จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การศึกษาชนิดของยุงที่มีศักยภาพในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มสุกร จังหวัดนครปฐม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช
สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์

กันยายน 2548

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาชนิดของยุงที่มีศักยภาพในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส
ในฟาร์มสุกร จังหวัดนครปฐม

โดย

รศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช
นางสุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์

เดือนกันยายน ปีพ.ศ. 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหน่วยงานหลายๆฝ่าย

ขอขอบคุณทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปี 2547 ที่ให้เงินสนับสนุนในการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณทานตะวันฟาร์ม อ.เมือง จ.นครปฐม ที่เอื้อเฟื้อในการเก็บตัวอย่างยุง

ขอขอบคุณ รศ.ดร.ชำนาญ อภิวัฒนศร ภาควิชากีฏวิทยา คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ในการช่วยตรวจยืนยันชนิดของยุงตัวเต็มวัย

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์กฤษฎากรณ์ พริ้งเพราะ นายสัตวแพทย์ระพี ปัญญาทอง และนายสัตวแพทย์วีระศักดิ์ สะดะ ที่ช่วยเหลืองานในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ คุณวรรณภรณ์ จันทร์หอม และคุณศิวะพร กล่ำคล้าย นิสิตปริญญาโท หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างยุง

ขอขอบคุณหน่วยยานยนตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกในเรื่องการเดินทางในการเก็บตัวอย่าง

ท้ายนี้ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยพยาธิวิทยา หน่วยปรสิตวิทยา และหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อและให้ความสะดวกด้านสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย	การศึกษาชนิดของยุงที่มีศักยภาพในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มสุกร จังหวัดนครปฐม
ชื่อผู้วิจัย	รศ.น.สพ.ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช และนางสุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์
เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ	เดือนกันยายน ปีพ.ศ. 2548

บทคัดย่อ

การสำรวจชนิดของยุงในฟาร์มสุกรที่มีการระบาดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จังหวัดนครปฐม ทำการเก็บตัวอย่างยุงทุกเดือนเดือนละ 1 ครั้ง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2547 ถึงเดือนเมษายน 2548 โดยทำการเก็บตัวอ่อนยุงจากแหล่งน้ำภายในระยะรัศมี 1 กิโลเมตรรอบฟาร์ม และดูดเก็บยุงตัวเต็มวัยตัวเมียขณะดูดเลือดบนตัวสุกรโดยใช้ oral aspirators ตั้งแต่เวลา 18.00 – 22.00 น. พบว่ายุงที่จับได้จำนวน 91,840 ตัว จำแนกได้ 3 สกุล 6 ชนิด คือ *Culex tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus*, *Mansonia uniformis*, *Ma. annulifera, Anopheles vagus* และ *An. peditaeniatus* โดยยุงที่พบได้มากที่สุดคือยุง *Cx. tritaeniorhynchus* (60-95.75%) และยุงที่พบน้อยที่สุดคือยุง *Ma. annulifera* (0.02-0.05%) ผลการตรวจตัวอ่อนจากแหล่งน้ำพบตัวอ่อนของยุง *Cx. tritaeniorhynchus, Cx. gelidus, An. vagus* และ *An. peditaeniatus* การทดสอบศักยภาพในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ของยุง *Cx. tritaeniorhynchus* แบ่งเป็น 2 การทดลองคือ การทดสอบระยะเวลาที่ตรวจพบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ของยุง และการทดสอบความสามารถในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ของยุงจากสุกรทดลองฉีดเชื้อไปยังสุกรปลอดเชื้อ จากการทดลองแรกพบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุง *Cx. tritaeniorhynchus* ได้นาน 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี RT-PCR และเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถมีชีวิตในยุง *Cx. tritaeniorhynchus* ได้นาน 2 ชั่วโมง ภายหลังการกัดและดูดเลือดสุกรทดลองฉีดเชื้อ และผลการทดสอบความสามารถในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยนำยุงติดเชื้อมากัดและดูดเลือดสุกรปลอดเชื้อโดยตรง ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรทุกตัว ในขณะที่พบผลบวกต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในที่สุกรปลอดเชื้อที่ได้รับการฉีดตัวอย่างยุงบดหลังการกัดและดูดเลือดสุกรทดลองฉีดเชื้อ 30 นาที ด้วยวิธี RT-PCR และ ELISA ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ายุง *Cx. tritaeniorhynchus* พบได้มากที่สุดในฟาร์มสุกรมีแนวโน้มนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แบบทางกลได้ และไม่สามารถแพร่เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยการกัดหรือดูดเลือดได้

Project Title	Study on potential vectors of PRRSV in mosquitoes from a PRRSV-positive swine farm in Nakorn Pathom Province
Name of the Investigators	Roongroje Thanawongnuwech and Sudchit Chungpivat
Year	September 2005

Abstract

A survey on mosquito species was conducted once a month in a PRRS positive farm in Nakorn Pathom province during May 2004 to April 2005. The mosquito larvae were collected in the vicinity of 1 km and the adult females were captured while feeding on the pigs by using oral aspirators between 6 to 10 pm. Of 91,840 mosquitoes, there were 3 genus and 6 species as the following *Culex tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus* , *Mansonia uniformis*, *Ma. annulifera, Anopheles vagus* and *An. Peditaeniatus* with the predominant of *Cx. tritaeniorhynchus* (60-95.75%) and *Ma. annulifera* was the least (0.02-0.05%). Collected mosquitoes larvae include *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus* , *An. vagus* and *An. peditaeniatus.* To determine whether *Cx. tritaeniorhynchus* could serve as a potential vector for PRRSV transmission, 2 experiments were conducted: the duration of PRRSV within the mosquitoes and the PRRSV transmission from the PRRSV-infected pigs to the naive pigs by infected mosquitoes. PRRSV could be detected in mosquito pooled samples for up to 48 hours post feeding on the PRRSV-infected pig (PFP) using RT-PCR, whereas the PRRSV could be isolated from the mosquito samples for up to 2 hours PFP. The results of PRRSV transmission showed that all naive pigs used in the mosquito contact protocol were negative, whereas, the swine bioassay using pooled mosquitoes 30 minutes PFP was positive for PRRSV detection by both RT-PCR and ELISA. The results of this study demonstrated that *Cx. tritaeniorhychus*, a predominant mosquito species found in a pig farm which was able to transmit PRRSV mechanically and was unlikely to transmit the PRRSV via biting or sucking blood.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ii

บทคัดย่อภาษาไทย iii

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ iv

รายการตารางประกอบ vii

รายการภาพประกอบ viii

บทที่

1. บทนำ 1
2. การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
   - คุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส 3
   - ลักษณะทางชีววิทยาของยุง 4
3. วิธีการวิจัย 6
   - การทดลองที่ 1 การศึกษาถึงชนิดของยุงที่มีศักยภาพในการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส 6
     - 1.1 การสำรวจยุงในฟาร์มสุกร 6
     - 1.2 การเพาะเลี้ยงยุงในห้องปฏิบัติการ 7
       - 1.2.1 การเพาะเลี้ยงยุง *Culex* 7
       - 1.2.2 การเพาะเลี้ยงยุง *Mansonia* 7
       - 1.2.3 การเพาะเลี้ยงยุง *Anopheles* 7
     - 1.3 การนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุงทดลอง 7
       - 1.3.1 การเตรียมยุงทดลอง 7
       - 1.3.2 การเตรียมสุกรทดลอง 8
     - 1.4 การตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุงทดลอง 8
       - 1.4.1 ขั้นตอนการสกัด RNA 8
       - 1.4.2 ขั้นตอนการทำ RT-PCR 9
       - 1.4.3 ขั้นตอนการทำ Viral isolation 11
       - 1.4.4 จดบันทึกผลการทดลอง วิเคราะห์และรายงานผลการทดลอง 12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

