

การพัฒนาวิธี tetra-primer allele specific PCR (tetra-primer AS-PCR)  
สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ของยีนโซเดียมแชนเนลที่เกี่ยวข้องกับการดื้อทาน  
ต่อสารไพรีทรอยด์ในยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus*

Development of tetra-primer allele specific PCR (tetra-primer AS-PCR) for the detection of L1014F  
mutation in sodium channel gene associated with pyrethroid resistance  
in mosquito *Culex quinquefasciatus*

■ เสาวนีย์ ชำนาญยา      ปรชญา สมบูรณ์      นงคราญ ลำจวน      จินตนา ยาโนละ\*  
Saowanee Chamnanya      Pradya Somboon      Nongkran Lumjuan      Jintana Yanola\*

<sup>1</sup>ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่

<sup>1</sup>Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

<sup>2</sup>สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่

<sup>2</sup>Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

<sup>3</sup>แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่

<sup>3</sup>Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

\* ผู้รับผิดชอบบทความ (Email: jinny\_011@hotmail.com, jintana.y@cmu.ac.th)

\* Corresponding author (Email: jinny\_011@hotmail.com, jintana.y@cmu.ac.th)

Received July 2016

Accepted as revised August 2016

### Abstract

**Introduction:** Extensive use of insecticides in both agriculture and public health pest control has led to resistance of several mosquito species and other insects. *Culex quinquefasciatus*, an important mosquito vector of urban Bancroftian filariasis, has been reported to be resistant to pyrethroid insecticides in several countries including Thailand. Knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid in the *Cx. quinquefasciatus* is usually associated with L1014F mutation in sodium channel gene.

**Objectives:** To develop the tetra-primer allele specific PCR (tetra-primer AS-PCR) assay for detection of L1014F mutation in *Cx. quinquefasciatus* and to compare the sensitivity and specificity of this assay with DNA sequencing method.

**Materials and methods:** The deltamethrin resistant *Cx. quinquefasciatus* (Cq\_CM\_R) mosquitoes were extracted and used as a DNA template for the optimization of tetra-primer AS-PCR assay. PCR amplification of sodium channel gene and DNA sequencing were performed. Genotyping results of L1014F mutation for laboratory and wild-caught *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes obtained from the tetra-primer AS-PCR and DNA sequencing methods were compared.

**Results:** Tetra-primer AS-PCR method was successfully developed to detect L1014F mutation. Testing of 136 laboratory and wild-caught *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes, the developed assay provided the genotyping results consistent with DNA sequencing. Sensitivity and specificity of tetra-primer AS-PCR method were comparable to those of DNA sequencing method.

**Conclusion:** Developed tetra-primer AS-PCR assay is a simple PCR-based method with high sensitivity and specificity to detect L1014F mutation in *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes. This assay is useful for rapid detection of L1014F mutation which is essential for monitoring resistance to pyrethroid in vector control program.

*Bull Chiang Mai Assoc Med Sci* 2016; 49(3): 389-399. Doi: 10.14456/jams.2016.29

**Keywords:** *Culex quinquefasciatus*, knock down resistance, pyrethroid resistance, tetra-primer AS-PCR

## บทคัดย่อ

**บทนำ:** การใช้สารเคมีกำจัดแมลงอย่างแพร่หลายในการควบคุมแมลงทั้งด้านการเกษตรและทางการแพทย์ ก่อให้เกิดการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงในยุงและแมลงหลายชนิด ยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) เป็นยุงพาหะที่สำคัญของโรคพยาธิฟิลาเรียในเขตเมือง สามารถต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงชนิดไพรีทรอยด์ในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย การต้านทานแบบ knockdown resistance (*kdr*) ต่อสารไพรีทรอยด์ของยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* มีความเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ L1014F ในยีนโซเดียมแชนแนลซึ่งเป็นตำแหน่งออกฤทธิ์

**วัตถุประสงค์:** เพื่อพัฒนาวิธี tetra-primer allele specific PCR (tetra-primer AS-PCR) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* และเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธีนี้กับวิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

**วัสดุและวิธีการ:** สกัดดีเอ็นเอของยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* สายพันธุ์ Cq\_CM\_R ซึ่งต้านทานต่อสารเตลต้าเมทริน และใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับศึกษาสถานะที่เหมาะสมของวิธี tetra-primer AS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F จากนั้นเพิ่มขยายชิ้นส่วนยีนโซเดียมแชนแนลด้วยวิธี PCR และตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ สุดท้ายเปรียบเทียบผลการตรวจจีโนมไทป์ของการกลายพันธุ์ L1014F ที่ได้จากวิธี tetra-primer AS-PCR และวิธีตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

**ผลการศึกษา:** วิธี tetra-primer AS-PCR เป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาจนสำเร็จเพื่อใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F โดยทดสอบในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการและสายพันธุ์ที่จับจากภาคสนาม จำนวน 136 ตัว ผลการตรวจลักษณะจีโนมไทป์ของการกลายพันธุ์ L1014F ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ ให้ผลถูกต้องตรงกับผลการตรวจด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ อีกทั้งความไวและความจำเพาะของวิธี tetra-primer AS-PCR สามารถเทียบเคียงได้กับวิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

**สรุปผลการศึกษา:** วิธี tetra-primer AS-PCR ที่พัฒนาขึ้น เป็นวิธีการตรวจดีเอ็นเออย่างง่าย มีความไวและความจำเพาะสูง สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ L1014F ในยุง *Cx. quinquefasciatus* วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสม ทำได้รวดเร็ว เป็นประโยชน์สำหรับตรวจติดตามการต้านทานต่อสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์ในการควบคุมยุงโดยใช้สารเคมีกำจัดแมลง

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2559; 49(3): 389-399 Doi: 10.14456/jams.2016.29

