นแดงและอาการบวมในสัตว์ทดลองทุกตัวเป็นเวลา 14 วัน ประเมินคะแนนการระคายเคืองผิวหนังร่วมกับลักษณะและความรุนแรงของรอยโรค รวมถึงความสามารถในการกลับคืนสู่สภาพเดิมหรือไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ หากอาการยังคงอยู่จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาสังเกตอาการ 14 วัน ให้พิจารณาว่าตัวอย่างทดสอบนั้นเป็นสารระคายเคือง⁽¹²⁾ โดยมีเกณฑ์การตัดสินการระคายเคือง ดังนี้ ระดับการระคายเคือง 0–<1.5 หมายถึง ไม่ระคายเคือง, ≥ 1.5 –<2.3 หมายถึง ระคายเคืองเล็กน้อย และ ≥ 2.3 –<4.0 หมายถึง ระคายเคือง

10. ทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สเปรย์ในการป้องกันยุงลายบ้านที่ดื้อสารเคมีกำจัดแมลงจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ไม่ดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลง เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ เวลา 06.00–18.00 น. โดยดัดแปลงวิธีมาตรฐาน Repellent testing (SOP 13-02-336) อาสาสมัคร 6 คน ทาสเปรย์กันยุง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนผิวหนังหน้าแขนทดสอบให้ทั่วพื้นที่ 30 ตารางเซนติเมตร ยื่นแขนทดสอบ ซึ่งถูกสวมทับด้วยของกระดาดขนาด 16 ซม. x 40 ซม. ที่มีช่องขนาด 3 ซม. x 10 ซม. เข้าไปในกรงยุงที่มียุงลายบ้าน เพศเมีย อายุ 4–5 วัน และยังไม่เคยกินเลือดมาก่อนจำนวน 250 ตัว/กรง นับจำนวนยุงที่ลงเกาะก้นบนแขนทดสอบภายในเวลา 3 นาที บันทึกจำนวนยุง อุณหภูมิ ความชื้น และความเข้มแสงลงในแบบบันทึกผลการทดสอบ ดำเนินการทดสอบซ้ำโดยยื่นแขนเข้าไปในกรงยุง ทุก ๆ 30 นาที จนถึงช่วงเวลาที่มียุงตัวที่ส่องลงก้นผิวหนังในบริเวณพื้นที่ 30 ตารางเซนติเมตร นับเป็นช่วงเวลาทั้งหมดประสิทธิภาพในการป้องกันยุงกัด ดำเนินการทดสอบนานสูงสุด 12 ชั่วโมง โดยทดสอบ 4 ครั้ง ต่อยุงลายบ้าน 1 จังหวัด ใช้สเปรย์ที่ปราศจากสารอิคาริดินเป็นกลุ่มควบคุมผลลบหาบนแขนเปรียบเทียบกับอีกข้างหนึ่งและดำเนินการเช่นเดียวกับแขนทดสอบ หาค่าเฉลี่ยระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้าน

จากอาสาสมัครทั้งหมดและแสดงระยะเวลาป้องกันยุงเป็นชั่วโมง

11. ตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในยุงลายบ้านที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์กันยุงในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) โดยสกัด genomic DNA ของตัวอย่างยุงลายบ้านเพศเมียที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์กันยุงในห้องปฏิบัติการ จำนวน 30 ตัว/จังหวัด และยุงลายบ้านเพศเมียดึงพันธุ์ห้องปฏิบัติการ จำนวน 30 ตัว โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) ตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *para* บริเวณเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสารไพรีทรอยด์ ด้วยวิธี conventional PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs Inc.) ชุดไพรเมอร์: 20 uM AaSCF20 (5'-GA-CAATGTGGATCGCTTCCC -3') และ 20 uM AaSCR21 (5'- GCAATCTGGCTTGTTAACTTG -3') และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)⁽¹³⁾

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; SD) หรือ มัธยฐานและพิสัยระหว่างควอไทล์ สำหรับอัตราตายของยุงลายบ้านจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา (ร้อยละ) และระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้านที่ต่อสู้อาสาสมัครกำจัดแมลง (ชั่วโมง) จากอาสาสมัคร 6 คน

สถิติอนุมาน กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ทดสอบการแจกแจงปกติของข้อมูลด้วย D'Agostino-Pearson omnibus test พบข้อมูลไม่เป็นไปตามการแจกแจงปกติ จึงใช้สถิตินอนพารามेटริก (Non-parametric statistics) ได้แก่ Kruskal-Wallis test

และ Dunn's multiple comparison test โดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism ถ้ากลุ่มเปรียบเทียบมีอัตราตายของยุงลายบ้านระหว่างร้อยละ 5-20 ให้ปรับค่า Abbott's formula⁽¹⁴⁾ แต่ถ้ามีอัตราตายมากกว่าร้อยละ 20 ต้องทำการทดสอบใหม่ และวิเคราะห์ค่าความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *para* จากจำนวนตัวอย่าง DNA ของยุงลายบ้านที่พบการกลายพันธุ์ของยีน/จำนวนตัวอย่าง DNA ของยุงลายบ้านที่วิเคราะห์ทั้งหมด

