

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ก. สารฆ่าแมลง

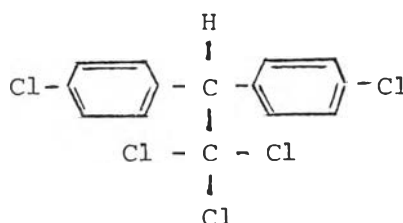
สารฆ่าแมลงที่ใช้ในการทดสอบมี 6 ชนิด ดังนี้คือ

1. สารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนคลอรีน

ดีดีที

ชื่อเคมี 1, 1, 1-trichloro-2, 2-di-(4-chlorophenyl)  
ethane

สูตรโครงสร้าง



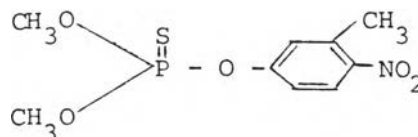
ลักษณะเทคนิคัลเกรด 98% เป็นผงสีขาว

2. สารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต

เฟนิโตรโรน

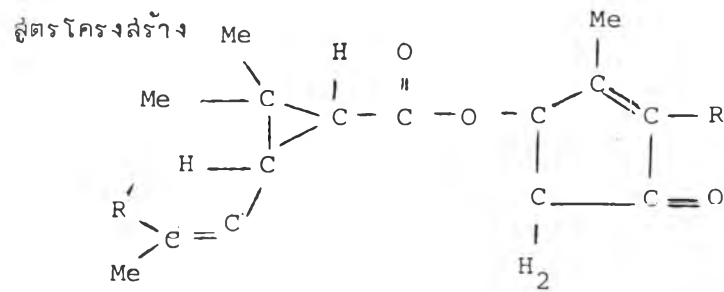
ชื่อเคมี O, O-dimethyl O-(3-methyl-4-nitrophenyl)  
phosphorothioate

สูตรโครงสร้าง



ลักษณะเทคนิคัลเกรต 97% เป็นของเหลวหนืด สีน้ำตาลปนเหลือง

3. ไพเรทรินส์ซึ่งเป็นสารสกัดจากดอกไพเรธรัม (Chrysanthemum cinerariaefolium)



	R	R'
Pyrethrin I	$-\text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH} = \text{CH}_2$	-Me
Cinerin I	$-\text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{Me}$	-Me
Pyrethrin II	$-\text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH} = \text{CH}_2$	-COOMe
Cinerin II	$-\text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{Me}$	-COOMe
Jasmolin II	$-\text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{C}_2\text{H}_5$	-COOMe

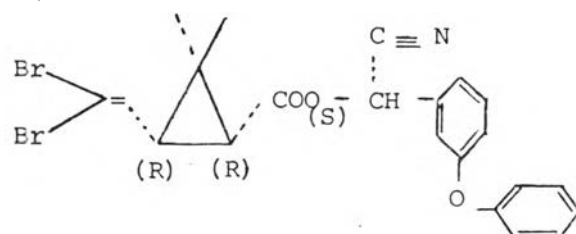
ความบริสุทธิ์ 25% เป็นของเหลวข้นสีดำ

4. สารฆ่าแมลงประเภทไพเรทรอยด์

4.1 เดลต้า เมธริน

ชื่อเคมี (S)- $\alpha$ -cyano-m-phenoxybenzyl (1R, 3R)-3-(2, 2, dibromovinyl)-2, 2-dimethyl-cyclopropane carboxylate

สูตรโครงสร้าง

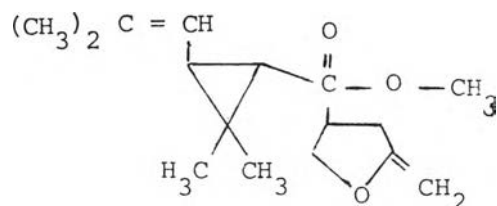


ลักษณะ เทคนิคัลเกรต 97% เป็นผงสีขาว

## 4.2 ไบโอะเรสเมอริน

ชื่อเคมี (5-benzyl-3-furyl) methyl-2, 2-dimethyl-3-(2-methylpropyl) cyclopropane carboxylate