- การทดลองที่ 2 การทดสอบความสามารถในการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ของยุง *Cx. tritaeniorhynchus* จากสุกรติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ไปยังสุกรปลอดเชื้อ 12
  - 2.1 การเตรียมยุงทดลอง 12
  - 2.2 การเตรียมสุกรทดลอง 13
  - 2.3 การ Infect เชื้อไวรัสจากยุงที่ดูดเลือดสุกรกลุ่มตัวให้ไปยังสุกรกลุ่มตัวรับ 13
  - 2.4 การตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จากสุกรกลุ่มตัวรับ 14
    - 2.4.1 การนำเลือดสุกรมาทดสอบโดยวิธี ELISA 14
    - 2.4.2 การชันสูตรผ่าซากสุกร 15
    - 2.4.3 จดบันทึกรอยโรค ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง และรายงานผลการทดลอง 15

4. ผลการวิจัย 16
   - การทดลองที่ 1 การศึกษาชนิดของยุงที่มีศักยภาพในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส 16
     - 1.1 การสำรวจชนิดของยุงในฟาร์มสุกร 16
     - 1.2 การตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุงทดลอง 23
   - การทดลองที่ 2 การทดสอบความสามารถในการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ของยุง *Cx. tritaeniorhynchus* จากสุกรติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ไปยังสุกรปลอดเชื้อ 26
5. การอภิปรายผล 30
6. ข้อสรุป 33
7. ข้อเสนอแนะ 34
8. บรรณานุกรม 35
9. ส่วนผนวก 39

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	ผลการสำรวจชนิดและจำนวนคิดเป็นร้อยละของยุงที่พบในฟาร์มสุกรที่มีการระบาดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในจังหวัดนครปฐม ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2547 ถึงเมษายน 2548 ระหว่างเวลา 18.00 - 22.00 น.	22
ตารางที่ 2	แสดงผลการตรวจไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในยุงทดลอง หลังจากดูดเลือดสุกรติดเชื้อด้วยวิธี RT-PCR และ Virus isolation	24
ตารางที่ 3	ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในวันที่ 14 จากการผ่าซากสุกรหลังจากได้รับเชื้อโดยวิธี mosquito contact protocol และ swine bioassay ในระยะเวลาต่างๆกัน	27

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

หน้า

รูปที่ 1	แสดงวิธีการเก็บตัวอย่างยุงตัวเต็มวัยที่เข้ามากัดและดูดเลือดสุกรในฟาร์ม โดยใช้ไฟฉายส่อง และดูดจับด้วย oral aspirator	17
รูปที่ 2	ตัวอย่างยุงที่เก็บได้จากตัวสุกรแยกเก็บใส่กล่องขนาดเล็กที่มีผ้าโปร่งคลุมด้านบนกล่องละ 200 ตัว ใช้ก้อนสำลีชุบน้ำวางไว้ด้านบนกล่องสำหรับขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการ	17
รูปที่ 3	กรงเลี้ยงยุงตัวเต็มวัย ขนาด 25 X 25 X 25 เซนติเมตร กรุมุ้งลวดทั้ง 4 ด้าน	18
รูปที่ 4	รูปแสดงการเพาะเลี้ยงยุง *Culex* ในห้องปฏิบัติการ	18
รูปที่ 5	รูปแสดงการเพาะเลี้ยงยุง *Mansonia* ในห้องปฏิบัติการ	18
รูปที่ 6	รูปแสดงการเพาะเลี้ยงยุง *Anopheles* ในห้องปฏิบัติการ	18
รูปที่ 7	แสดงวิธีการให้ยุงทดลองดูดเลือดสุกรทดลอง	19
รูปที่ 8	ลักษณะแหล่งน้ำในรัศมี 1 กิโลเมตรรอบๆ ฟาร์มสุกร	19
รูปที่ 9	จำนวนร้อยละของตัวอย่างยุงในแต่ละเดือนที่เก็บได้ขณะเข้ามาดูดเลือดในฟาร์ม ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2547 ถึงเดือนเมษายน 2548 ระหว่างเวลา 18.00-22.00 น.	20
รูปที่ 10	ยุงที่จับได้ขณะเข้ามาดูดเลือดสุกรในฟาร์ม ระหว่างเวลา 18.00 - 22.00 น.	21
รูปที่ 11	แสดงแถบดี เอ็น เอ ของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จากการตรวจด้วยวิธี Nested multiplex RT-PCR	25
รูปที่ 12	แสดงปอดสุกรจากการชันสูตรซากหลังจากได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส 14 วัน	28
รูปที่ 13	การตรวจสอบแอนติบอดี้ต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	29

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

โรค พี อาร์ อาร์ เอส (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome or PRRS) ในสุกรเป็นโรคสำคัญชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดความสูญเสียอย่างสูงในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั่วโลก โดยมีรายงานการเกิดโรคครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาในปีค.ศ. 1987 ซึ่งทำให้สุกรป่วยเกิดอาการทางระบบหายใจและระบบสืบพันธุ์ และเนื่องจากในขณะนั้นยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของโรค จึงได้ชื่อเป็น Mystery swine disease (Albina, 1997) ต่อมาในปี 1990 พบอาการของโรคที่มีลักษณะคล้ายกันระบาดในสุกรแถบทวีปยุโรป ปี ค.ศ. 1991 Wensvoort และคณะ (1991) ได้แยกเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้สำเร็จ และให้ชื่อว่า Lelystad virus ซึ่งต่อมา Office International des Epizooties (O.I.E.) ได้ให้ชื่อของกลุ่มอาการเหล่านี้ว่า Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (Denac et al., 1997; Zimmerman, 2002; Plagemann, 2003) สำหรับประเทศไทยจากรายงานการตรวจสอบซีรั่มสุกรย้อนหลัง ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส ตั้งแต่ปี 2532 โดยพบว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับชนิดของไวรัสที่แยกได้ในประเทศสหรัฐอเมริกา (Damrongwatanapokin et al., 1996 , 1998)

เชื้อ Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) เป็นไวรัสที่มีขนาด 48-83 nm. จัดอยู่ใน Genus Arterivirus, Family Arteriviridae, Order Nidovirales มีลักษณะเป็น enveloped, single-strand RNA virus ประกอบด้วย 8 open reading frams (ORFs) คือ ORF 1a, 1b และ ORF 2-7 (Denac et al., 1997; Yoon and Stevenson, 2002) แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ตามลักษณะความแตกต่างทางแอนติเจนคือ สายพันธุ์ประเทศยุโรป (European genotype) และสายพันธุ์ประเทศสหรัฐอเมริกา (US genotype)

การศึกษาถึงพยาธิกำเนิดของโรค พี อาร์ อาร์ เอส พบว่าสุกรติดเชื้อไวรัส และเชื้อไวรัสจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในเซลล์ตระกูล mononuclear phagocytic system (MPS) ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น monocyte และ macrophage โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ macrophage ที่อยู่ในปอด (Thanawongnuwech et al., 2000) และความเสียหายเนื่องจากการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ก็คือ ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ อันเป็นเหตุให้สุกรที่ติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถติดเชื้อแทรกซ้อนชนิดอื่นได้ง่าย เช่นเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อไวรัสชนิดอื่น เป็นต้น

การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส พีอาร์ อาร์ เอส เกิดขึ้นได้หลายทาง ได้แก่ ทางรก ทางน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ การสัมผัสโดยตรงกับสุกรที่ป่วยเป็นโรค หรือแม้กระทั่งการติดต่อผ่านอุปกรณ์เครื่องใช้ในฟาร์ม นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มีการแพร่ระบาดแบบทางกล (mechanical transmission) ผ่านทางเข็มฉีดยาและแมลงวันบ้าน (*Musca domestica*) ได้อีก

ด้วย (Otake et al., 2003a,b,c) จากการศึกษาที่ผ่านมามีรายงานว่า แมลงดูดเลือดชนิดต่างๆ สามารถเป็นพาหะนำโรคต่างๆในสัตว์ได้ เช่น เหลือบ (Horseflies) นำโรคอหิวาต์สุกร (Tidwell et al., 1972) แมลงวันบ้าน (*Stomoxys calcitrans*) นำโรค Bovine leucosis (Weber et al., 1988) ส่วนยุงก็มีรายงานว่าเป็นแมลงดูดเลือดที่เป็นพาหะนำโรคชนิดต่างๆได้เป็นอย่างดี เช่น โรคมาลาเรียในคน โรคมาลาเรียในไก่ โรค Eperythrozoonosis ในสุกร (Prullage et al., 1993) รวมทั้งโรคไข้สมองอักเสบซึ่งมีสุกรเป็นแหล่งกักเก็บโรค (Johansen et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ยุงสามารถเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้ในสุกร (Otake et al., 2002) ซึ่ง Otake และคณะ (2003a) ได้ศึกษาและพบว่ายุง *Aedes vaxans* ซึ่งพบได้มากที่สุดในฟาร์มสุกรที่มีการระบาดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถนำโรคชนิดนี้ได้แบบทางกล (Mechanical transmission) โดยพบว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถอยู่ในตัวยุงได้นานที่สุด 6 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาในทวีปอเมริกาเหนือ ซึ่งมีความแตกต่างของพื้นที่และสภาพภูมิอากาศ รวมถึงชนิดของยุงที่พบในประเทศไทย

สำหรับในประเทศไทย ยุงที่พบได้มีหลายสกุล ได้แก่ สกุล *Aedes* จำนวน 113 ชนิด สกุล *Culex* จำนวน 82 ชนิด สกุล *Mansonia* จำนวน 6 ชนิด สกุล *Anopheles* จำนวน 58 ชนิด สกุล *Armigeres* จำนวน 23 ชนิด และสกุล *Toxorhynchites* จำนวน 8 ชนิด (Sucharit, 1986) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาและสำรวจยุงที่พบในบริเวณฟาร์มไก่ที่เป็นแหล่งระบาดของโรคมาลาเรียไก่ในประเทศไทย พบว่ามียุงสกุล *Culex* จำนวน 3 ชนิด สกุล *Mansonia* จำนวน 3 ชนิด และสกุล *Anopheles* จำนวน 1 ชนิด และยังพบว่ายุง *Culex tritaeniorhyn*chus และ *Cx. gelidus* มีศักยภาพในการเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียไก่ได้ (สุดจิตต์ และคณะ, 2543; สุวรรณี และคณะ, 2543)

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น ซึ่งมีลักษณะภูมิอากาศเหมาะสมต่อการแพร่พันธุ์ของยุง และมียุงหลายชนิด ประกอบกับมีการระบาดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรจึงอาจส่งผลต่อการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ให้ระบาดในประชากรของสุกรได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อสำรวจและศึกษาชนิดของยุงที่พบในฟาร์มสุกรที่เป็นแหล่งที่มีการระบาดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส และศึกษาชนิดของยุงที่มีศักยภาพในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนการควบคุมหรือจัดการเพื่อลดปัญหาความสูญเสียที่เกิดจากเชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มสุกรในประเทศไทยได้อีกทางหนึ่ง

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส

โรค พี อาร์ อาร์ เอส (Poecine reproductive and respiratory syndrome) ในสุกร เกิดจากเชื้อไวรัสที่มีลักษณะเป็น Enveloped, Single-strand RNA virus จัดอยู่ใน Genus Arterivirus, Family Arterviridae, Order Nidovirales พบมีการระบาดครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาเหนือในปี 2530 และก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นอย่างมาก (Plagemann, 2003) ในปัจจุบันสามารถแบ่งชนิดของเชื้อไวรัสเป็นกลุ่มสายพันธุ์หลักๆได้ 2 สายพันธุ์ ตามลักษณะความแตกต่างทางพันธุกรรม (genotype) คือ กลุ่มสายพันธุ์ประเทศสหรัฐอเมริกา (US genotype) และกลุ่มสายพันธุ์ประเทศยุโรป (EU genotype) ความแตกต่างทางพันธุกรรมยังพบได้ในกลุ่มสายพันธุ์ของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่แยกได้จากทางประเทศสหรัฐอเมริกาอีกด้วย โยสามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยตามความรุนแรงของโรค

จากการศึกษาพบว่า เชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มีรหัสทางพันธุกรรมขนาด 15 kb และประกอบด้วย 8 open reading frams (ORFs) คือ ORF 1a, 1b และ ORF 2-7 (Denac et al., 1997; Yoon, 2002) ORF1a และ 1b เป็น non-coding sequence มีตำแหน่งที่ด้าน 5' และมีขนาดเป็น 80% ของลำดับเบสทั้งหมด ORF 2-7 เป็น coding sequence จะมีตำแหน่งที่ด้าน 3' ของสายนิวคลีโอไทด์ (Yoon, 2002)

การก่อโรคของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ขึ้นกับความรุนแรงของสายพันธุ์ โดยกลุ่มสายพันธุ์ US มักก่อให้เกิดอาการทางคลินิกมากกว่าสายพันธุ์ EU อาการที่พบในสุกร ได้แก่ ความสูญเสียในระบบสืบพันธุ์ในสุกรแม่พันธุ์ และพ่อสุกร เช่น การตายแรกคลอดเพิ่มสูงขึ้น การแท้งหรือปัญหาลูกสุกรอ่อนแอหลังคลอดเพิ่มขึ้น อัตราการผสมติดต่ำลง (น้ำเชื้อพ่อพันธุ์อ่อนแอ) เป็นต้น นอกจากนี้สุกรยังอาจแสดงอาการป่วยทางระบบหายใจซึ่งพบได้ในสุกรทุกช่วงอายุ (Segales and McCaw, 2002) ทั้งนี้พบว่าความสูญเสียอันเนื่องมาจากปัญหาการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส นั้นส่วนใหญ่เกิดเนื่องจากการติดเชื้อแทรกซ้อนทางระบบหายใจจากเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ (Segales and McCaw, 2002)

การแพร่ระบาดของโรค พี อาร์ อาร์ เอส เกิดได้หลายทาง ได้แก่ ทางอากาศ (airborne transmission) ในช่วงระยะทางสั้นๆ (Kristensen et al., 2004) ทางรก ทางน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ การสัมผัสโดยตรงกับสุกรที่ป่วยเป็นโรค หรือแม้กระทั่งการติดต่อผ่านอุปกรณ์เครื่องใช้ในฟาร์ม นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มีการแพร่ระบาดแบบทางกล (Mechanical transmission) ผ่านทางเข็มฉีดยา ยุง และแมลงวันบ้าน (*Musca domestica*) ได้อีกด้วย โดย

Otake และคณะ (2003a) ได้ศึกษาและพบว่ายุง *Aedes vaxans* ซึ่งพบได้มากที่สุดในฟาร์มสุกรที่มีการระบาดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถอยู่ในตัวยุงได้นานที่สุด 6 ชั่วโมง ในขณะที่แมลงวันบ้าน (*Musca domestica*) สามารถนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้นานถึง 12 ชั่วโมง (Otake et al., 2003b,c)