**คำรหัส:** ยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* การต้านทาน knockdown การต้านทานต่อสารไพรีทรอยด์ tetra-primer AS-PCR

## บทนำ

ยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* เป็นยุงพาหะที่สำคัญของโรคพยาธิฟิลาเรีย ชนิด Bancroftian filariasis ซึ่งเกิดจากเชื้อปรสิต *Wuchereria bancrofti* ทั่วโลกพบการระบาดใน 73 ประเทศและมีผู้ป่วยประมาณ 120 ล้านคน รวมถึงประเทศในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งมีรายงานพบผู้ติดเชื้อในประเทศเมียนมาร์ อินโดนีเซีย และไทย<sup>1,2</sup> ประเทศไทยมีพื้นที่ระบาดของโรคอยู่ในจังหวัดแถบแนวชายแดนไทย-เมียนมาร์ ได้แก่ แม่ฮ่องสอน ตาก และกาญจนบุรี มียุงลายป่า (*Aedes niveus* subgroup) เป็นพาหะ<sup>3,4</sup> เชื้อพยาธิฟิลาเรีย *W. bancrofti* มีรายงานการตรวจพบในแรงงานชาวเมียนมาร์ที่ทำงานในประเทศไทย มีอุบัติการณ์การติดเชื้อร้อยละ 2 ถึง 8<sup>4,5</sup> ยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ซึ่งเป็นยุงที่พบมากในแหล่งชุมชนเมืองหรือชุมชนแออัด เป็นพาหะสำคัญในเขตเมืองของหลายประเทศ<sup>6-8</sup> ปัจจุบัน ประเทศไทยได้เข้าสู่ประชาคมอาเซียน มีการเคลื่อนย้ายของกลุ่มคนจากประเทศที่มีการระบาดของโรคเข้ามาใน

ประเทศไทย ประชากรเหล่านั้นอาจนำเชื้อปรสิตนี้เข้ามา ทำให้ประชากรไทยมีโอกาสติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น และอาจทำให้เกิดการระบาดของโรคได้ในประเทศไทย เนื่องจากยุงชนิดนี้ในประเทศไทยมีความไวต่อการรับเชื้อ (susceptibility) ได้ดี<sup>6-8</sup> ดังนั้น จึงควรมีแนวทางการเฝ้าระวัง ป้องกันและควบคุมโรค โดยเฉพาะการควบคุมยุงพาหะนำโรค

ปัจจุบันการใช้สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์เป็นหนึ่งในแนวทางที่สำคัญในการควบคุมยุงพาหะนำโรคของประเทศไทย<sup>9</sup> เนื่องจากมีฤทธิ์ต่อแมลงสูงแต่มีพิษต่อสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมต่ำ อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีกำจัดแมลงในปริมาณมากและเป็นระยะเวลานาน ทั้งในทางการแพทย์เพื่อควบคุมยุงหรือแมลงพาหะนำโรค และทางเกษตรเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช ทำให้มีการต้านทานต่อสารเคมีของยุงหรือแมลงหลายชนิด รวมถึงยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* มีรายงานการต้านทานต่อสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์ในเขตภาคเหนือและภาคกลาง<sup>10-13</sup> ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากการใช้สารเคมีปริมาณมากใน

การควบคุมยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออกในรูปแบบต่างๆ สารเคมีเหล่านี้มีอาจปนเปื้อนในแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ซึ่งอาศัยอยู่ในเมืองเช่นเดียวกับยุงลาย<sup>11,14</sup> การเลือกใช้สารเคมีกำจัดแมลงในการควบคุมยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* จึงควรพิจารณาถึงความไวของสารเคมีกำจัดแมลงแต่ละชนิดต่อยุงรำคาญ และกลไกการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง เพื่อสามารถกำจัดยุงรำคาญและควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของยุงทำให้เป็นอัมพาตและตายอย่างทันที (knockdown effect) การต้านทานต่อสารเคมีไพรีทรอยด์มีกลไกที่สำคัญ คือ การต้านทานแบบ Knockdown resistance (*kdr*) เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีนโซเดียมแชนแนลซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายออกฤทธิ์ของสารเคมีไพรีทรอยด์ โดยส่งผลให้โครงสร้างของโซเดียมแชนแนลเปลี่ยนแปลงไปและสูญเสียความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลง<sup>15</sup> กลไกการต้านทานต่อสารเคมีไพรีทรอยด์ชนิด *kdr* ของยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีนโซเดียมแชนแนลที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 1014 ซึ่งกรดอะมิโนไลซีนเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนหรือเรียกว่า การกลายพันธุ์ L1014F พบในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* จากหลายประเทศ<sup>16-20</sup> รวมถึงประเทศไทย ซึ่งพบการกลายพันธุ์ L1014F ของยีนโซเดียมแชนแนล ในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ กว่า 6 จังหวัดบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย นอกจากนี้ ยังพบว่า การกลายพันธุ์ L1014F มีความสัมพันธ์กับการต้านทานต่อสารเคมีเดลต้าเมทริน ในประชากรยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ของประเทศไทย<sup>13</sup>

การตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* สามารถทำได้หลายวิธี เช่น conventional AS-PCR<sup>19, 21-23</sup> Hot Oligo Ligation Assay (HOLA)<sup>20</sup> ABI Prism SNaPshot Multiplex<sup>24</sup> Single probe/Melting curve analysis ด้วยเครื่อง Real time PCR<sup>25</sup> และ Pyrosequencing<sup>18</sup> แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน วิธี conventional AS-PCR เป็นวิธีที่นิยมใช้แพร่หลาย มีราคาต้นทุนไม่สูง แต่ความไวและความจำเพาะค่อนข้างต่ำ ขั้นตอนการทำยุ่งยากต้องทดสอบใน 2 หลอดต่อหนึ่งตัวอย่าง จึงสามารถตรวจหาจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ L1014F ได้ วิธี HOLA มีขั้นตอนการทำที่ยุ่งยากถึง 16 ขั้นตอน ส่วนวิธี ABI Prism SNaPshot Multiplex วิธี Single probe/Melting curve analysis ด้วยเครื่อง Real time PCR และวิธี Pyrosequencing มีราคาสูงแม้จะให้ผลที่มีความไวและความจำเพาะมาก สำหรับประเทศไทย การตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์<sup>13</sup> ซึ่งเป็นวิธีที่ซับซ้อน ยุ่งยาก ใช้เวลานาน และต้นทุนสูง ซึ่งอาจไม่เหมาะสมสำหรับยุงรำคาญ