สูตรโครงสร้าง

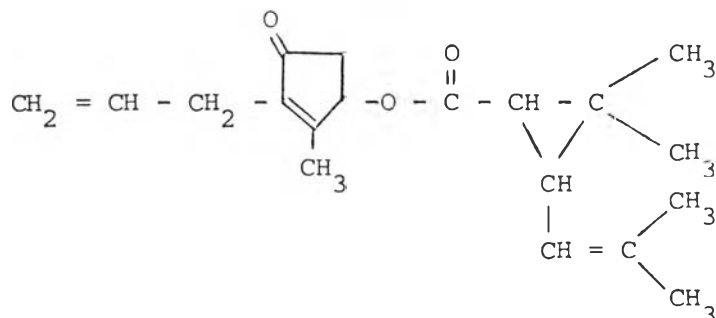


ลักษณะ เทคนิคัลเกรต 97% เป็นของ เหลลวหนืด สีน้ำตาลใส

## 4.3 อัลเลธริน

ชื่อเคมี Allethronyl d, l-cis, trans-chrysanthemate

สูตรโครงสร้าง



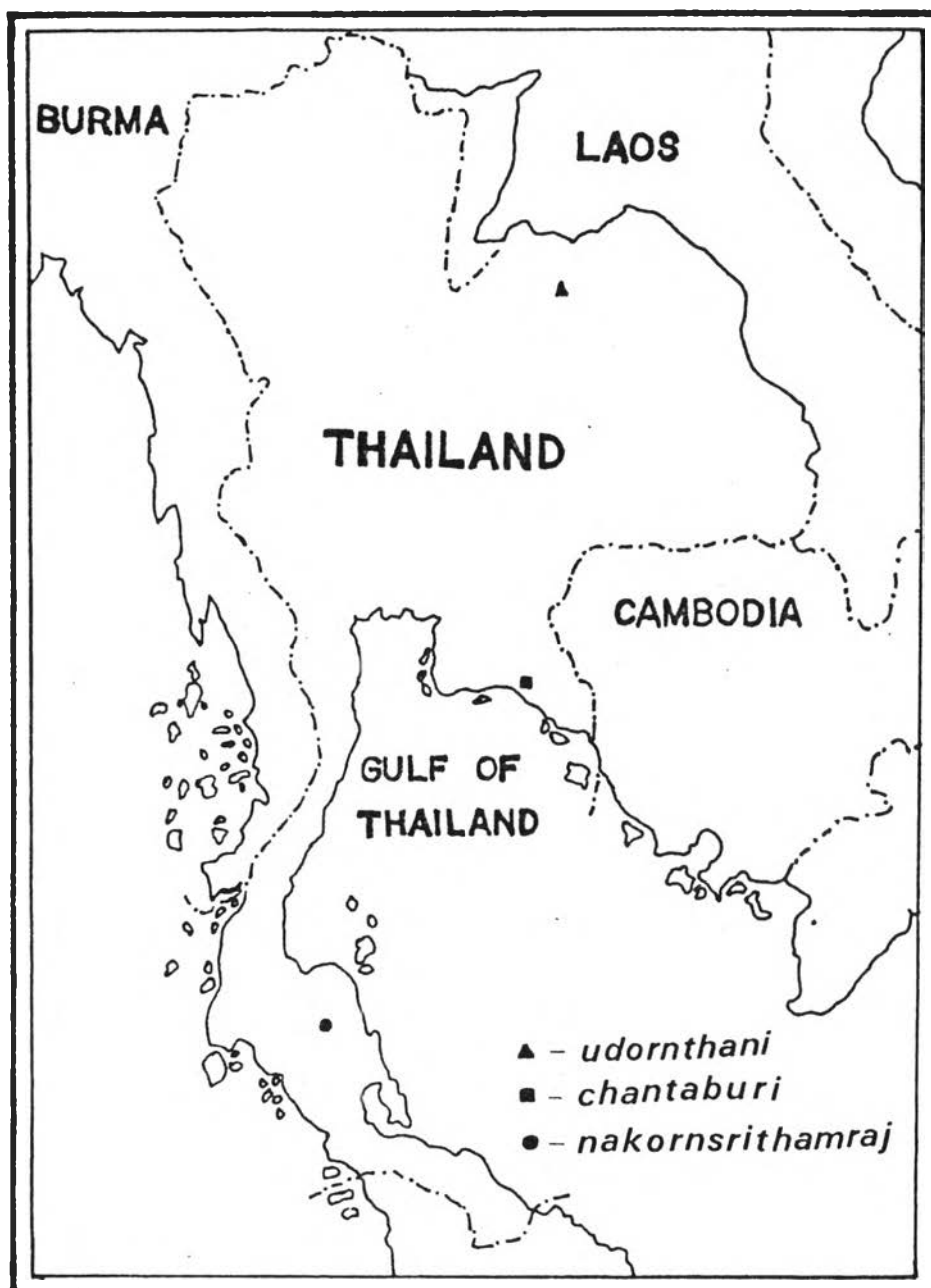
ลักษณะ เทคนิคัลเกรต 90% เป็นของ เหลลวหนืด สีน้ำตาลใส