ลักษณะทางชีววิทยาของยุง

วงชีวิตของยุงเป็นลักษณะ homometabolous metamorphosis หรือ complete metamorphosis ประกอบด้วยระยะไข่ (egg) ตัวอ่อน หรือลูกน้ำ (larva) ตัวกลางวัย หรือดักแด้ (pupa) และระยะตัวเต็มวัย (adult) การเจริญครบวงจรใช้เวลาประมาณ 3 สัปดาห์ โดยอุณหภูมิของอากาศและความชื้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของยุง

ยุงแต่ละชนิดจะวางไข่แตกต่างกันออกไป อาจวางไข่เดี่ยวๆ เป็นแพหรือเป็นกลุ่มก็ได้ ตลอดชีวิตของยุงจะวางไข่ได้หลายครั้ง แต่ละครั้งอาจมีจำนวน 50-150 ฟอง

ตัวอ่อนหรือลูกน้ำของยุงทุกชนิดอยู่ในน้ำ มีลักษณะคล้ายตัวหนอน ไม่มีขา ลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว อก และท้องอย่างชัดเจน ตัวอ่อนของยุงแต่ละชนิดจะหากินแตกต่างกันออกไป เช่น ตัวอ่อนของยุงก้นปล่องจะหากินอาหารที่อยู่ตามผิวน้ำ ส่วนยุง Culicine จะหากินใต้ผิวน้ำ อาหารของตัวอ่อนส่วนมากเป็นพวกสาหร่าย และสิ่งมีชีวิตเล็กๆใต้ผิวน้ำ

ตัวกลางวัยมีลักษณะคล้ายรูปร่าง comma shape ส่วนหัวและส่วนอกจะเชื่อมต่อกันเรียก cephalothorax ด้านหลังของส่วนอกจะมีท่อหายใจอยู่ 1 คู่ ตัวกลางวัยเมื่อลอกคราบแล้วจะเกาะพักตัวอยู่ชั่วครู่เพื่อให้ปีกแห้ง แล้วบินออกไปหากิน ยุงตัวเมียดูดกินเลือดได้ภายใน 24 ชั่วโมง (Clements, 1992)

ยุงเป็นแมลงดูดเลือดที่เป็นพาหะนำโรคชนิดต่างๆได้เป็นอย่างดี เช่น โรคมาลาเรียในคน โรคมาลาเรียในไก่ โรคไข้สมองอักเสบซึ่งมีสุกรเป็นแหล่งกักเก็บโรค (Johansen et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ยุงสามารถเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้ในสุกร (Otake et al., 2002) ซึ่ง Otake และคณะ (2003a) ได้ศึกษาและพบว่ายุง *Ae. vaxans* ซึ่งพบได้มากที่สุดในฟาร์มสุกรที่มีการระบาดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส และสามารถนำโรคชนิดนี้ได้แบบทางกล (Mechnaical transmission) โดยพบว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถอยู่ในตัวยุงได้นานที่สุด 6 ชั่วโมง

ลักษณะการนำโรคในยุงนั้น สามารถเป็นพาหะได้สองทางคือ แบบทางกล (mechanical transmission) และแบบชีววิธี (biological transmission)

การนำโรคแบบทางกล เป็นการนำลักษณะการนำโรคของยุง โดยยุงจะนำโรคจากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่ง โดยที่เชื้อโรคนั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือเพิ่มจำนวนขึ้นภายในตัวยุง และโรคนั้นอาจไปติดเชื้อในโฮสต์ตัวใหม่ ซึ่งความสามารถของการทำให้ติดโรคนั้นจะลดลงตามเวลาที่ผ่านไป

การนำโรคแบบชีววิธี การนำโรคแบบนี้เชื้อโรคจะมีการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มจำนวนหรือเปลี่ยนแปลงตัวเองในยุงก่อน ดังนั้นจึงมีช่วงเวลาหลังจากที่เชื้อโรคถูกกลืนลงไปและมีการเจริญเติบโตหรือการเปลี่ยนแปลงตัวเอง ซึ่งเชื้อโรคสามารถจะอยู่ในตัวยุงได้เป็นเวลานาน และเชื้อโรคแต่ละชนิดก็มีอวัยวะเป้าหมายในการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนในตัวยุงที่แตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของเชื้อ (Beernsten et al., 2000) นอกจากนี้แล้วยุงแต่ละชนิดและแต่ละพื้นที่ก็มีความสามารถในการนำโรคชนิดต่างๆได้แตกต่างกันออกไป

สำหรับในประเทศไทยนั้น ยุงที่พบได้มีหลายสกุล ได้แก่ สกุล *Aedes* จำนวน 113 ชนิด สกุล *Culex* จำนวน 82 ชนิด สกุล *Mansonia* จำนวน 6 ชนิด สกุล *Anopheles* จำนวน 58 ชนิด สกุล *Armigeres* จำนวน 23 ชนิด และสกุล *Toxorhynchites* จำนวน 8 ชนิด (Sucharit, 1986) และมีการสำรวจชนิดของยุงในบริเวณฟาร์มไก่ที่เป็นแหล่งระบาดของโรคมาลาเรียไก่ พบว่ามียุงสกุล *Culex* จำนวน 3 ชนิด สกุล *Mansonia* จำนวน 3 ชนิด และสกุล *Anopheles* จำนวน 1 ชนิด (สุดจิตต์ และคณะ 2543)

การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกร ทำได้โดยการตรวจหาแอนติบอดี หรือการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสชนิดนี้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อของสุกรที่ป่วย ซึ่งในปัจจุบันมีวิธีการตรวจหลายวิธี เช่น Indirect immunofluorescense antibody test, virus isolation, immunohiatochemistry, ELISA, immunoperoxidase monolayer assay และ reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นต้น (ทริกา และคณะ, 2543; Spagnuolo et al., 1998; Witte et al., 2000; Segales and McCaw, 2002) ซึ่งการทดลองนี้นอกเหนือจากจะเป็นการศึกษาชนิดของยุงที่สามารถพบได้ในบริเวณฟาร์มเลี้ยงสุกรแล้ว ยังเป็นการศึกษาถึงศักยภาพในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ของยุงสกุล *Culex* ที่พบในฟาร์มสุกรในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบที่มีการเลี้ยงสุกรอย่างหนาแน่น ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

วิธีการวิจัย

คณะผู้วิจัยได้วางแผนการศึกษาวิจัยตลอดโครงการเป็นระยะเวลา 1 ปี โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1

การศึกษาถึงชนิดของยุงที่มีศักยภาพในการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยแบ่งการทดลองออกเป็น

1.1 <u>การสำรวจยุงในฟาร์มสุกร</u>

ฟาร์มสุกรที่เป็นแหล่งระบาดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ใช้เป็นสถานที่ศึกษาในครั้งนี้ ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างยุงระยะตัวอ่อน (larvae) และตัวเต็มวัย (adults) เดือนละ 1 ครั้ง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2547 ถึงเดือน เมษายน 2548 เป็นระยะเวลา 1 ปี