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรมการวิจัย

การวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หมายเลขควบคุมโครงการ 67-37 วันที่ 18 มกราคม 2567-30 กันยายน 2569 และคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รหัสเอกสารรับรอง DMS-EC020 วันที่ 9 สิงหาคม 2567 - 8 สิงหาคม 2569

ผลการศึกษา

ความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา

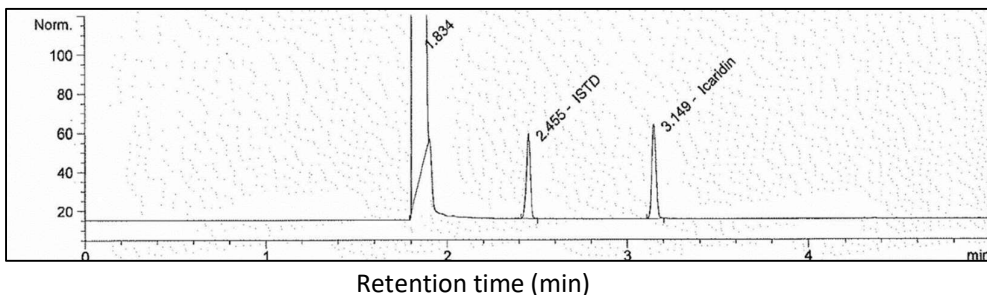
จากการทดสอบความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง 7 ชนิด ของยุงลายบ้านจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา โดยวิธีของ WHO susceptibility test พบว่า ยุงลายบ้านจาก จ.จันทบุรี เริ่มติดต่อ malathion โดยมีอัตราตายเฉลี่ยร้อยละ 96.0 (SD 3.3) ส่วนยุงลายบ้านจาก จ.นครปฐม ติดต่อ malathion โดยมีอัตราตายเฉลี่ยร้อยละ 65.0 (SD 2.0) ส่วนยุงลายบ้านจากอีก 4 จังหวัด ยังมีความไวต่อสารดังกล่าว โดยมีอัตราตายร้อยละ 100 ยุงลายบ้านจาก 3 จังหวัด คือ จันทบุรี นครปฐม และพิษณุโลก ติดต่อ propoxur โดยมีอัตราตายระหว่างร้อยละ 87.0 (SD 2.0) ถึง 89.0 (SD 3.8) ส่วนยุงลายบ้านจากอีก 3 จังหวัด ยังมีความไวต่อสารดังกล่าว โดยมีอัตราตายร้อยละ 100 นอกจากนี้ ยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษาติดต่อ

สารไพรีทรอยด์ทั้ง 5 ชนิด โดยมีอัตราตายเฉลี่ยระหว่างร้อยละ 1.0 (SD 2.0) ถึง 55.0 (SD 6.0) ส่วนยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการมีความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงทั้ง 7 ชนิด โดยมีอัตราตายร้อยละ 100 ส่วนแอซีโทนที่เป็นตัวควบคุมผลลบให้อัตราตายของยุงลายบ้านจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษาและยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ ร้อยละ 0 ที่ 24 ชั่วโมง

ปริมาณสารอิคาริดินในสเปรย์กันยุง

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารอิคาริดินในสเปรย์กันยุงด้วยวิธี gas chromatography-flame ionization detection ตามภาพที่ 1 จำนวน 4 ซ้ำ พบว่า มีปริมาณสาร

อิคาริดิน ในสเปรย์กันยุง ที่ร้อยละ 9.726173, 9.739276, 9.793958 และ 9.843073 ที่ Retention time (min) เท่ากับ 3.149, 3.150, 3.147 และ 3.147 นาที ตามลำดับ โดยคำนวณค่าเฉลี่ยของสารอิคาริดิน ได้ร้อยละ 9.77562 หรือประมาณร้อยละ 9.78 โดยน้ำหนัก (w/w) และ %RPD เท่ากับ 0.88 ซึ่งผ่านเกณฑ์ค่าความคลาดเคลื่อนของสารสำคัญที่อนุญาตให้มีได้ไม่เกิน $\pm 10\%$ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ที่ต้องมีปริมาณสารอิคาริดิน ในตัวอย่างสเปรย์กันยุงระหว่างร้อยละ 9.0-11.0 โดยน้ำหนัก (w/w)

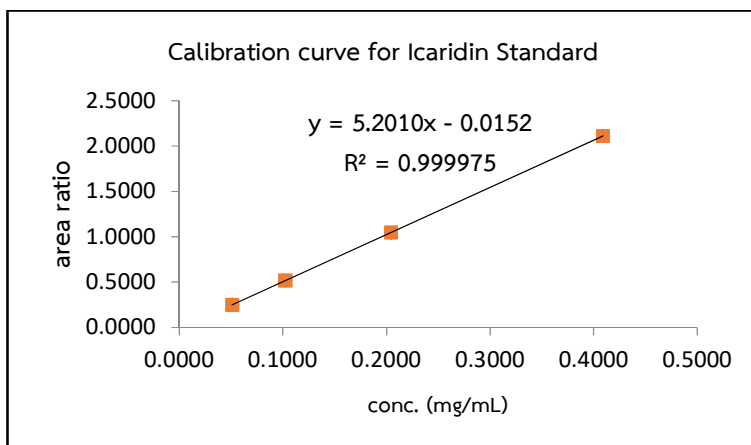


ภาพที่ 1 การวิเคราะห์ปริมาณสารอิคาริดินในสเปรย์กันยุงเทียบกับสารมาตรฐานอิคาริดิน (ISTD) ด้วยวิธี gas chromatography-flame ionization detection