## ข. สัตว์ทดลองที่ใช้

1. บุงกันปล่อง An. (Cel.) dirus ตัวเต็มวัย 4 สายพันธุ์

1.1 An. (Cel.) dirus สายพันธุ์ SEAD จากหน่วยวิจัยทางแพทย์ สปอ. (SEATO) และเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลงฝ่ายวิจัยประยุกต์ กองมลาเรีย กรมควบคุม-โรคติดต่อตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2515 โดยไม่เคยสัมผัสสารฆ่าแมลงใด ๆ ซึ่งมีความไวต่อสาร ฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ ได้ดี

1.2 An. (Cel.) dirus จากท้องถิ่นในเขตจังหวัด จาก 3 ภาค ของประเทศไทยซึ่งนำมาเพาะเลี้ยงในห้องเลี้ยงแมลงฝ่ายวิจัยประยุกต์ กองมลาเรีย และ



รูปที่ 1 แผนที่ประเทศไทยแสดงจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง

ได้ส่งตัวอย่างลูกน้ำระยะ 3 - 4 ไปตรวจสอบชนิดของแต่ละสายพันธุ์ที่ฝ่ายกีฏวิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล ได้แก่

ภาคตะวันออก	สายพันธุ์จันทบุรี (dirus A) ซึ่งเป็นสายพันธุ์จากห้องที่โดยตรง
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	สายพันธุ์อุตรธานี (dirus A) รุ่นที่ 6 (F <sub>6</sub> ) จากห้องปฏิบัติการเขตจังหวัดขอนแก่น
ภาคใต้	สายพันธุ์สีชล (dirus C) จังหวัดนครศรีธรรมราช รุ่นที่ 2 (F <sub>2</sub> ) จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. หนูตะเภา Cavia parcellus สำหรับให้เลือดบุงเพศเมียเพื่อให้บุงวางไข่ ได้รับจากห้องเลี้ยงแมลงฝ่ายวิจัยประยุกต์ กองมหาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข

ค. วัสดุที่ใช้ในการเลี้ยงบุง

1. กรงเลี้ยงบุงขนาด 20 x 20 x 20 ลบ.ซม. และ 30 x 30 x 30 ลบ.ซม.
2. ส่วสำหรับซุ่มไวตามิน
3. ไม้พันส่ว
4. ถ้วยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 ซม. สำหรับบุงวางไข่
5. กระดาษกรองวัดแมนเบอร์ 1 รองถ้วยสำหรับบุงวางไข่
6. ถ้วยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. สำหรับใส่ดักแด้
7. น้ำประปากรองเก็บไว้ 3 - 4 วัน ให้คลอรีนระเหย
8. ถาดสำหรับเลี้ยงลูกน้ำบุง ขนาด 24 x 30 x 4.5 ลบ.ซม.
9. อาหารสุนัขบดละเอียดแล้วกรองเป็นอาหารสำหรับลูกน้ำบุง
10. กระดาษชิว
11. หลอดหยด
12. กระจกนูนเล็กขนาด 1.5 นิ้ว สำหรับตักลูกน้ำ
13. ไวตามินไซรัป (Panvitamin Syrup) ที่ละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 10%