จากภาคสนามที่มีจำนวนตัวอย่างมาก ส่วนวิธีการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเออย่างง่าย มีเพียงวิธี conventional AS-PCR และวิธี TaqMan SNP ที่ใช้สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ F1534C ในยุงลาย *Aedes aegypti*<sup>26</sup> ดังนั้น การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเออย่างง่าย สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ด้วยวิธี tetra-primer allele specific PCR (tetra-primer AS-PCR) จึงควรมีการพัฒนาขึ้น วิธี tetra-primer AS-PCR เป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะ และให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว เป็นวิธีที่พัฒนาจากวิธี conventional AS-PCR ที่ใช้สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F และ F1534C ในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* และยุงลาย *Ae. aegypti* ตามลำดับ<sup>19, 26</sup>

การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยวิธี tetra-primer AS-PCR สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ของยีนโซเดียมแชนแนลในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* และเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธี tetra-primer AS-PCR กับวิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

## วัสดุและวิธีการศึกษา

### 1. ตัวอย่างยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* และการเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างยุงรำคาญที่ใช้ในการศึกษา ประกอบด้วยยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ Cq\_CM\_R และยุงที่เก็บจากภาคสนาม ยุงรำคาญสายพันธุ์ Cq\_CM\_R เป็นยุงที่เก็บจาก จ. เชียงใหม่ และได้รับการคัดเลือกในห้องปฏิบัติการให้เป็นยุงที่ต้านทานต่อสารเคมีเดลต้าเมทริน<sup>13</sup> งานวิจัยครั้งนี้เลือกศึกษาในยุงรำคาญรุ่นที่ 1 รุ่นที่ 2 และรุ่นที่ 3 ซึ่งกำหนดชื่อเป็นสายพันธุ์ Cq\_CM\_RF1 สายพันธุ์ Cq\_CM\_RF2 และสายพันธุ์ Cq\_CM\_RF3 ตามลำดับ โดยเป็นยุงรำคาญตัวเต็มวัย *Cx. quinquefasciatus* ที่ได้จัดเก็บไว้ในหลอดไมโครทิวบขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ส่วนยุงรำคาญที่เก็บจากภาคสนาม เป็นยุงรำคาญที่เก็บจากพื้นที่ในเขตชุมชนเมือง จาก 6 จังหวัดในภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา และแพร่ ซึ่งมีอัตราการตายจากการทดสอบความไวต่อสารเคมีเดลต้าเมทรินตามที่มีรายงานไว้โดย Yanola et al<sup>13</sup> เก็บยุงรำคาญในระยะตัวอ่อน และตัวโม่ง โดยวิธีการตักจากแหล่งเพาะพันธุ์น้ำเน่าเสีย นำมาเลี้ยงจนเจริญเป็นยุงตัวเต็มวัยในห้องเลี้ยงแมลงภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ภายใต้การควบคุมสภาวะภายในห้องเลี้ยงที่เหมาะสม มีอุณหภูมิเท่ากับ 25-27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80% และ

ได้รับแสงสว่างจากธรรมชาติ จากนั้นจำแนกตัวอย่างยุงตามลักษณะสัณฐานวิทยา<sup>27</sup> และจัดเก็บยุงรำคาญตัวเต็มวัย *Cx. quinquefasciatus* ในหลอดไมโครทิวปขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการแยกสกัด genomic DNA ต่อไป

## 2. การแยกสกัด Genomic DNA จากยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus*

แยกสกัด Genomic DNA ด้วยวิธีการแยกสกัดจากยุงทั้งตัวจำนวนหนึ่งตัว โดยบดยุงให้ละเอียดในน้ำยาสำเร็จรูป DNAzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ตูดเก็บส่วนใสมาผสมกับ absolute ethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอน DNA จากนั้นปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และล้างตะกอน DNA จำนวน 2 ครั้ง ด้วย 70% ethanol ทั้งตะกอน DNA ให้แห้ง และละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากสิ่งปนเปื้อน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ Genomic DNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง NANODrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)