Figure 1 Analysis of Icaridin quantification in mosquito repellent spray compared with an Icaridin standard (ISTD) using gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID)

กราฟมาตรฐานของสารอิคาริดินที่เตรียมสารละลายมาตรฐานอิคาริดิน ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.999988

และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) เท่ากับ 0.999975 โดยค่า r และ R^2 ผ่านเกณฑ์ยอมรับ ตามภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์แบบเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานอิคาริดิน

Figure 2 Linear calibration curve for Icaridin Standard

การระคายเคืองทางผิวหนังในสัตว์ทดลองชนิดกระต่าย

จากการทดสอบการระคายเคืองทางผิวหนัง/การกัดกร่อนในสัตว์ทดลองชนิดกระต่ายตาม OECD-guideline No.404 สอดคล้องกับ OECD GLP ของสเปรย์กันยุง พบว่า มีค่าเฉลี่ยอาการผื่นแดง (average erythema) เท่ากับ 1.33 (SD 0.58), 1.33 (SD 0.58) และ 1.00 (SD 0) ส่วนค่าเฉลี่ยอาการบวมน้ำ (average oedema) เท่ากับ 0.67 (SD 0.58), 1.00 (SD 0) และ 1.00 (SD 0) ซึ่งค่าการระคายเคือง น้อยกว่า 1.5 โดยแปลผลได้ว่าสเปรย์กันยุงไม่ก่อการระคายเคืองทางผิวหนังในสัตว์ทดลองชนิดกระต่าย

ประสิทธิภาพของสเปรย์ในการป้องกันยุงลายบ้านตื้อสารเคมีกำจัดแมลงจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ไม่ตื้อสารเคมีกำจัดแมลงในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์ในการป้องกันยุงลายบ้านตื้อสารเคมีกำจัดแมลงจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ไม่ตื้อสารเคมีกำจัดแมลงในห้องปฏิบัติการ โดยดัดแปลงวิธี Repellent testing พบว่า สเปรย์ให้ค่าเฉลี่ยระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้านตื้อสารเคมีกำจัดแมลงจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา อยู่ระหว่าง 9.9 (SD 1.3)

ถึง 12.0 (SD 0) ชั่วโมง และพบมียุงฐาน 9.50 (IQR 3) ถึง 12.0 (IQR 0) ชั่วโมง และป้องกันยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ไม่ตื้อสารเคมีกำจัดแมลงได้นานถึง 12.0 (SD 0) ชั่วโมง และพบมียุงฐาน 12.0 (IQR 0) ชั่วโมง ซึ่งมีมียุงฐานของระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้าน 9 คู่ ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$) โดยมี 5 คู่ เป็นมียุงฐานของระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้านตื้อสารเคมีกำจัดแมลงจากจังหวัดพิษณุโลกที่แตกต่างกับมียุงฐานของระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้านตื้อสารเคมีกำจัดแมลงจาก 4 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี ชุมพร นครปฐม และนครราชสีมา และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ไม่ตื้อสารเคมีกำจัดแมลง ส่วนอีก 4 คู่ เป็นมียุงฐานของระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้านตื้อสารเคมีกำจัดแมลงจากจังหวัดจันทบุรีที่แตกต่างกับมียุงฐานของระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้านตื้อสารเคมีกำจัดแมลงจาก 3 จังหวัด คือ ชุมพร นครปฐม นครราชสีมา และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ไม่ตื้อสารเคมีกำจัดแมลง ตามตารางที่ 1 ส่วนสเปรย์ที่ปราศจากสารอิคาริดิน ที่เป็นกลุ่มควบคุมผลลบ (negative control) ให้ระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้านจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ 0 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 ระยะเวลาป้องกันยุงของผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงในการป้องกันยุงลายบ้านต่อสู้สารเคมีกำจัดแมลงจาก 6 จังหวัด และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ไม่ต่อสู้สารเคมีกำจัดแมลง โดยดัดแปลงวิธี Repellent testing

Table 1 Repellency time of a mosquito repellent spray against laboratory-reared wild-type and insecticide-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes from six provinces, using modified repellency testing procedures