14. เทอร์โมมิเตอร์
15. ผ้าขนหนูสำหรับคลุมกรงเลี้ยงยุง

ง. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมเทียม

1. เข็มแทงยุง
2. เครื่องปั๊มอากาศ (pressure vacuum pump)
3. ถ้วยกระดาษมีฝาตาข่ายปิด
4. อีเทอร์สำหรับสลบยุง
5. ที่ดูดยุงตัวเต็มวัย (aspirator)
6. หลอดแก้ว (vial)

จ. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบยุง

1. กระบอกทดสอบหลอดเขียวและจุดแดงขององค์การอนามัยโลก
2. กระดาษอะคริลสีขาวขนาด 12 x 15 ตร.ซม.
3. กระดาษกรองวัดแมนเบอร์ 1 ขนาด 12 x 15 ตร.ซม. สำหรับเคลือบ  
สำรฆ่าแมลง
4. นาฬิกาจับเวลา
5. สาลีสำหรับชุบไวนิลพลาสติค
6. ซีเปต ขนาด 0.1, 1.0, 5.0 และ 10.0 ซีซี. พร้อมลูกยาง
7. เครื่องชั่งไฟฟ้า
8. เข็มฉีดยาขนาด 5 ซีซี.
9. ตัวทำลายสำรฆ่าแมลง ได้แก่
  - น้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ (olive oil)
  - น้ำมันซิลิโคน (silicone oil)
  - น้ำมันโรเซลล่า (reisella oil)
  - อะซีโตน (acetone)
  - คลอโรฟอร์ม (chloroform)

## วิธีดำเนินการทดลอง

### ขั้นตอนที่ 1 การเลี้ยงยุงกันปล่อง

นำไข่ยุงกันปล่อง An. (Cel.) dirus สายพันธุ์ SEAD มาเลี้ยงขยายจำนวน โดยถ่ายลูกน้ำยุงระยะที่ 1 ลงภาชนะพลาสติกที่ใส่น้ำประปาไว้สูงประมาณ 1.5 นิ้ว ให้อาหารที่บดและกรองเสร็จเรียบร้อยแล้วแก่ลูกน้ำวันละ 2 ครั้ง โดยโรยให้ครั้งละน้อย ๆ ถ้าผิวน้ำมีฝ้าก็ใช้กระดาษขบและขบออกให้หมด เลี้ยงในอุณหภูมิระหว่าง 26 - 28.5 °C. ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80 - 90% เมื่อถึงระยะดักแด้ (12 - 14 วัน) ใช้หลอดดูดดักแด้ยุงใส่ถ้วยกระเบื้องซึ่งมีน้ำบรรจุอยู่ 2 ใน 3 ของถ้วย และจำนวนดักแด้ต้องไม่หนาแน่นเกินไป นำถ้วยใส่ดักแด้ไปวางในกรงเลี้ยงยุงขนาดกลาง เมื่อดูดครบเป็นตัวเต็มวัย (1 - 2 วัน) เลี้ยงด้วยวิตามินไซรป์เข้มข้น 10% โดยใช้สำลีพันรอบแท่งไม้เล็ก ๆ ชุบไซรป์และเปลี่ยนอาทิตย์ละ 2 ครั้งเพื่อมิให้วิตามินไซรป์บูดเสีย เมื่อยุงมีอายุ 4 - 5 วันก็พร้อมที่จะผสมพันธุ์ จึงให้เลือดโดยสับหนูตะเภาใส่กรงหนูขนาดพอดีตัวเพื่อให้ยุงดูดเลือดได้ง่าย หนูตะเภานี้ไปวางไว้ในกรงยุงที่จะทำการผสมพันธุ์ เมื่อยุงเพศเมียกินเลือดอิ่มแล้วนำมาผสมกับยุงเพศผู้โดยวิธีผสมเทียม (Baker, 1962) จากนั้นจึงนำเพศเมียที่ผสมแล้วไปไว้ในกรงที่มีถ้วยพลาสติกซึ่งรองด้วยกระดาษกรองวัดแมนเบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15.0 ซม. และใส่น้ำ 1 ใน 3 ของถ้วยเพื่อให้ยุงวางไข่ เพศเมียที่ผสมพันธุ์แล้วประมาณ 3 วันจะวางไข่เพศเมียที่แข็งแรงสามารถมีชีวิตอยู่ได้ 20 - 30 วัน และวางไข่ได้ 4 - 6 ครั้ง ในระยะนี้จะให้เลือดทุกวัน นำถ้วยที่มีไข่ยุงออกจากกรง ค่อย ๆ ฉีดน้ำให้ไข่ที่ติดอยู่ข้างกระดาษกรองลงไปอยู่ที่ระดับน้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ฟักเป็นลูกน้ำระยะที่ 1 (2 - 3 วัน) ใส่ถ้วยพลาสติกที่รองด้วยกระดาษกรองใบใหม่ไว้ในกรง เพื่อให้ยุงเพศเมียวางไข่ต่อไป