## 3. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ L1014F ของยีนโซเดียมแชนเนล

การตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ของยีนโซเดียมแชนเนล

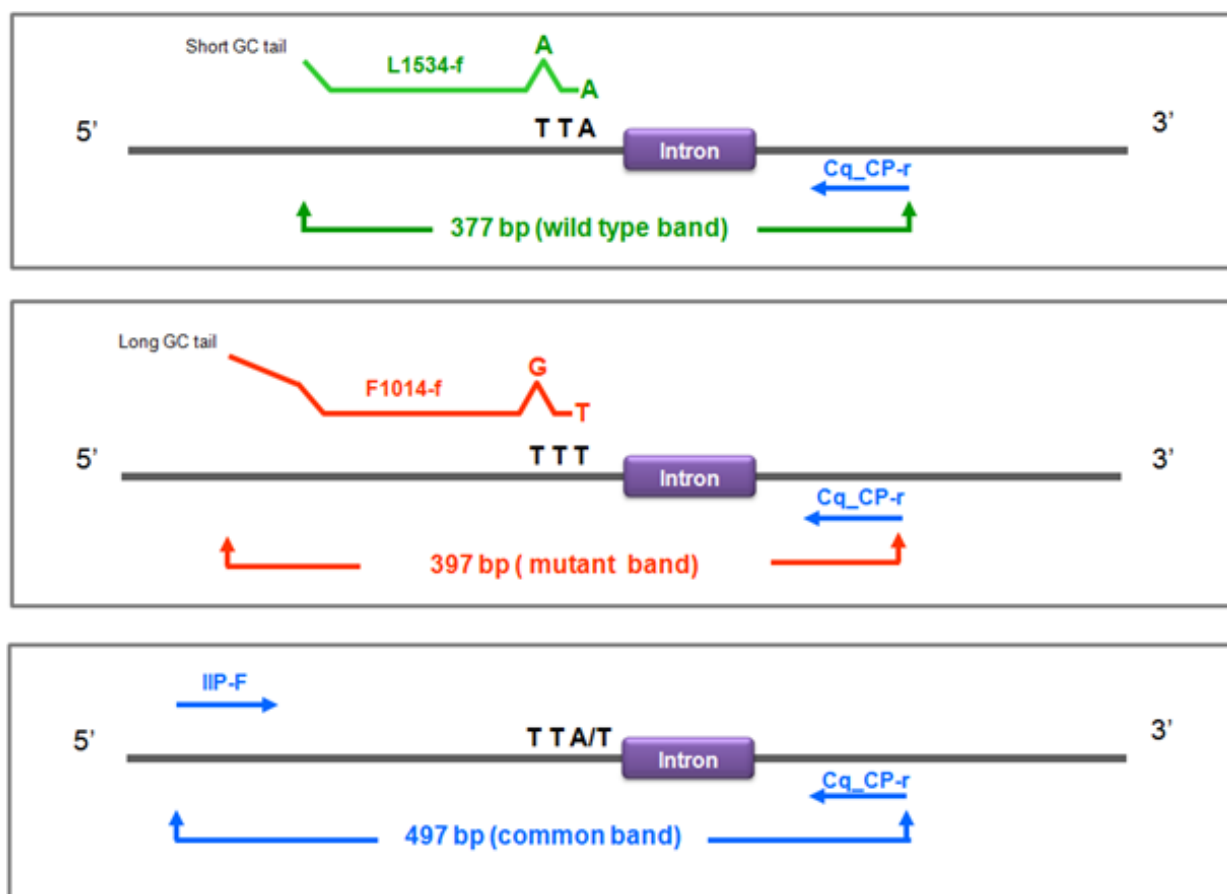
ด้วยวิธี tetra-primer AS-PCR ใช้ไพรเมอร์ จำนวน 4 สาย ได้แก่ ไพรเมอร์ common reverse<sup>28</sup> จำนวน 1 สาย และไพรเมอร์ forward จำนวน 3 สาย ซึ่งประกอบด้วย ไพรเมอร์ common forward<sup>26</sup> จำนวน 1 สาย และไพรเมอร์ specific forward จำนวน 2 สาย (ไพรเมอร์ F1014-f และไพรเมอร์ L1014-f) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 4 สาย (Table 1)

สำหรับไพรเมอร์ specific forward มีการออกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* จากฐานข้อมูลของ Genbank accession number KM377241-2<sup>13</sup> และ Vectorbase number CPIJ007595-RA<sup>29</sup> เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง การออกแบบไพรเมอร์ F1014-f และไพรเมอร์ L1014-f ให้จำเพาะสำหรับตรวจการมีหรือไม่มี การกลายพันธุ์ L1014F ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนที่ 1 เติมนิวคลีโอไทด์ที่ mismatch กัน ในตำแหน่งที่ 3 ของสายนิวคลีโอไทด์จากด้านปลาย 3' โดยเปลี่ยนชนิดของนิวคลีโอไทด์จากพิวรีน (purine) เป็นไพริมิดีน (pyrimidine) ให้ไพรเมอร์มีค่า Tm ระหว่าง 62-75 องศาเซลเซียส และมีขนาด 22-30 นิวคลีโอไทด์ ขั้นตอนที่ 2 เติมนิวคลีโอไทด์กวานีน (guanine, G) และไซโตซีน (cytosine, C) ต่อจากสายนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ด้านปลาย 5' ได้แก่ GC tail สายสั้น และสายยาว (Table 1 Figure 1) จากการเติม GC tail ที่มีความยาวแตกต่างกันให้กับไพรเมอร์ Specific forward<sup>30</sup> (แตกต่างกัน 20 นิวคลีโอไทด์) ทำให้ได้ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่แตกต่างกัน 20 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งสามารถแยกจากกันได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

**Table 1** Sequences of oligonucleotide primers used for the detection of L1014F mutation by tetra-primer AS-PCR assay and PCR amplification of fragments of *Cx. quinquefasciatus* sodium channel gene.

| Primer name                                                         | Oligonucleotide sequence (5'-3')        | Reference  |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------|
| <b>The tetra-primer AS-PCR assay</b>                                |                                         |            |
| <b>Common primer</b>                                                |                                         |            |
| Cq_CP-r                                                             | CAAGGCTAAGAAAAGGTTAAGAAC                | 28         |
| IIP_F                                                               | GGTGGAACCTCACCAGCTTC                    | 26         |
| <b>Specific primer</b>                                              |                                         |            |
| L1014-f                                                             | [short GC-tail] CCACCGTAGTGATAGGAAATATA | This study |
| F1014-f                                                             | [long GC-tail] CCACCGTAGTGATAGGAAATGTT  | This study |
| <b>PCR amplification of the fragment of the sodium channel gene</b> |                                         |            |
| IIP_F                                                               | GGTGGAACCTCACCAGCTTC                    | 26         |
| IIS6_R                                                              | GGACGCAATCTGGCTTGTTA                    | 26         |

The long 26-bp GC tail has the sequence 5'-GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGGCC-3' and the short 6-bp GC tail has the sequence 5'-GCG-GGC-3'



**Figure 1** Schematic diagram of the tetra-primer AS-PCR for the detection of L1014F mutation in *Cx. quinquefasciatus*.