Subject	Test	Repellency time (h) against <i>Ae. aegypti</i> mosquitoes						
		Laboratory	Kanchanaburi	Chanthaburi	Chumphon	Phitsanulok	Nakhon Pathom	Nakhon Ratchasima
1	1	12.0	11.0	8.0	10.0	8.0	10.0	12.0
	2	12.0	12.0	8.0	8.5	8.5	10.0	12.0
	3	12.0	12.0	8.0	11.5	8.0	11.5	12.0
	4	12.0	12.0	8.0	11.5	8.0	11.5	12.0
2	1	12.0	11.5	12.0	11.0	9.5	10.5	12.0
	2	12.0	11.0	9.5	12.0	12.0	10.5	12.0
	3	12.0	12.0	12.0	12.0	9.5	12.0	12.0
	4	12.0	12.0	12.0	12.0	10.5	12.0	12.0
3	1	12.0	11.5	9.0	12.0	9.5	12.0	12.0
	2	12.0	11.5	9.0	12.0	9.5	12.0	12.0
	3	12.0	12.0	9.5	12.0	9.5	12.0	12.0
	4	12.0	12.0	9.5	12.0	9.5	12.0	12.0
4	1	12.0	11.5	9.0	12.0	9.5	12.0	12.0
	2	12.0	11.5	9.0	12.0	9.5	12.0	12.0
	3	12.0	12.0	9.5	12.0	9.5	12.0	12.0
	4	12.0	12.0	9.5	12.0	9.5	12.0	12.0
5	1	12.0	11.5	10.5	12.0	10.0	12.0	12.0
	2	12.0	11.0	10.0	12.0	9.5	12.0	12.0
	3	12.0	11.5	11.0	12.0	10.5	12.0	12.0
	4	12.0	12.0	10.5	12.0	10.5	12.0	12.0
6	1	12.0	10.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
	2	12.0	10.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
	3	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
	4	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Mean								
repellency time (SD) (h)		12.0 (0)	11.6 (0.6)	10.1 (1.5)	11.7 (0.8)	9.9 (1.3)	11.7 (0.7)	12.0 (0)
Median		12.0*	11.8*,***	9.5**,***	12.0*	9.5**	12.0*	12.0*
repellency time (IQR) (h)		(12.0-12.0)	(11.5-12.0)	(9.0-12.0)	(12.0-12.0)	(9.5-10.5)	(11.6-12.0)	(12.0-12.0)

Note: Significant pairwise differences in median repellency times identified by Dunn's multiple comparison test;

* Laboratory vs Kanchanaburi, Laboratory vs Chumphon, Laboratory vs Nakhon Pathom, Laboratory vs Nakhon Ratchasima, Kanchanaburi vs Chumphon, Kanchanaburi vs Nakhon Pathom, Kanchanaburi vs Nakhon Ratchasima, Chumphon vs Nakhon Pathom, Chumphon vs Nakhon Ratchasima, Nakhon Pathom vs Nakhon Ratchasima

** Chanthaburi vs Phitsanulok

*** Kanchanaburi vs Chanthaburi

การกลายพันธุ์ของยีน *para* ในยุงลายบ้าน จาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษาที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์กันยุงในห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *para* ในยุงลายบ้านจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษาที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์กันยุงในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี conventional PCR และ DNA sequencing พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *para* ของยุงลายบ้านจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษาและยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการมีขนาดประมาณ 614–630 bp ขึ้นอยู่กับ intron polymorphism (234–250 bp) จากการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี DNA sequencing แล้วนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาการ

กลายพันธุ์ของยีน *para* โดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ในฐานข้อมูล GenBank และรายงานที่ผ่านมา จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ของยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติ V1016 หรือ Ref. 1 ยุงลายบ้านสายพันธุ์กลายพันธุ์ V1016G หรือ Ref. 2 ตามภาพที่ 3.1 และยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่เป็นสายพันธุ์ปกติ V1016 ตามภาพที่ 3.2 พบว่า ยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษามีการกลายพันธุ์ V1016G ตามภาพที่ 3.3 โดยมีความถี่การกลายพันธุ์ระหว่าง 0.20–0.33 ตามตารางที่ 3

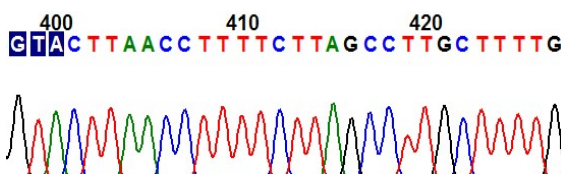
V/G L N L F L A L L L

Ref.1—GTACTTAACCTTTTCTTAGCCTTGCTTTTG—

Ref.2—GGACTTAACCTTTTCTTAGCCTTGCTTTTG—

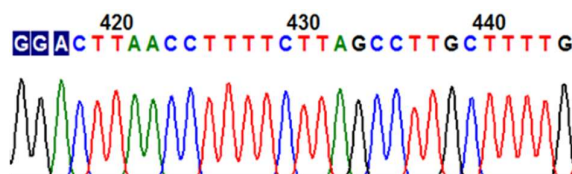
ภาพที่ 3.1 Ref. 1 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ของยุงลายบ้านสายพันธุ์ปกติ (GenBank: AB914690.1) และ Ref. 2 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* ของยุงลายบ้านที่มีการกลายพันธุ์ V1016G (GenBank: AB914689.1)

Figure 3.1 Reference 1 corresponds to a wild-type strain of *Ae. aegypti* (GenBank: AB914690.1), while Reference 2 pertains to *Ae. aegypti* possessing the V1016 mutation (GenBank: AB914689.1).