สำหรับยุงกันปล่อง An. (Cel.) dirus 3 สายพันธุ์จากห้องที่ต้องเลี้ยงแยกแต่ละสายพันธุ์ไม่ปะปนกัน รวมทั้งแยกแต่ละช่วงรุ่นออกจากกันด้วย ส่วนวิธีการเลี้ยงอื่น ๆ ได้ทำตามวิธีที่ได้กล่าวข้างต้นจนกว่าจะได้ปริมาณมากพอที่จะใช้ในการทดสอบสารฆ่าแมลง โดยใช้ยุงจากห้องที่นี้ไม่เกินรุ่นที่ 9 เพื่อให้ความไวต่อสารเคมีของแมลงมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมน้อยที่สุด

## ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบกับสารฆ่าแมลง

### การเตรียมกระดาดทดสอบ

- เตรียม stock solution ของสารฆ่าแมลงแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 10% เก็บใส่ขวดแก้วที่อุณหภูมิ 4 - 6 ช. โดยชั่งสารเคมีที่เป็นผงหรือชนิดที่เป็นผลึกอย่างละ 1 กรัม แยกใส่ในขวดทำละลายชนิดที่ 1 ปริมาณ 9 ซีซี. จะได้สารละลายเข้มข้น 10% ถ้าเป็นของเหลวใช้ปิเปตดูดสารฆ่าแมลงอย่างละ 1 ซีซี. แยกใส่ในขวดทำละลายชนิดที่ 1 ปริมาณ 9 ซีซี. จะได้สารละลายเข้มข้น 10%
- เตรียมสารละลายสารฆ่าแมลงแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตามที่ต้องการโดยใช้ stock solution ที่เตรียมไว้
- ตัดกระดาษกรองวัดแมนเบอร์ 1 ขนาด 12 x 15 ตร.ซม. ดูดสารละลายสารฆ่าแมลงจำนวน 0.7 ซีซี. ใส่ลงในขวดเตรียมสารที่มีตัวทำละลายชนิดที่ 2 จำนวน 1.8 ซีซี. จะได้สารละลายเป็น 2.5 ซีซี. ในการผสมนี้ใช้ตัวทำละลายชนิดที่ 1 คู่กับตัวทำละลายชนิดที่ 2 ดังนี้

<u>สารฆ่าแมลง</u>	<u>ตัวทำละลายชนิดที่ 1</u>	<u>ตัวทำละลายชนิดที่ 2</u>
ดีดีที	น้ำมันโรเซลล่า	คลอโรฟอร์ม
เพนนิโตรโรออน	น้ำมันมะกอก	อะซีโตน
ไพริธรินส์	น้ำมันซิลิโคน	คลอโรฟอร์ม
เดลต้า เมอร์ริน	น้ำมันซิลิโคน	คลอโรฟอร์ม
ไบโอเรส เมอร์ริน	น้ำมันซิลิโคน	คลอโรฟอร์ม
อัลเลธริน	น้ำมันซิลิโคน	คลอโรฟอร์ม