#### 4. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ด้วยวิธี tetra-primer AS-PCR

นำตัวอย่างยุงรำคาญสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ Cq\_CM\_R ที่ทราบลักษณะจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ L1014F แล้วจากการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่

1. ยุงรำคาญที่มีลักษณะจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัส mutant (F/F1014)
2. ยุงรำคาญที่มีลักษณะจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส (L/F1014)
3. ยุงรำคาญที่มีลักษณะจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัส wild-type (L/L1014) ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ L1014F

มาใช้ศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับวิธี tetra-primer AS-PCR โดยเริ่มจากการทำปฏิกิริยาแบบ singleplex PCR ของไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ได้ออกแบบ ได้แก่ 1) ไพรเมอร์ Cq\_CP-r และ L1014-f 2) ไพรเมอร์ Cq\_CP-r และ F1014-f และ 3) ไพรเมอร์ Cq\_CP-r และ IIP-F (Figure 1) ขั้นตอนประกอบด้วย การหาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมของขั้นตอน primer annealing การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ แมกนีเซียมไคลอไรด์ (MgCl<sub>2</sub>) Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) และ

เอนไซม์ Taq DNA polymerase เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาแบบ singleplex PCR ของไพรเมอร์แต่ละคู่แล้ว จึงนำไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่มารวมกัน เพื่อทำปฏิกิริยาแบบ multiplex PCR และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

#### 5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตเคอมีนแชนเนลบริเวณโดเมน IIS6 ด้วยวิธี DNA sequencing

เพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีนไซโตเคอมีนแชนเนลบริเวณโดเมน IIS6 ด้วยวิธี PCR โดยปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Genomic DNA ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1.25 หน่วย, dNTPs (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ MgCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ forward และ ไพรเมอร์ reverse (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ชิ้นส่วนเป้าหมายคือ incubate ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที



ตามด้วย incubate ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอนสุดท้าย incubate ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยอาศัยเครื่อง PCR (Bio-Rad, MJ Mini) จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis บนเจล agarose ความเข้มข้น 1.5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5X TBE และตรวจสอบแถบ DNA ด้วยเครื่อง Gel Doc XR+ (Bio-Rad)

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป illustra ExoProStar 1-Step (GE Healthcare Life Sciences) และส่งไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ (Macrogen Inc., Seoul, Korea) จากนั้นตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยโปรแกรม Geneious Pro software version 5.04<sup>31</sup> และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Genbank accession number KM377241-2<sup>13</sup> และ Vectorbase number CPIJ007595-RA<sup>29</sup> เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของ ยีนโซเดียมแชนแนล

## 6. การวิเคราะห์ข้อมูล

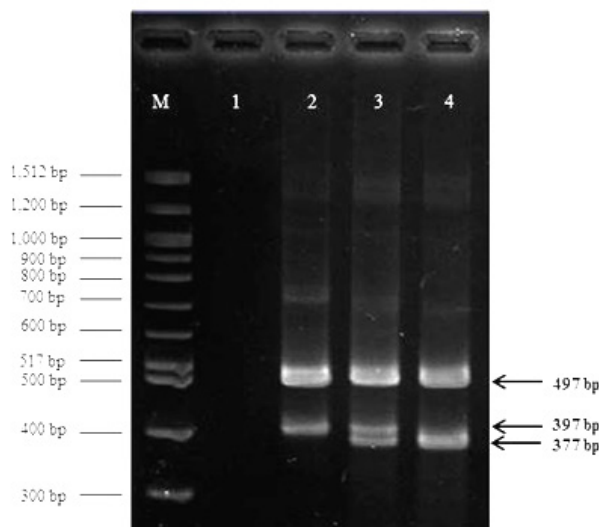
เปรียบเทียบผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ของยีนโซเดียมแชนแนลที่ได้จากวิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งกำหนดเป็นวิธีมาตรฐานคู่เทียบสำหรับการศึกษานี้ และผลที่ได้จากวิธี tetra-primer AS-PCR เพื่อคำนวณพารามิเตอร์ด้านความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value)

## ผลการศึกษา

### 1. สภาวะที่เหมาะสมของการตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ด้วยวิธี tetra-primer AS-PCR

การตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ของยีนโซเดียมแชนแนลในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ด้วยวิธี tetra-primer AS-PCR ที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ไพรเมอร์ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโซเดียมแชนแนลชนิดที่มีและไม่มี การกลายพันธุ์ L1014F ของยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* การเติม GC tail สายสั้นและสายยาว ซึ่งมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 20 นิวคลีโอไทด์ ให้แก่ไพรเมอร์ L1014-f และไพรเมอร์ F1014-f ทำให้สามารถตรวจแยกจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัส หรือเฮเทอโรไซกัสของการกลายพันธุ์ L1014F ได้อย่างชัดเจนด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และเพื่อเลี่ยงหลักการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีนที่ไม่จำเพาะในการตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ด้วยวิธี tetra-primer AS-PCR จึงได้ค้นหาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิเวลาและความเข้มข้นของไพรเมอร์แต่ละสาย โดยสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ด้วยวิธี tetra-primer AS-PCR (Table 2)

ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ (Figure 2) โดยยุงรำคาญที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ L1014F ที่มีลักษณะจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัส mutant (F/F1014) จะพบผลิตภัณฑ์ PCR 2 ขนาด คือขนาด 497 bp และขนาด 397 bp และยุงรำคาญที่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ L1014F จะมีลักษณะจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัส wild-type (L/L1014) จะพบผลิตภัณฑ์ PCR 2 ขนาด คือขนาด 497 bp และขนาด 377 bp ส่วนยุงรำคาญที่มีการกลายพันธุ์ L1014F แบบเฮเทอโรไซกัส (L/F1014) จะพบผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 3 ขนาด คือขนาด 497 bp ขนาด 397 bp และขนาด 377 bp



**Figure 2** Gel electrophoresis bands of tetra-primer AS-PCR products corresponding to L1014F mutation in the *Cx. quinquefasciatus* sodium channel gene. From left to right: M=100 bp DNA ladder, lane 1 = Negative control, 2 = Homozygous mutant (F/F1014), lane 3= Heterozygous (L/F1014), 4 = Homozygous wild type (L/L1014).