ยุงตัวเต็มวัย : ใช้คน 6 คนในการเก็บตัวอย่างยุงแต่ละครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างยุงตัวเต็มวัยที่เข้ามาในฟาร์มและดูดเลือดบนตัวสุกรตั้งแต่เวลา 18.00 - 22.00 นาฬิกา โดยใช้ไฟฉายส่องแล้วใช้ oral aspirator ดูดจับยุงขณะดูดเลือดบนตัวสุกร (รูปที่ 1) แยกใส่กล่องยุงขนาดเล็กที่เจาะรูด้านข้างและมีผ้าโปร่งคลุมด้านบน กล่องละ 200 ตัว ใช้ก้อนสำลีชุบน้ำพอหมาดๆวางบนกล่องยุงแต่ละกล่อง (รูปที่ 2) เก็บตัวอย่างยุงจนถึงเวลา 22.00 น. นำตัวอย่างยุงทั้งหมดขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการเลี้ยงยุง (insectarium room) ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80% ที่หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อศึกษาจำแนกชนิด นับจำนวน เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (colonization) และคัดเลือกยุงชนิดที่พบได้มากที่สุดในแต่ละช่องเดือนเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการอย่างต่อเนื่องเพื่อใช้สำหรับทดลองต่อไป

วิธีการเตรียมยุงตัวเต็มวัยเพื่อจำแนกชนิด : ให้ยุงดมอีเทอร์เป็นเวลานาน 3-5 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างยุงมาปักเข็มโดยวิธี card point technique แล้วศึกษารายละเอียด จำแนกชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอโดยใช้กุญแจจำแนกชนิดของยุงที่พบในประเทศไทย (Rattanarithikul et al., 2005)

ตัวอ่อน : เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำต่างๆในรัศมี 1 กิโลเมตรรอบๆฟาร์ม โดยใช้กระบวยตักน้ำที่ต่อด้วยด้ามไม้ไผ่ จ้วงตักน้ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน และตัวกลางวัย ตัวอย่างที่ได้นำไปเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการจนเป็นระยะตัวเต็มวัย และตัวอย่างบางส่วนนำมาศึกษาจำแนกชนิด โดยใช้กุญแจจำแนกชนิดยุงที่พบในประเทศไทย (Rattanarithikul et al., 2005)

1.2 <u>การเพาะเลี้ยงยุงในห้องปฏิบัติการ</u>

นำตัวอย่างยุงจากข้อ 1.1 มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (insectarium) ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการเลี้ยงยุงทดลองที่มีประตูมุ้งลวด 2 ชั้น ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-27 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 80%

1.2.1 การเพาะเลี้ยงยุง *Culex*

นำยุงตัวเต็มวัยที่ดูดเลือด (engorged female) มาเลี้ยงในกรงเลี้ยงยุงที่กรุมุ้งลวด 4 ด้านขนาด กว้างxยาวxสูง เท่ากับ 25 x 25 x 25 เซนติเมตร (รูปที่ 3) และมีภาชนะสำหรับให้ยุงวางไข่เป็นถ้วยพลาสติกเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร และมีน้ำที่ปราศจากคลอรีน ให้อาหารด้วยน้ำหวาน 10% และวิตามิน B complex โดยใช้สำลีพันไม้ประมาณ 5 นิ้ว จุ่มลงในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีน้ำหวาน 10% และวิตามิน B complex หลังจากยุงวางไข่แล้ว นำไข่ยุง (egg raft) ไปเลี้ยงในถาดพลาสติกขนาด 12 x 25 เซนติเมตร ที่มีน้ำหมักฟางข้าวเจือจาง 2 ลิตร เลี้ยงตัวอ่อน (larvae) ด้วยอาหารหนูบด และเปลี่ยนน้ำทุกๆ 2 วัน จนกระทั่งเจริญเป็นตัวกลางวัย (pupae) ใช้หลอดดูดปากกว้างดูดแยกตัวกลางวัยใส่ถ้วยพลาสติกถ้วยละ 200 ตัว นำไปใส่ในกรงที่กรุมุ้งลวดสำหรับเลี้ยงตัวเต็มวัย ให้ยุงตัวเต็มวัยดูดเลือดหนูถีบจักร เพื่อให้ยุงวางไข่ครั้งต่อไป ทำการเพาะเลี้ยงยุง *Culex* อย่างต่อเนื่องเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (รูปที่ 4)

1.2.2 การเพาะเลี้ยงยุง *Mansonia*

นำยุงตัวเต็มวัยที่ดูดเลือดอิ่มแล้วใส่ในขวดแก้วทรงสูงที่ใส่น้ำหมักอุจจาระหนูถีบจักรเจือจาง ภายในมีวัชพืชน้ำและแผ่นโฟมบางๆสำหรับให้ยุงวางไข่ แยกไข่ยุง (egg clusters) ไปเลี้ยงในภาชนะขวดแก้วใบใหม่ จนกระทั่งไข่เจริญเป็นตัวอ่อน ตัวกลางวัย และตัวเต็มวัยต่อไป (รูปที่ 5)

1.2.3 การเพาะเลี้ยงยุง *Anopheles*

นำยุงตัวเต็มวัยที่ดูดเลือดอิ่มแล้ว ใส่ในถ้วยพลาสติกที่มีผ้าโปร่งคลุมด้านบนที่มีน้ำปราศจากคลอรีน และมีแผ่นพลาสติกใสสี่เหลี่ยมเล็กๆสำหรับเป็นทุ่นให้ยุงวางไข่ หลังจากนั้นแยกไข่ยุงนำไปเลี้ยงในถาดพลาสติกขนาด 12 x 25 เซนติเมตร ที่มีน้ำปราศจากคลอรีน เลี้ยงจนกระทั่งเป็นตัวอ่อน ตัวกลางวัย ดูดแยกตัวกลางวัยไปเลี้ยงในกรงเลี้ยงยุงเช่นเดียวกับการเลี้ยงยุง *Culex* (รูปที่ 6)

1.3 <u>การนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุงทดลอง</u>

1.3.1 การเตรียมยุงทดลอง

สุ่มเลือกยุงแต่ละชนิดในวันแรกที่จับได้จากฟาร์มสุกรชนิดละ 5 ตัว นำมาตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยวิธี RT-PCR และตรวจหาเชื้อไวรัสจากยุง *Cx. tritaeniorhynchus* ที่เพาะเลี้ยงไว้จากข้อ 1.2.1 ก่อนการนำไปสัมผัสเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จากสุกรทดลอง

1.3.2 การเตรียมสุกรทดลอง

นำสุกรอนุบาลเพศผู้อายุ 3 สัปดาห์ จากฟาร์มที่ปลอดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จำนวน 4 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลอง

กลุ่มที่ 1 จำนวน 2 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control)

กลุ่มที่ 2 จำนวน 2 ตัว ฉีดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา (O1NP1) (ปริมาณ $10^4 TCID_{50}$/ml) โดยหยอดจมูกข้างละ 4 มิลลิลิตร เลี้ยงสุกรทั้ง 2 กลุ่มจนกระทั่งวันที่ 7 หลังการสัมผัสเชื้อ (7 days post infection) ซึ่งเป็นระยะที่ไวรัสแพร่กระจายทั่วร่างกาย (viremia) ก่อนการทดลอง นำยุงทดลอง *Cx. tritaeniorhynchus* จากข้อ 1.2.1 งดน้ำและอาหารก่อนการทดลองอย่างน้อย 6 ชั่วโมง แบ่งยุงออกเป็น 2 กรง กรงที่ 1 ให้สัมผัสและกัดดูดเลือดสุกรกลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมลบ กรงที่ 2 ให้สัมผัสและกัดดูดเลือดสุกรทดลองกลุ่มที่ 2 กลุ่มติดเชื้อ โดยทำให้สุกรทดลองสลบทั้งสองกลุ่ม ด้วยยาสลบ Pentobarbital sodium (Nembutal® Ceva sante animale, France) แล้ววางตัวสุกรนอนตะแคงลงด้านบนของกรงยุง ปล่อยให้ยุงดูดเลือดจนอิ่ม หลังจากนั้นดูดแยกยุงที่ดูดเลือดอิ่มเต็มที่ (fully engorged female) จากแต่ละกรงแยกใส่กรงใหม่กรงละ 300 ตัว (รูปที่ 7) แยกเลี้ยงไว้ก่อนการทดสอบในข้อ 1.4