- ใช้เข็มฉีดยาขนาด 5 ซีซี. ดูดสารละลายสารฆ่าแมลงที่ผสมตัวทำละลายชนิดที่ 2 แล้วนี้จำนวน 2.5 ซีซี. ค่อย ๆ ปล่อยลงบนผิวกระดาษกรองด้านหน้าให้กระจายสม่ำเสมอจนหมด 2.5 ซีซี. ที่ปลายสุดของกระดาษกรองพอดี ผึ่งกระดาษที่ฉาบสารฆ่าแมลงแล้วนี้ไว้ประมาณ 2 - 3 ชั่วโมง ให้ตัวทำละลายชนิดที่ 2 ระเหยไปจนหมดจึงเก็บใส่กล่องไว้ใช้ต่อไป



### การทดสอบ

1. นำยุง An. (Cel.) dirus สายพันธุ์ SEAD ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความไวต่อสารฆ่าแมลง มาทดสอบหาความเข้มข้นมาตรฐานและช่วงเวลาเป็น logarithmic series ของสารฆ่าแมลงแต่ละชนิด ที่ทำให้ยุงตัวเต็มวัยทั้ง เพศผู้และเพศเมียตายจากน้อยไปหามาก โดยให้ได้อัตราการตายอยู่ในช่วงที่ต่ำกว่าร้อยละ 50 และสูงกว่าร้อยละ 50 สูงสุดร้อยละ 100 หรือใกล้เคียง

การทดสอบยุงตัวเต็มวัยใช้เทคนิควิธีการทดสอบขององค์การอนามัยโลก (WHO, 1970) ดังนี้

1.1 นำกระดาษที่ฉาบสารฆ่าแมลงความเข้มข้นต่าง ๆ ใส่ลงในกระบอกทดสอบจุดแดง ใส่คลิปทองแดงให้กระดาษติดแนบกับกระบอก ปิดตาข่ายลวดและฝาไว้ปลายด้านหนึ่ง

1.2 แยกยุงเพศผู้และเพศเมียท้องแห้งอายุ 1 วัน ซึ่งเป็นสภาวะที่มีความไวที่สุดใส่ในกระบอกทดสอบจุดเขียว ซึ่งมีกระดาษขาวธรรมดาติดด้วยคลิปเงินกระบอกละ 25 ตัว ตั้งพักไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง

1.3 ถ้ายุงจากกระบอกทดสอบจุดเขียวเข้าไปในกระบอกจุดแดง โดยเลื่อนสไลด์ออกค่อย ๆ เคาะและใช้ปากเป่าเบา ๆ เพื่อให้การถ่ายยุงง่ายขึ้น แล้วจึงปิดสไลด์

1.4 ปล่อยให้ยุงเกาะเป็นระยะเวลาที่ต้องการเป็น logarithmic series (7.5, 15, 30, .... นาที) ถ้ายุงกลับเข้าสู่กระบอกจุดเขียว ใช้ล้าสบู่วิตามินไฮรอป 10% วางบนกระบอกจุดเขียวนี้ ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงจึงนับจำนวนยุงที่ตายในแต่ละกระบอก

1.5 ทดลองเพียง 1 ชั่วโมงในการทดสอบหาความเข้มข้นมาตรฐานและช่วงเวลาที่เหมาะสมของสารฆ่าแมลงแต่ละชนิด (ยกเว้น ดีดีทีใช้ 4% ตามมาตรฐานองค์การอนามัยโลก) ได้ผลการทดสอบดังนี้

<u>สารฆ่าแมลง</u>	<u>ความเข้มข้นมาตรฐาน (%)</u>	<u>ช่วงเวลาที่เหมาะสม (นาที)</u>
ดีดีที	4.00	7.5, 15, 30, 60
เพนนิโตรโรอน	0.15	15, 30, 60, 120
ไพริรินส์	0.20	7.5, 15, 30, 60, 120
เตลด้า เมอร์ริน	0.01	7.5, 15, 30, 60, 120
ไบโอเรลล์เมอร์ริน	0.075	7.5, 15, 30, 60
อัลเลธริน	0.30	7.5, 15, 30, 60, 120

2. เตรียม stock solution ของสารฆ่าแมลงแต่ละชนิดตามความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้น