**Table 2** Optimized condition for the detection of L1014F mutation in *Cx. quinquefasciatus* sodium channel gene by tetra-primer AS-PCR method.

| Variable tested                                                    | Optimal result* |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Platinum <i>Taq</i> DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) | 0.4 Unit        |
| 10X PCR buffer                                                     | 1X              |
| MgCl <sub>2</sub>                                                  | 2.0 mM          |
| Primer Cq_CP-r                                                     | 0.5 μM          |
| Primer L1014-f                                                     | 0.125 μM        |
| Primer F1014-f                                                     | 0.15 μM         |
| Primer IIP-F                                                       | 0.125 μM        |
| dNTPs (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)                      | 200 μM          |
| Annealing temperature                                              | 50 °C           |
| PCR cycle                                                          | 35 cycle        |

The PCR was carried out in a 10 μL reaction volume containing 25 ng/μL genomic DNA. The amplified fragments were analyzed by electrophoresis on a 4% agarose gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and visualized under UV light by ethidium bromide staining.

## 2. การเปรียบเทียบวิธี tetra-primer AS-PCR กับวิธีตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในการตรวจการกลายพันธุ์ L1014F ของยีนโซเดียมแชนแนล

การตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F โดยวิธี tetra-primer AS-PCR ในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ Cq\_CM\_R จำนวน 36 ตัว พบว่า สามารถตรวจแยกลักษณะจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ L1014F ทั้งแบบโฮโมไซกัส mutant (F/F1014) แบบเฮเทอโรไซกัส (L/F1014) และแบบโฮโมไซกัส wild-type (L/L1014) ได้อย่างชัดเจน และให้ผลสอดคล้องถูกต้องตรงกับผลตรวจจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ที่ได้จากวิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Table 3) นอกจากนี้ เมื่อตรวจการกลายพันธุ์ L1014F ของยีนโซเดียมแชนแนล

ในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* จำนวน 100 ตัว ซึ่งเป็นยุงภาคสนามที่เก็บมาจาก 6 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา และแพร่ ด้วยวิธี tetra-primer AS-PCR เปรียบเทียบกับวิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ให้ผลถูกต้องตรงกันในทุกลักษณะจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ และในทุกยุงตัวอย่าง (Table 2) และมีความถี่ของอัลลีลกลายพันธุ์ F1014 อยู่ที่ 0.17 จากการตรวจจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ L1014F ในจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 136 ตัว โดยมีวิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นวิธีมาตรฐาน พบว่าวิธี tetra-primer AS-PCR มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ 100%

**Table 3** Comparison of L1014F genotyping of laboratory *Cx. quinquefasciatus* and wild-caught mosquitoes obtained from tetra-primer AS-PCR and DNA sequencing methods.

| Mosquito strain<br>(Generation) | Tetra-primer AS-PCR / DNA sequencing |         |         |         |
|---------------------------------|--------------------------------------|---------|---------|---------|
|                                 | L/L1014                              | L/F1014 | F/F1014 | Total   |
| <b>Laboratory strain</b>        |                                      |         |         |         |
| Cq_CM_RF1 (G1)                  | 2/2                                  | 3/3     | 7/7     | 12/12   |
| Cq_CM_RF2 (G2)                  | 1/1                                  | 2/2     | 9/9     | 12/12   |
| Cq_CM_RF3 (G3)                  | 3/3                                  | 3/3     | 6/6     | 12/12   |
| <b>Wild-caught strain</b>       |                                      |         |         |         |
| Chiang Mai (G0)                 | 12/12                                | 3/3     | 5/5     | 20/20   |
| Chiang Rai (G1)                 | 14/14                                | 2/2     | 0/0     | 16/16   |
| Lamphun (G1)                    | 15/15                                | 1/1     | 0/0     | 16/16   |
| Lampang (G1)                    | 15/15                                | 1/1     | 0/0     | 16/16   |
| Phayao (G0)                     | 15/15                                | 1/1     | 0/0     | 16/16   |
| Phrae (G0)                      | 6/6                                  | 4/4     | 6/6     | 16/16   |
| Total                           | 83/83                                | 20/20   | 33/33   | 136/136 |

## วิจารณ์ผลการศึกษา

การต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงรำคาญเป็นปัญหาอุปสรรคสำคัญของแนวทางการควบคุมพาหะนำโรคด้วยการใช้สารเคมีกำจัดแมลง การตรวจติดตามการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงอย่างต่อเนื่อง เป็นมาตรการสำคัญในการจัดการควบคุมแมลงโดยใช้สารเคมี ปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้ตรวจติดตามการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงคือชุดตรวจความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงสำเร็จรูปขององค์การอนามัยโลก<sup>32,33</sup> ซึ่งทำให้ทราบอัตราการตาย ระดับความไวหรือ การต้านทานต่อสารเคมีที่ทดสอบ แต่ไม่สามารถบอกกลไกการต้านทาน อย่างไรก็ตาม การเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจติดตามการต้านทานต่อสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์ของยุง อาจทำได้โดยตรวจความไวต่อสารเคมีกำจัดแมลงร่วมกับตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเออย่างง่าย สำหรับตรวจหาการกลไกการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงชนิด *kdr* เพื่อเป็นข้อมูลในการพิจารณาเลือกใช้สารเคมีที่เหมาะสมสำหรับการจัดการควบคุมแมลง โดยอาจหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีที่ออกฤทธิ์ที่โซเดียมแชนแนลเช่นเดียวกับสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์ หรือการสลับการใช้สารเคมีเป็นกลุ่มอื่นๆ เพื่อไม่ให้ยุงรำคาญเกิดการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงขึ้น