ภาพที่ 3.2 ยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่เป็นสายพันธุ์ปกติ (V1016)

Figure 3.2 The wild-type laboratory strain of *Ae. aegypti* (V1016)



ภาพที่ 3.3 ยุงลายบ้านในพื้นที่ศึกษาทั้ง 6 จังหวัดมีการกลายพันธุ์ V1016G (GTA --> GGA)

Figure 3.3 *Ae. aegypti* mosquitoes from six provinces exhibiting the V1016G mutation, characterized by the nucleotide change from GTA to GGA

ภาพที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *para* บริเวณ S6 segment ใน domain II ของโปรตีนโซเดียมแชนเนลของยุงลายบ้าน (exon 20)

Figure 3 Partial nucleotide sequences of the *para* gene at the S6 segment in domain II (IIS6) of the voltage-gated sodium channel protein in *Ae. aegypti* (exon 20).

ตารางที่ 3 ความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *para* ในยุงลายบ้านที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์กันยุงในห้องปฏิบัติการ

Table 3 Mutation frequencies of the *para* gene in *Ae. aegypti* mosquitoes used in laboratory efficacy testing of a mosquito repellent spray

Amino acid position	Mutation frequencies of the <i>para</i> gene in <i>Ae. aegypti</i> mosquitoes						
	(Number of positive DNA sequences/Total number of analyzed DNA sequences)						
	Laboratory	Kanchanaburi	Chanthaburi	Chumphon	Phitsanulok	Nakhon Pathom	Nakhon Ratchasima
V1016G	0 (0/30)	0.27 (8/30)	0.33 (10/30)	0.23 (7/30)	0.30 (9/30)	0.20 (6/30)	0.23 (7/30)

วิจารณ์

การดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมของยุงลายบ้าน โดยมีการกลายพันธุ์ของยีน *para* บริเวณเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสารไพรีทรอยด์ ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 989 (S989P), 1016 (V1016G) และ 1534 (F1534C)⁽³⁻⁴⁾ ในโปรตีนโซเดียมแชนเนล ทำให้ไม่สามารถใช้สารไพรีทรอยด์ในการควบคุมยุงลายบ้าน และป้องกันการระบาดของโรคไข้เลือดออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการพัฒนาเกล็ดกั้วทำให้ยุงลายบ้านมีความแข็งแรงและทนทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงมากกว่ายุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนเป้าหมายของสารไพรีทรอยด์ และมีความไวต่อสารดังกล่าว งานวิจัยนี้ได้ศึกษาอัตราการตายของยุงลายบ้านเป็นหลักหลังสัมผัสสารเคมีกำจัดแมลงซึ่งได้เชื่อมโยงกับการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 989 (S989P) และ 1016 (V1016G) ในยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษาที่เคยรายงานมาก่อน⁽¹⁰⁾ อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *para* เพียงตำแหน่งเดียว คือ ตำแหน่งกรดอะมิโน 1016 (V1016G) ในยุงลายบ้านจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษาที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสเปรย์กันยุงในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากในหลายจังหวัดของประเทศไทยพบยุงลายบ้านมีอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ V1016G สูงและกระจายในวงกว้าง ขณะที่การกลายพันธุ์ S989P มักพบร่วมกับ V1016G โดยไม่ค่อยพบเพียงตำแหน่งเดียว⁽¹⁵⁾ ส่วนการกลายพันธุ์ F1534C กระจายแตกต่างกัน

ตามพื้นที่ แต่ผลต่อการดื้อสารเคมีกำจัดแมลงเด่นน้อยกว่า โดยมีรายงานพบการกลายพันธุ์ F1534C ในยุงลายบ้านไม่มีความสัมพันธ์กับการดื้อต่อ deltamethrin^(3-4,16) ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่า ยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษาดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ทั้ง 5 ชนิด โดยมีอัตราการตายระหว่างร้อยละ 1-55 ตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกที่กำหนดว่ายุงดื้อสารเคมีกำจัดแมลงมีอัตราการตายต่ำกว่าร้อยละ 90 ที่ 24 ชั่วโมง หลังสัมผัสสารเคมีกำจัดแมลงเป็นเวลา 60 นาที ด้วยเหตุผลที่มีรายงานยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์ระดับพันธุกรรมในหลายจังหวัดของประเทศไทยนี้ อาจทำให้ผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดยุงหลายชนิดที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมีประสิทธิภาพลดลงในการป้องกันกำจัดยุงและทำให้มีรายงานผู้ป่วยด้วยโรคที่นำโดยยุงลายบ้านจากหลายพื้นที่ทั่วประเทศไทยทุกปี⁽¹⁾

งานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกว่าผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงที่มีสารสำคัญเป็นอิมิดาไทรโนที่ความเข้มข้นร้อยละ 9.78 โดยน้ำหนัก มีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงจาก 6 จังหวัด ได้นานระหว่าง 9.9 (SD 1.3) ถึง 12.0 (SD 0) ชั่วโมง และพบมัธยฐาน 9.50 (IQR 3) ถึง 12.0 (IQR 0) ชั่วโมง และป้องกันยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ไม่ดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงได้นานถึง 12.0 (SD 0) ชั่วโมง และพบมัธยฐาน 12.0 (IQR 0) ชั่วโมง โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงลายบ้านจากจังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดจันทบุรีมีผลกระทบค่อนข้างมากต่อระยะเวลา