1.4 <u>การตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุงทดลอง</u>

นำตัวอย่างยุงทั้ง 2 กรงจากขั้นตอนที่ 1.3 ดูดแยกมาใช้ครั้งละ 30 ตัว ในระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 ชั่วโมง 7 และ 14 วันหลังการสัมผัสกับสุกร ทำให้ยุงตายด้วยความเย็นจัด โดยนำตัวอย่างยุงใส่ในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส และทำเป็นตัวอย่างรวม (Pooled samples) เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Nested Multiplex RT-PCR) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อวิธี RT-PCR จะนำมาตรวจยืนยันด้วยวิธี virus isolation และหาจำนวนของเชื้อไวรัสด้วยวิธี virus titration ตามลำดับ

1.4.1 ขั้นตอนการสกัด RNA

นำยุงที่ดูดเลือดสุกรจนอิ่มมาสกัด RNA ของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp Viral RNA Mini Spin (Qiagen, Germany) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ละลาย carrier RNA 1 หลอด ลงใน buffer AVL 1 ขวด (buffer AVL ที่ผสม carrier RNA แล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

- เตรียม 1.5 มล. Eppendorf (DNAse free, RNAse free) ตามจำนวนตัวอย่าง โดยบันทึกหมายเลขตัวอย่างไว้ข้างหลอด

- ดูด buffer AVL 560 ไมโครลิตร ใส่ใน eppendorf ที่เตรียมไว้

- บดยุงในแต่ละช่วงเวลาที่กำหนดไว้ของแต่ละตัวอย่างใน eppendorf หลอดละ 1 ตัวอย่าง จากนั้นดูด PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ใน eppendorf ที่มียุงบดแล้ว นำไปปั่นที่ 8,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที

- จากนั้นดูดสารละลาย (supernatant) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง ใส่ลงในหลอด eppendorf ที่มี Buffer AVL ตัวอย่างละ 1 หลอด

- เติม 100% ethanol ปริมาตร 560 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 15 วินาที นำไปปั่น (briefly) ให้สารละลายรวมกันที่ก้นหลอด

- เตรียมชุด QIAamp spin column บันทึกหมายเลขตัวอย่างไว้ด้านบนของฝาปิด spin column

- ดูดสารละลายที่ปั่นร่วมกับ ethanol ปริมาตร 630 ไมโครลิตร ใส่ใน QIAamp spin column (ให้หมายเลขตัวอย่างตรงกัน) แล้วนำไปปั่นที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

- เทส่วนสารละลายก้นหลอดที่ผ่าน spin column ทิ้งไป

- ทำซ้ำอีกครั้งจนกว่าสารละลายที่ปั่นร่วมกับ ethanol หมดพอดี

- เปลี่ยนหลอด 2 มิลลิลิตร ของชุด QIAamp spim column

- เตรียมสารละลาย AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเปลี่ยนหลอด 2 มิลลิลิตร ของชุด QIAamp spin column

- เตรียมสารละลาย AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที

- เตรียม 1.5 มิลลิลิตร eppendorf พร้อมบันทึกหมายเลขตัวอย่างให้ตรงกับหลอดข้างต้น

- นำส่วนของ spin column มาวางบน eppendorf ที่เตรียมไว้ จากนั้นเติม Buffer AVE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

- นำไปปั่นที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

- เก็บส่วนของ pure viral RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับทำ RT-PCR

1.4.2 ขั้นตอนการทำ RT-PCR

- เตรียม Master mix จากชุด Qiagen One step RT-PCR ตามสูตร ดังนี้

Access Quick master mix	12.5	ไมโครลิตร
Upstream primer	0.5	ไมโครลิตร
Downstream primer	0.5	ไมโครลิตร
Reverse transcriptase	0.5	ไมโครลิตร
RNAse free water	8	ไมโครลิตร

(สูตรนี้สำหรับ 1 ตัวอย่าง)

โดยมีลำดับเบสของ primer จาก 5' – 3' ดังนี้ (Thanawongnuwech et al., 2002)

Downstream primer : Agg TCC TCg AAC TTg AgC Tg

Upstream primer : CCT CCT gTA TgA ACT TgC

แบ่ง master mix ใส่ PCR tube หลอดละ 22 ไมโครลิตร จากนั้นเติม pure viral RNA จากขั้นตอนการสกัดตัวอย่างละ 3 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอด PCR ให้แน่น และบันทึกหมายเลขตัวอย่างให้ชัดเจนทุกตัวอย่าง นำไปใส่เครื่อง PCR โดยมีโปรแกรม ดังนี้

Reverse transcription	50 ^{0}ซ	30 นาที
Initial PCR activation	95 ^{0}ซ	30 นาที
Denaturation	94 ^{0}ซ	20 วินาที
Annealing	50 ^{0}ซ	30 วินาที
Extension	72 ^{0}ซ	30 วินาที
Final extension	72 ^{0}ซ	15 นาที

- เมื่อเครื่อง PCR ทำงานสิ้นสุด จะได้เป็น cDNA จากนั้นนำไปทำขั้นตอน multiplex PCR ต่อไป โดยเตรียม master mix สำหรับทำ multiplex PCR ดังนี้

10x Buffer PCR	4	ไมโครลิตร
10mM. dNTP mix	0.8	ไมโครลิตร
Primer U1 (50pmol/ul)	0.5	ไมโครลิตร
Primer U2 (50pmol/ul)	0.5	ไมโครลิตร
Primer D1 (50pmol/ul)	0.25	ไมโครลิตร
Primer D1 (50pmol/ul)	0.25	ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	0.25	ไมโครลิตร
Taq polymerase (5U/ul)	0.5	ไมโครลิตร
RNAse free water	38.2	ไมโครลิตร

(สูตรนี้สำหรับ 1 ตัวอย่าง)

โดยมีลำดับเบสของ Primer จาก 5' – 3' เป็นดังนี้ (Thanawongnuwech et al., 2002)

Primer U1 : gTA TgA ACT TgC Agg Atg

Primer U2 : ggA gCA gTg ACT Aag AgA

Primer D1 : gCC gAC AAT ACC Atg TgC Tg

Primer D2 : gTA ACT gAA CAC CAT ATg CTg

แบ่ง master mix ที่เตรียมไว้ใส่หลอด PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลอดละ 48 ไมโครลิตร จากนั้นเติม cDNA ที่ได้จากการทำ RT-PCR 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาให้สนิท และบันทึกหมายเลขตัวอย่างข้างหลอดให้ถูกต้องตรงกัน นำไปใส่เครื่อง PCR โดยมีโปรแกรมดังนี้

Initial PCR activation	94 ^{0}ซ	3 นาที
Denaturation	94 ^{0}ซ	20 วินาที
Annealing	48 ^{0}ซ	30 วินาที
Extension	72 ^{0}ซ	30 วินาที
Final extension	72 ^{0}ซ	15 นาที

- ในระหว่างเครื่อง PCR กำลังทำงาน เตรียม 2% agarose gel ใน tris borate EDTA (TBE) buffer โดยใช้อัตราส่วน agarose gel 0.5 กรัม ใน TBE 25 มิลลิลิตร ให้ความร้อนโดยใช้เตาอบจนเจลละลายดี จึงนำออกมาเทใส่พิมพ์ รอจนเจลเย็นและแข็งดีจึงนำไปวางบนเครื่อง Electrophoresis chamber ที่มี TBE buffer อยู่ในระดับที่ท่วมแผ่นเจล