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การกลายพันธุ์ L1014F

ของยีนโซเดียมแชนแนลเกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์<sup>13,17</sup> การศึกษาโดย Yanola et al<sup>13</sup> พบความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของยีนโซเดียมแชนแนลที่ตำแหน่ง L1014F กับการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงชนิดเดลต้าเมทรินในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ทั้งสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการซึ่งพบมีค่าความถี่อัลลีลกลายพันธุ์ F1014 เพิ่มขึ้นตามระดับความต้านทานต่อสารเคมีเดลต้าเมทรินที่เพิ่มขึ้นและยุงรำคาญที่เก็บมาจากภาคสนามโดยเฉพาะยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* จากเชียงใหม่และแพร่ ซึ่งพบว่ายุงรำคาญกลุ่มที่ตายและกลุ่มที่รอดชีวิตภายหลังการทดสอบความไวต่อสารเคมีเดลต้าเมทริน มีค่าความถี่อัลลีลกลายพันธุ์ F1014 ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ กลุ่มที่รอดชีวิตมีค่าความถี่อัลลีลกลายพันธุ์ F1014 ที่สูงกว่า<sup>13</sup> การศึกษาในครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ด้วยวิธี tetra-primer AS-PCR ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเออย่างง่าย ตรวจหาลักษณะจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ L1014F ด้วยปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองเพียงหลอดเดียว ขั้นตอนง่าย ให้ผลรวดเร็ว ราคาประหยัด มีความไว และความจำเพาะเทียบเคียงได้กับวิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความไวและความจำเพาะต่อการมีหรือไม่มีการกลายพันธุ์



รวมถึงมีไพรเมอร์ชุดควบคุมภายใน (internal control) จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจติดตามการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงที่เกิดจากกลไก *kdr* ซึ่งต้องตรวจในตัวอย่างยุงจำนวนมากจากภาคสนาม อย่างไรก็ตาม ข้อด้อยของวิธี tetra-primers AS-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ คือต้องมีขั้นตอน agarose gel electrophoresis สำหรับการอ่านผลลักษณะจีโนไทป์ ซึ่งไม่จำเป็นหากใช้วิธี HOLA<sup>20</sup> ABI Prism SNaPshot Multiplex<sup>24</sup> Single probe/Melting curve analysis ด้วยเครื่อง Real time PCR<sup>25</sup> และ Pyrosequencing<sup>18</sup> อย่างไรก็ตาม แม้ว่าวิธี tetra-primer AS-PCR จะมีขั้นตอนการทำ agarose gel electrophoresis เป็นขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากหากเปรียบเทียบกับวิธี conventional AS-PCR<sup>19,21-23</sup> ซึ่งต้องทำใน 2 หลุมของเจล agarose ต่อหนึ่งตัวอย่าง จึงจะสามารถตรวจหาลักษณะจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ L1014F ได้ นอกจากนี้ จากรายงานที่ผ่านมาพบการตรวจลักษณะจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ L1014F ของยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ที่ให้ผลการตรวจไม่สอดคล้องตรงกันของวิธี conventional AS-PCR กับวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์<sup>19</sup>

รายงานนี้ได้แสดงให้เห็นว่าวิธี tetra-primer AS-PCR เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ของยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ทั้งที่จับมาจากภาคสนามและสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ โดยสามารถนำไปใช้ตรวจการกระจายตัวของการกลายพันธุ์ L1014F ในยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* ในจำนวนตัวอย่างยุงรำคาญที่มากและในยุงรำคาญจากพื้นที่ขยายกว้างขึ้นทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งจะศึกษาในลำดับต่อไป

## สรุปผลการศึกษา

การศึกษครั้งนี้ได้พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเออย่างง่ายด้วยวิธี tetra-primer AS-PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ L1014F ของยุงรำคาญ *Cx. quinquefasciatus* เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะเทียบเคียงได้กับการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำได้ง่ายให้ผลรวดเร็ว และมีราคาประหยัด สามารถประยุกต์ใช้ตรวจติดตามการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ หรือใช้ร่วมกับการตรวจความไวของแมลงต่อสารเคมีกำจัดแมลงเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการตรวจติดตามและเฝ้าระวังการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงของยุงรำคาญ รวมถึงใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาเลือกใช้สารเคมีในการควบคุมประชากรยุงรำคาญซึ่งเป็นพาหะของโรคพยาธิฟิลาเรียลีส โดยเมื่อใช้สารเคมีที่เหมาะสม จะทำให้ยุงรำคาญมีจำนวนที่ลดลง ส่งผลให้อโอกาสการแพร่ระบาดของโรคพยาธิฟิลาเรียลีสลดลงเช่นกัน ดังนั้นจึงอาจเป็นประโยชน์อีกทางหนึ่งในการเฝ้าระวังและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคผ่านการควบคุมยุงพาหะนำโรค

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (MRG5680063) จากกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี 2558