3. ทดสอบบุง เพศผู้และเพศเมียสายพันธุ์ SEAD สายพันธุ์อุดรธานี สายพันธุ์ลีลล และสายพันธุ์สันทุร์ ตามเทคนิคและวิธีการจากข้อ 1.1 ถึง 1.4 โดยใช้ความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงและช่วงเวลาที่หาได้ ทดลอง 6 - 8 ชั่วโมงแต่ละการทดลองและมีกลุ่มควบคุมซึ่งใช้กระดาษกรองที่มีตัวทำลายชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 ฉาบอยู่

4. คำนวณอัตราการตายของบุงโดยคำนวณจากสูตรของ Abbott's formular

$$\% \text{ mortality} = \frac{\% \text{ mortality (ทดสอบ)} - \% \text{ mortality (ควบคุม)}}{100 - \% \text{ mortality (ควบคุม)}} \times 100$$

ใช้สูตรนี้เมื่ออัตราการตายของกลุ่มควบคุมอยู่ระหว่างร้อยละ 5 - 20 ถ้าต่ำกว่าร้อยละ 5 ไม่ต้องนำมาคิด ถ้าสูงกว่าร้อยละ 20 ต้องทำการทดลองใหม่

5. เขียนกราฟระหว่างระยะเวลาที่ทดสอบกับอัตราการตายเป็นร้อยละในกระดาษกราฟ โดยใช้ Probit-log scale และคำนวณหาเส้นตรงจากข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ Probit Regression Line (Finney และ Tattersfield, 1952) หาค่า  $LT_{50}$  และ  $LT_{95}$  จากกราฟที่ได้ (ระยะเวลาทดสอบที่ทำให้บุงตายลง 50 และ 95% ตามลำดับ)

6. ศึกษาระดับความไวต่อดีดีทีและเพนนิโตรโรอนของบุงก้นปล่อง An. (Cel.) dirus ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์อุดรธานี สายพันธุ์สันทุร์ และสายพันธุ์ลีลล

7. ศึกษาระดับความไวต่อไพริรินส์และสารพวกไพริโรอิด

8. ทหาระดับความต้านทาน (Resistance level) โดยใช้ค่า  $LT_{50}$  ในการเปรียบเทียบตามสูตร

$$R - level = \frac{LT_{50} \text{ สายพันธุ์ท้องถิ่น}}{LT_{50} \text{ สายพันธุ์ที่มีความไว}}$$

9. พิจารณาว่ามีความต้านสาร เคมีข้ามกลุ่มหรือไม่

10. เปรียบเทียบผลของการศึกษาระดับความไวระหว่างยุง เพศผู้และ เพศเมีย ในแต่ละสายพันธุ์ และระหว่างสายพันธุ์ SEAD กับสายพันธุ์ท้องถิ่นทั้ง เพศผู้และ เพศเมีย

### ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

3.1 หาค่าเฉลี่ยการตายของยุงจากการทดลอง 6 - 8 ซ้ำ โดยใช้สูตรการหาค่าเฉลี่ยเลขคณิต

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

3.2 หาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

3.3 เปรียบเทียบความแตกต่างของผลการทดลองระหว่างสายพันธุ์และเพศของยุง โดยใช้ Chi-square ( $\chi^2$ ) จากตารางสำเร็จแบบ 2 x 2 (ล้วน สายยศ, 2519)

	A	B	
x	a	b	a + b
y	c	d	c + d
	a + c	b + d	N

$$\chi^2 = \frac{(|ad - cb| - \frac{1}{2} N)^2 N}{(a+b)(a+c)(b+d)(c+d)}$$

เมื่อ	$\bar{x}$	=	ค่าเฉลี่ยเลขคณิต
	S.D.	=	ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	$x_i$	=	ข้อมูลของแต่ละหน่วยเวลา
	$n$	=	จำนวนกลุ่มตัวอย่าง
	$\chi^2$	=	Chi-square
	$x$	=	ชนิดของบุงที่ 1
	$y$	=	ชนิดของบุงที่ 2
	A	=	บุงที่ตาย
	B	=	บุงที่ไม่ตาย
	a, c	=	อัตราการตายของบุง (ร้อยละ)
	b, d	=	อัตราการรอด (ร้อยละ)
	N	=	ผลรวมของข้อมูลทั้งหมด