- นำ PCR product จากขั้นตอนของการทำ multiplex PCR มาหยอดลงใน 2% agarose gel ที่เตรียมไว้ โดยใช้ 6x loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ PCR product ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยให้แถวแรกของเจลเป็น DNA marker

- เปิดเครื่อง Electrophoresis (Wealtec, USA) โดยใช้กำลังไฟ 100 โวลต์ นานประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อเสร็จแล้วปิดเครื่อง Electrophoresis นำแผ่นเจลที่ได้มาย้อมด้วย 1% ethidium bromide solution (10mg/ml) ในน้ำกลั่นนาน 15 นาที จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยน้ำประปา และนำไปอ่านผลด้วยเครื่อง Visible-UV gel transmission

1.4.3 ขั้นตอนการทำ Viral isolation

- เตรียมเซลล์ MARC 145 มาเพาะเลี้ยงใน microplate cell culture ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร โดยใช้อัตราส่วนของเซลล์ 1:3 เท่าใน growth media (5%MEM) จำนวน 3 มิลลิลิตร

- นำเข้าตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 นาน 48 ชั่วโมง จนเซลล์โตเต็มที่ ซึ่งมีลักษณะเป็น monolayer

- นำตัวอย่างยุงมาบดใน eppendorf (เป็น pool sample) และเจือจางด้วย MEM ที่เย็น 4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1:2 จากนั้นนำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าทิ้ง และเติมตัวอย่างยุงเจือจางประมาณ 1 มิลลิลิตร ให้ท่วมผิวหน้าของเซลล์เพาะเลี้ยง

- นำเข้าตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำออกมาดูดตัวอย่างที่อยู่ผิวหน้าของเซลล์เพาะเลี้ยงทิ้ง และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (2% MEM) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

- นำเข้าตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 นาน 48 ชั่วโมง

- เตรียมเซลล์ MARC 145 มาเพาะเลี้ยงใน Microculture 96 well plate โดยเติมหลุมละ 200 ไมโครลิตร

- นำ microplate cell culture ที่เพาะเชื้อไวรัสจากตัวอย่างยุงออกจากตู้อบแล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนแข็งตัวและนำออกมาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลับกัน 3 รอบ เพื่อให้เซลล์แตก

- จากนั้นดูดส่วนที่ละลายแล้วทั้งหมดไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บส่วนใสไว้ (supernatant)

- นำ microplate 96 well plate ที่มีเซลล์เป็น monolayer แล้วมาดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าทิ้ง จากนั้นเติมตัวอย่าง (supernatant) ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร

- นำเข้าตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (2% MEM) 100 ไมโครลิตร

- นำเข้าตู้อบที่ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจหาแอนติบอดีโดยขั้นตอนการย้อมด้วยวิธี IPMA ต่อไป

1.4.4 จดบันทึกผลการทดลอง วิเคราะห์และรายงานผลการทดลอง

การทดลองที่ 2

การทดสอบความสามารถในการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ของยุง *Cx. tritaeniorhynchus* จากสุกรติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ไปยังสุกรปลอดเชื้อ
โดยแบ่งการทดลองออกเป็นขั้นตอนดังนี้

2.1 <u>การเตรียมยุงทดลอง</u>

นำตัวเต็มวัยของยุง *Cx. tritaeniorhynchus* ที่ทำการเพาะเลี้ยงจากข้อ 1.2.1 งดน้ำและอาหารก่อนการทดลองอย่างน้อย 6 ชั่วโมง และสุ่มตัวอย่างยุงจำนวน 50 ตัว นำมาทดสอบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี RT-PCR ก่อนนำมาทดลอง

2.2 <u>การเตรียมสุกรทดลอง</u>

นำสุกรอนุบาลเพศผู้อายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 10 ตัวจากฟาร์มที่ปลอดเชื้อ พี อาร์ อาร์ เอส แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลองใหญ่ คือ สุกรกลุ่มที่ 1 กลุ่ม A (กลุ่มตัวให้) จำนวน 2 ตัว และสุกรกลุ่มที่ 2 กลุ่ม B-E (กลุ่มตัวรับ) จำนวน 8 ตัว แบ่งเป็น 4 ห้องทดลองย่อย ห้องละ 2 ตัว

- สุกรกลุ่มที่ 1 (กลุ่มตัวให้) จำนวน 2 ตัว (กลุ่ม A) ฉีดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา (O1NP1) (ปริมาณ 10^4 $TCID_{50}$ /มิลลิลิตร) โดยหยอดจมูกข้างละ 4 มิลลิลิตร

- สุกรกลุ่มที่ 2 (กลุ่มตัวรับ) จำนวน 8 ตัว แยกเป็นกลุ่มย่อย 4 ห้องทดลอง (กลุ่ม B-E) ห้องละ 2 ตัว

2.3 <u>การ Infect เชื้อไวรัสจากยุงที่ดูดเลือดสุกรกลุ่มตัวให้ไปยังสุกรกลุ่มตัวรับ</u>

ในวันที่ 7 หลังการฉีดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (7 day post infection) วางยาสลบสุกรกลุ่มที่ 1 (กลุ่มตัวให้) แล้วนำไปวางนอนตะแคงด้านข้างลงบนกรงยุงด้านที่มีมุ้งลวด ปล่อยให้ยุงดูดเลือดสุกร โดยในขณะที่ยุงกำลังดูดเลือดสุกรอยู่นั้น ดูดแยกยุงออกจากตัวสุกรทันที โดยใส่ในกล่องพลาสติก กล่องละ 150 ตัว จำนวน 4 กล่อง บันทึกหมายเลขกล่อง 1 ถึง 4 เพื่อนำไปทดสอบกับสุกรกลุ่มที่ 2 กลุ่มตัวรับ (Recipient pigs) ในช่วงเวลาต่าง ๆ ดังนี้

ยุงกล่องที่ 1 (30 นาทีหลังจากดูดเลือดสุกรกลุ่มตัวให้) นำไปทดสอบกับสุกรกลุ่ม B

ยุงกล่องที่ 2 (6 ชั่วโมงหลังจากดูดเลือดสุกรกลุ่มตัวให้) นำไปทดสอบกับสุกรกลุ่ม C

ยุงกล่องที่ 3 (24 ชั่วโมงหลังจากดูดเลือดสุกรกลุ่มตัวให้) นำไปทดสอบกับสุกรกลุ่ม D

ยุงกล่องที่ 4 (7 วันหลังจากดูดเลือดสุกรกลุ่มตัวให้) นำไปทดสอบกับสุกรกลุ่ม E

<u>สุกรกลุ่ม B</u> นำยุงในกล่องที่ 1 จำนวน 100 ตัว ไปกัดและดูดเลือดสุกรตัวที่ 1 (mosquito contact protocol) และนำยุงที่เหลืออีก 50 ตัว ไปบด กรองผ่าน filter พร้อมกับใส่ยาปฏิชีวนะและฉีดเข้าไปในสุกรตัวที่ 2 (swine bioassay) และนำยุงที่กัดสุกรแล้วไปตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี RT-PCR

<u>สุกรกลุ่ม C</u> นำยุงในกล่องที่ 2 จำนวน 100 ตัว ไปกัดและดูดเลือดสุกรตัวที่ 1 (mosquito contact protocol) และนำยุงที่เหลืออีก 50 ตัว ไปบด กรองผ่าน filter พร้อมกับใส่ยาปฏิชีวนะและฉีดเข้าไปในสุกรอีก 1 ตัว (swine bioassay) นำยุงกัดสุกรแล้วไปตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี RT-PCR