1. WHO. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2014. Wkly Epidemiol Rec. 2015; 38: 489-504.
2. WHO [Internet]. Lymphatic filariasis. Fact sheet No.102. Geneva: World Health Organization. [update 2016 Feb; cited 2016 Apr 2]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/>.
3. Nuchprayoon S, Junpee A, Poovorawan Y. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for differentiation between Thai and Myanmar strains of *Wuchereria bancrofti*. Filaria J. 2007; 6: 6.
4. Satimai W, Jiraamonnimit C, Thammapalo S, Choochote W, Luene P, Boitano JJ, et al. The impact of a national program to eliminate lymphatic filariasis in selected Myanmar immigrant communities in Bangkok and Ranong Province, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2011; 42: 1054-64.
5. Titeeraprapab S, Songtrus J. High prevalence of *bancroftian filariasis* in Myanmar-migrant workers: a study in Mae Sot district, Tak province, Thailand. J Med Assoc Thai. 1999; 82: 735-9.
6. Jitpakdi A, Choochote W, Panart P, Tookyang B, Panart K, Prajakwong S. Possible transmission of two types of *Wuchereria bancrofti* in Muang District, Chiang Mai, northern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1998; 29: 141-3.
7. Titeeraprapab S, Kanjanopas K, Suwannadabba S, Sangprakarn S, Poovorawan Y, Scott AL. Transmission of the nocturnal periodic strain of *Wuchereria bancrofti* by *Culex quinquefasciatus*: establishing the potential for urban filariasis in Thailand. Epidemiol Infect. 2000; 125: 207-12.
8. Pumidonming W, Polseela P, Maleewong W, Pipitgool V, Poodendaen C. *Culex quinquefasciatus* in Phitsanulok as a possible vector of nocturnally periodic *Wuchereria bancrofti* transmission in Myanmar immigrants. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005; 36: 176-9.
9. Chareonviriyaphap T, Bangs MJ, Suwonkerd W, Kongmee M, Corbel V, Ngoen-Klan R. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. Parasit Vectors. 2013; 6: 280.
10. Somboon P, Prapanthadara LA, Suwonkerd W. Insecticide susceptibility tests of *Anopheles minimus s.l.*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* in northern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2003; 34: 87-93.
11. Sathantriphop S, Paeporn P, Supaphathom K. Detection of insecticides resistance status in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* to four major groups of insecticides. Trop Biomed. 2006; 23: 97-101.
12. Thanispong K, Sathantriphop S, Chareonviriyaphap T. Insecticide resistance of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Thailand. J Pest Sci. 2008; 33: 351-6.
13. Yanola J, Chamnanya S, Lumjuan N, Somboon P. Insecticides resistance in the *Culex quinquefasciatus* populations from northern Thailand and possible resistance mechanisms. Acta Trop. 2015; 149: 232-8.
14. Canyon D, Hii J. Insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Townsville. Aust J Entomol. 1999; 38: 40-3.
15. Soderlund DM, Bloomquist JR. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Roush RT, Tabashnikin BE, editors. Pesticide Resistance in Arthropods. New York: Chapman and Hall; 1990. p. 58-96.
16. Xu Q, Liu H, Zhang L, Liu N. Resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, and possible mechanisms for resistance. Pest Manag Sci. 2005; 61: 1096-102.

17. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop.* 2007; 101: 207-16.
18. Jones CM, Machin C, Mohammed K, Majambere S, Ali AS, Khatib BO, et al. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* from Zanzibar: implications for vector control programmes. *Parasit Vectors.* 2012; 5: 78.
19. Sarkar M, Borkotoki A, Baruah I, Bhattacharyya IK, Srivastava RB. Molecular analysis of knock down resistance (*kdr*) mutation and distribution of *kdr* genotypes in a wild population of *Culex quinquefasciatus* from India. *Trop Med Int Health.* 2009; 14: 1097-104.
20. Wondji CS, Priyanka De Silva WA, Hemingway J, Ranson H, Parakrama Karunaratne SH. Characterization of knockdown resistance in DDT- and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* populations from Sri Lanka. *Trop Med Int Health.* 2008; 13: 548-55.
21. Martinez-Torres D, Chevillon C, Brun-Barale A, Bergé JB, Pasteur N, Pauron D. Voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. *Pestic Sci.* 1999; 55: 1012-20.
22. Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, et al. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop.* 2007; 101: 207-16.
23. Low VL, Chen CD, Lim PE, Lee HL, Tan TK, Lim YA, et al. First molecular genotyping of voltage gated sodium channel alleles in *Culex quinquefasciatus* populations in Malaysia. *Pestic Biochem Phys.* 2013; 107: 127-31.
24. Xu Q, Liu H, Zhang L, Liu N. Resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, and possible mechanisms for resistance. *Pest Manag Sci.* 2005; 61: 1096-102.
25. Sarkar M, Baruah I, Srivastava RB, Borkotoki A, Bhattacharyya IK. High-throughput approach to detection of knockdown resistance (*kdr*) mutation in mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*, based on real-time PCR using single-labelled hybridisation probe/melting curve analysis. *Pest Management Science.* 2011; 67: 156-61.
26. Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang P, Prapanthadara LA. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Trop Med Int Health.* 2011; 16: 501-9.
27. Rattanarithikul R, Harbach RE, Harrison BA, Panthusiri P, Jones JW, Coleman RE. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand II. Genera *Culex* and *Lutzia*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005; 36: 1-97.
28. Wang ZM, Li CX, Xing D, Yu YH, Liu N, Xue RD, et al. Detection and widespread distribution of sodium channel alleles characteristic of insecticide resistance in *Culex pipiens* complex mosquitoes in China. *Med Vet Entomol.* 2012; 26: 228-32.
29. Arensburger P, Megy K, Waterhouse RM, Abrudan J, Amedeo P, Antelo B, et al. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science.* 2010; 330: 86-8.
30. Germer S, Higuchi R. Single-tube genotyping without oligonucleotide probes. *Genome Res.* 1999; 9: 72-8.
31. Drummond A, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, et al. Geneious Pro v 5.04. Available from <http://www.geneious.com/> . 2009.
32. WHO. Discriminating concentrations of insecticides for adult mosquitoes. WHO/CDS/CPC/MAL/98.12. 1998. p. 1.
33. WHO. Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2013.