ป้องกันยุง โดยผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงที่พัฒนาขึ้นสามารถป้องกันยุงได้นาน 9.9 ชั่วโมงและ 10.1 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่ายุงลายบ้านจากอีก 4 จังหวัดที่การติดต่อดังกล่าวมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่าผลกระทบน้อยต่อระยะเวลาป้องกันยุง โดยผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงสามารถป้องกันยุงได้นาน 11.6 ถึง 12.0 ชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงหรือเท่ากับระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการที่ผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงสามารถป้องกันยุงได้นานถึง 12.0 ชั่วโมง โดยผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงที่พัฒนาขึ้นให้ระยะเวลาป้องกันยุงได้นานกว่าผลิตภัณฑ์กันยุงที่มีสารอีคริธินเป็นสารสำคัญที่จำหน่ายในท้องตลาดมีประสิทธิภาพในการป้องกันยุง (ยุงลายพันธุ์ที่ไม่ดื้อสารเคมีกำจัดแมลง) ได้นานไม่เกิน 7 ชั่วโมง แต่ไม่มีข้อมูลระบุที่ผลจากผลิตภัณฑ์ว่าสามารถป้องกันยุงต่อดังกล่าวได้หรือไม่หรือได้นานกี่ชั่วโมง นอกจากนี้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ของยุงลายบ้านที่ดื้อสารเคมีกำจัดแมลงในแต่ละจังหวัดที่มีผลต่อความแตกต่างของระยะเวลาป้องกันยุงแล้ว ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอาสาศัตรู เช่น กลิ่นเหงื่อและแบคทีเรียบนผิวหนังเป็นตัวดึงดูดยุง หากมีเหงื่อออกมาก สารป้องกันยุงจะจางลงเร็ว อัตราการเผาผลาญที่ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่างกัน หากมีอาสาศัตรูที่มีการเผาผลาญสูง จะปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่าทำให้ดึงดูดยุงได้ดีกว่า และอุณหภูมิร่างกาย หากร่างกายที่ร้อนกว่าหรือมีอุณหภูมิสูงจะดึงดูดยุงได้มากกว่า⁽¹⁷⁻¹⁸⁾

การกลายพันธุ์ของยีน *para* ในโปรตีนโซเดียม แชนเนลที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 1016 (V1016G) ที่พบในตัวอย่าง DNA ของยุงลายบ้านจากทั้ง 6 จังหวัด พื้นที่ศึกษาที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สเปรย์ในการป้องกันยุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงในห้องปฏิบัติการ มีความถี่การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 1016 อยู่ระหว่าง 0.20 ถึง 0.33 โดยพบว่ายุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงจากจังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดจันทบุรี มีความถี่การกลายพันธุ์ เท่ากับ 0.30 และ 0.33 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ายุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงจากอีก 4 จังหวัด ที่มีค่าความถี่การกลายพันธุ์

V1016G อยู่ระหว่าง 0.20 ถึง 0.27 ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ยุงลายบ้านจากทั้ง 2 จังหวัดมีความแข็งแรงกว่า จึงกัดเร็ว และให้ระยะเวลาป้องกันยุงได้น้อยกว่ายุงลายบ้านดื้อสารเคมีกำจัดแมลงจากอีก 4 จังหวัด จากค่าความถี่การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 1016 ทำให้ทราบความชุกของการกลายพันธุ์แบบ G (V1016G หรือ G1016G หรือ แบบผสม V1016G และ G1016G ในกลุ่มประชากรยุงลายบ้านในแต่ละจังหวัดพื้นที่ศึกษา ในประชากรยุงลายบ้านที่ประมาณร้อยละ 20-33 โดยประชากรยุงลายบ้านส่วนใหญ่ใน 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา ยังเป็นยุงลายบ้านแบบปกติที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 1016 (V1016V) แม้ว่าความชุกของการกลายพันธุ์แบบ G ในประชากรยุงลายบ้านในทั้ง 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา ยังอยู่ในระดับที่ไม่สูง อย่างไรก็ตาม เป็นเรื่องที่น่ากังวลว่าในอนาคตยุงลายบ้านเพศผู้และยุงลายบ้านเพศเมียที่มีการกลายพันธุ์แบบ V1016G สามารถผสมพันธุ์กันทำให้ได้ยุงลายบ้านรุ่นลูกที่มีการกลายพันธุ์แบบ G1016G ร้อยละ 100 ได้ และจะกลายเป็นกลไกหลักในการดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ในพื้นที่ดังกล่าว จากผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาที่พบยุงลายบ้านจากหลายจังหวัดทั่วประเทศที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนดังกล่าว^(3-4,16,19) อย่างไรก็ตาม การไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *para* ที่ตำแหน่ง 1016 ซึ่งเป็นตำแหน่งเด่นที่พบอัตราสูงในยุงลายบ้านดื้อสารไพรีทรอยด์จากหลายจังหวัดของประเทศไทยและมีผลต่อการดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ที่ชัดเจน⁽¹⁵⁾ อาจแสดงว่าการดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ของยุงลายบ้านส่วนใหญ่จากทั้ง 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา ไม่ได้เกิดจากการดื้อที่ตำแหน่งยีนเป้าหมาย (target-site resistance) ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ (knockdown resistance - kdr) แต่เป็นการดื้อแบบเมตาบอลิก (metabolic resistance) ซึ่งเป็นกลไกหลักในยุงดื้อต่อสารไพรีทรอยด์ โดยมีการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์กำจัดสารพิษ เช่น Cytochrome P450 monooxygenases (CYP450), Carboxylesterases (CCEs) และ Glutathione S-transferases (GSTs) โดยกลไกนี้ทำให้ยุงสามารถสลายสารไพรีทรอยด์ได้รวดเร็ว

ก่อนที่สารจะไปจับกับโปรตีนโซเดียมแซนแนล ทำให้ยุงไม่ตาย⁽²⁰⁾

ผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงที่พัฒนาขึ้นให้ค่าเฉลี่ยระยะเวลาป้องกันยุงลายบ้านต่อสารเคมีกำจัดแมลงได้นานมากกว่า 2 ชั่วโมง ที่เป็นเกณฑ์ผ่านการตัดสินใจของผลิตภัณฑ์ป้องกันยุงในงานบริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในงานตามภารกิจ โดยสามารถใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) ในงานบริการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ป้องกันยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการและงานวิจัยด้านการพัฒนานวัตกรรมผลิตภัณฑ์ป้องกันยุงลายบ้านต่อสารเคมีกำจัดแมลงเพื่อให้การทดสอบมีคุณภาพและน่าเชื่อถือ ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและแม่นยำ รวมถึงจะเป็นการประกันคุณภาพของผลิตภัณฑ์ป้องกันยุงว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงลายบ้านต่อสารเคมีกำจัดแมลงได้จริง นอกจากนี้ ยังสามารถนำไปช่วยเหลือประชาชนในพื้นที่ประสบอุทกภัยและพื้นที่เสี่ยงโรคไข้เลือดออก เพื่อลดความเสี่ยงจากการถูกยุงลายบ้านกัด การติดเชื้อไวรัส และการระบาดของโรคที่นำโดยยุงลายบ้านได้

สรุป

ผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงลายบ้านต่อสารเคมีกำจัดแมลงจาก 6 จังหวัดพื้นที่ศึกษา ได้นานระหว่าง 9.9 (SD 1.3) ถึง 12.0 (SD 0) ชั่วโมง และพบมัธยฐาน 9.50 (IQR 3) ถึง 12.0 (IQR 0) ชั่วโมง โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานตามภารกิจและงานสนับสนุนของหน่วยงานได้

ข้อเสนอแนะ

1. ห้องปฏิบัติการของกลุ่มกีฏวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ควรนำผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงที่พัฒนาขึ้นไปใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) ในงานบริการทดสอบผลิตภัณฑ์ทา

กันยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการเพื่อที่ผู้รับบริการจะได้รายงานผลการทดสอบที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ สำหรับนำไปขึ้นทะเบียนนวัตกรรมรายกับทางสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) เพื่อจัดจำหน่ายต่อไป

2. ห้องปฏิบัติการของกลุ่มกีฏวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ควรพัฒนาต่อยอดผลิตภัณฑ์สเปรย์กันยุงและถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ภาคเอกชนเพื่อประโยชน์เชิงพาณิชย์และนำไปสู่การขับเคลื่อนเศรษฐกิจของประเทศ

3. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สามารถนำไปสนับสนุนให้แก่ประชาชนกลุ่มเสี่ยงโรคไข้เลือดออก ประชาชนที่ประสบภัยน้ำท่วม และประชาชนที่อพยพลี้ภัยต่างๆ เพื่อลดความเสี่ยงจากการเจ็บป่วยและเสียชีวิตด้วยโรคที่นำโดยยุงลายบ้าน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลในพื้นที่ศึกษา 6 จังหวัด ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Department of Disease Control (TH), Division of Epidemiology. Digital disease surveillance (DDS) [Internet]. Nonthaburi. 2025 [cited 2025 Oct 13]. Available from: https://dvis3.ddc.moph.go.th/t/DDC_CENTER_DOE/views/_Weekly/sheet13?%3Aembed=y&%3AisGuestRedirectFromVizportal=y&%3Aorigin=card_share_link (in Thai)
2. Department of Disease Control (TH), Division of Vector borne Diseases. Reporting of insecticide susceptibility in mosquito vectors [internet]. Nonthaburi. 2025 [cited 2025 Oct 13 Available from: <https://drive.google.com/drive/fold->

- ers / 1Kzxz3iEgyAzNpIDSEWJ0QTy_eVoS7FJY (in Thai)
3. Plernsub S, Saingamsook J, Yanola J, Lumjuan N, Tippawangkosol P, Walton C, et al. Temporal frequency of knockdown resistance mutations, F1534C and V1016G, in *Aedes aegypti* in Chiang Mai city, Thailand and the impact of the mutations on the efficiency of thermal fogging spray with pyrethroids. *Acta Trop.* 2016;162: 125–32. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.06.019.
 4. Plernsub S, Saingamsook J, Yanola J, Lumjuan N, Tippawangkosol P, Sukontason K, et al. Additive effect of knockdown resistance mutations, S989P, V1016G and F1534C, in a heterozygous genotype conferring pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Parasit Vectors.* 2016;9:417. doi: 10.1186/s13071-016-1713-0.
 5. Saavedra-Rodriguez K, Maloof FV, Campbell CL, Garcia-Rejon J, Lenhart A, Penilla P, et al. Parallel evolution of vgsc mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. *Sci Rep.* 2018;8(1):6747. doi: 10.1038/s41598-018-25222-0.
 6. Ferreira H, Cabral R, Queiroga T, Guedes P, Lourenço de Assis A, de Moura Barbosa T, et al. The repellency effect of icaridin nanostructural solution applied on cotton knitting fabric against *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol Res.* 2022;121(9):2673–81. doi: 10.1007/s00436-022-07595-4.
 7. Buchel K, Bendin J, Gharbi A, Rahlenbeck S, Dautel H. Repellent efficacy of DEET, Icaridin, and EBAAP against *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis* nymphs (Acari, Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis.* 2015;6(4):494–8. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.03.019.
 8. Lupi E, Hatz C, Schlagenhauf P. The efficacy of repellents against *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Ixodes* spp. – a literature review. *Travel Med Infect Dis.* 2013;11(6):374–411. doi: 10.1016/j.tmaid.2013.10.005.
 9. Food and Drug Administration (TH). Insect repellent sprays and lotions should be used with caution, especially for young children [Internet]. Nonthaburi. 2025 [cited 2025 Oct 10]. Available from: https://oryor.com/media/information/graphic/media_printing/1841?ref=search (in Thai)
 10. Sri-ard B. Preliminary research. 10th ed. Bangkok: Suweriyasan Printing; 2017. (in Thai)
 11. World Health Organization. Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations. Interim guidance for entomologists [Internet]. [cited 2025 Oct 1]. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204588/WHO_ZIKV_VC_16.1_eng.pdf?sequence=2&isAllowed=y
 12. Ministry of Public Health (TH). Notification of the Ministry of Public Health: Criteria for Permissible Variations from the Specified Amounts of Active Ingredients in Hazardous Substances under the Responsibility of the Food and Drug Administration, B.E. 2555 (2012). Nonthaburi: Ministry of Public Health; 2012. (in Thai)
 13. Organization for Economic Cooperation and Development. Test No. 404: Acute dermal irritation/corrosion [Internet]. [cited 2025 Sep 15]. Available from: https://www.oecd.org/en/publications/test-no-404-acute-dermal-irritation-corrosion_9789264242678-en.html

14. Chompoosri J, Khamsawads C, Krutbut J, Makruen T, Rojanawiwat A. Development of natural compound aerosol spray against genetic fipronil and pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* mosquitoes in dengue risk areas in Thailand. Dis Control J [Internet]. 2024 [cited 2025 Sep 10];50(1):98-110. Available from <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/DCJ/article/view/263519/181722> (in Thai)
15. World Health Organization. Standard operating procedure for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO tube tests [Internet]. [cited 2026 Apr 20]. Available from: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/3e38221a-42e7-4a52-979a-018d519d8286/content>
16. Chung HH, Cheng IC, Chen YC, Lin C, Tomita T, Teng HJ. Voltage-gated sodium channel intron polymorphism and four mutations comprise six haplotypes in an *Aedes aegypti* population in Taiwan. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13(3):e0007291. doi: 10.1371/journal.pntd.0007291.
17. Stenhouse SA, Plernsub S, Yanola J, Lumjuan N, Dantrakool A, Choochote W, et al. Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand. Parasit Vectors. 2013;6:253. doi: 10.1186/1756-3305-6-253.
18. Bello JE, Carde RT. Compounds from human odor induce attraction and landing in female yellow fever mosquitoes (*Aedes aegypti*). Sci Rep. 2022;12:15638. doi: 10.1038/s41598-022-19254-w.
19. De Obaldia ME, Morita T, Dedmon LC, Boehmler DJ, Jiang CS, Zeledon EV, et al. Differential mosquito attraction to humans is associated with skin-derived carboxylic acid levels. Cell. 2022;185(22):4099-116. doi: 10.1016/j.cell.2022.09.034.
20. Chompoosri J, Tacharoenmuang R, Khamsawads C, Methawanitphong N. Insecticide susceptibility of genetically pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* mosquitoes. Dis Control J. 2021 [cited 2025 Sep 15];47(Suppl 2):1303-18. Available from: <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/DCJ/article/view/247959/171652> (in Thai)
21. Schluep SM, Buckner EA. Metabolic resistance in permethrin-resistant Florida *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Insects. 2021;12(10):866. doi: 10.3390/insects12100866.