สุกรกลุ่ม D นำยุงในกล่องที่ 3 จำนวน 100 ตัว ไปกัดและดูดเลือดสุกรตัวที่ 1 (mosquito contact protocol) และนำยุงที่เหลืออีก 50 ตัว ไปบด กรองผ่าน filter พร้อมกับใส่ยาปฏิชีวนะและฉีดเข้าไปในสุกร ตัวที่ 2 (swine bioassay) นำยุงที่กัดสุกรแล้วไปตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี RT-PCR

สุกรกลุ่ม E นำยุงในกล่องที่ 4 จำนวน 100 ตัว ไปกัดและดูดเลือดสุกรตัวที่ 1 (mosquito contact protocol) และนำยุงที่เหลืออีก 50 ตัว ไปบด กรองผ่าน filter พร้อมกับใส่ยาปฏิชีวนะและฉีดเข้าไปในสุกรตัวที่ 2 (swine bioassay) นำยุงที่กัดสุกรแล้วไปตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี RT-PCR

2.4 การตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จากสุกรกลุ่มตัวรับ

โดยทำการเก็บตัวอย่างซีรั่มจากสุกรที่เป็นตัวรับ (กลุ่ม B-E) ในช่วงเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ก่อนการสัมผัสกับยุงและ 3, 7, 14 และ 21 วันหลังการสัมผัสกับยุง ตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยวิธี RT-PCR และ ELISA ดังนี้

2.4.1 นำเลือดสุกรที่ได้จากการเจาะมาตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแข็งตัว ดูดแยกซีรั่มมาทดสอบโดยวิธี ELISA ตามขั้นตอนดังนี้

- เจือจางซีรั่มในเพลท โดยใช้ซีรั่มปริมาตร 5 ไมโครลิตร ต่อ diluent ปริมาตร 195 ไมโครลิตร
- ใส่ negative และ positive control ใน strip ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อทำเป็น positive control และ negative control ชนิดละ 2 หลุมต่อ 1 เพลท
- ดูซีรั่มในเพลทใส่ใน strip coat plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ในระหว่างนั้นทำการเตรียม washing solution
- เมื่อครบเวลา 30 นาที ล้าง strip ด้วย washing solution 4 ครั้ง ครั้งละ 300 ไมโครลิตร
- จากนั้นใส่ conjugate ชนิด Anti-Porcine:HRPO Conjugate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
- เมื่อครบเวลา 30 นาที ล้าง strip ด้วย washing solution 4 ครั้ง ครั้งละ 300 ไมโครลิตร
- จากนั้นใส่ Substrate ชนิด TMB Substrate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

- ใส่ Stop solution ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร
- วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความเข้มแสง 650 nm
- คำนวณผลและรายงานผลด้วยโปรแกรมอ่านผล

2.4.2 ทำการชันสูตรผ่าซากสุกรทุกตัวใน วันที่ 14 หลังการสัมผัสกับยุง เก็บตัวอย่างปอดต่อมน้ำเหลือง ของเหลวจากหลอดลม (Bronchial alveolar larvage) สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี virus isolation และ RT-PCR

2.4.3 จดบันทึกรอยโรค ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลองการตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ทั้งในสุกรกลุ่มตัวให้และสุกรกลุ่มตัวรับ รายงานผลการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาชนิดของยุงที่มีศักยภาพในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส

1.1 <u>การสำรวจชนิดของยุงในฟาร์มสุกร</u>

ฟาร์มสุกรที่ใช้เป็นสถานที่ทดลองเป็นฟาร์มที่มีการเลี้ยงสุกรแม่พันธุ์ ลักษณะเป็นโรงเรือนยกพื้น โล่งมีอากาศถ่ายเทสะดวก และจากการสำรวจรอบๆ ฟาร์มสุกรในรัศมี 1 กิโลเมตร พบว่ามีแหล่งน้ำ ได้แก่ นาข้าว คลองระบายน้ำที่มีวัชพืชและหญ้า แหล่งน้ำขังสะอาดที่มีวัชพืชและหญ้า หนองน้ำขนาดใหญ่น้ำสะอาดมีวัชพืชจำพวกผักตบชวา กก ผักบุ้งไทย และหญ้า (รูปที่ 8)

ผลการสำรวจและศึกษาจำแนกชนิดของยุงตัวเต็มวัยในฟาร์มสุกรโดยใช้ oral aspirator ดูดยุงที่เข้ามาดูดเลือดบนตัวสุกร ในช่วงเวลา 18.00–22.00 น. เดือนละ 1 ครั้ง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2547 ถึงเดือนเมษายน 2548 เป็นเวลา 12 เดือน โดยใช้คน 6 คนในการเก็บตัวอย่างในแต่ละครั้ง ดูดจับยุงได้ทั้งหมดจำนวน 91,840 ตัว พบยุงจำนวนมากในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤศจิกายน (8.71-14.59%) เมื่อเทียบกับจำนวนยุงที่จับได้ทั้งหมดตลอดปี และพบมากที่สุดในเดือนตุลาคม (14.59%) ต่อจากนั้นจำนวนยุงจะเริ่มน้อยลงในเดือนธันวาคม (4.79%) และเดือนมกราคม (5.88%) ซึ่งเป็นช่วงที่มีอากาศเย็นและความชื้นในอากาศน้อย และพบยุงจำนวนน้อยที่สุดในเดือนมีนาคม (4.57%) (รูปที่ 9) ยุงที่ตรวจจำแนกพบทั้งหมดมี 3 สกุล 6 ชนิด คือ *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus*, *Ma. uniformis*, *Ma. annulifera*, *An. vagus* และ *An. peditaeniatus* (รูปที่ 10) โดยทุกๆเดือนจะพบยุง *Cx. tritaeniorhynchus* มากที่สุดเฉลี่ย 86.80 % และ *Ma. annulifera* พบน้อยที่สุดเฉลี่ย 0.006 % ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1

ตัวอ่อนของยุงในแหล่งน้ำต่างๆที่ตรวจพบ มี 4 ชนิด ได้แก่ *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus*, *An. vagus* และ *An. peditaeniatus*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 แสดงวิธีการเก็บตัวอย่างยุงตัวเต็มวัยที่เข้ามากัดและดูดเลือดสุกรในฟาร์ม โดยใช้ไฟฉายส่องและดูดจับด้วย oral aspirator

รูปที่ 2 ตัวอย่างยุงที่เก็บได้จากตัวสุกรแยกเก็บใส่กล่องขนาดเล็กที่มีผ้าโปรงคลุมด้านบนกล่อง ละ 200 ตัว ใช้ก้อนสำลีชุบน้ำวางไว้ด้านบนกล่อง สำหรับขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 กรงเลี้ยงยุงตัวเต็มวัย ขนาด 25 X 25 X 25 เซนติเมตร กรุมุ้งลวดทั้ง 4 ด้าน

รูปที่ 4 รูปแสดงการเพาะเลี้ยงยุง *Culex* ในห้องปฏิบัติการ

รูปที่ 5 รูปแสดงการเพาะเลี้ยงยุง *Mansonia* ในห้องปฏิบัติการ

รูปที่ 6 รูปแสดงการเพาะเลี้ยงยุง *Anopheles* ในห้องปฏิบัติการ

ก. ข.

รูปที่ 7 แสดงวิธีการให้ยุงทดลองดูดเลือดสุกรทดลอง

ก. แสดงวิธีให้ยุงดูดเลือดสุกรทดลองผ่านมุ้งลวด

ข. แสดงวิธีการดูดแยกยุงทดลองหลังจากดูดเลือดใส่ในกล่องยุงขนาดเล็กโดยใช้ oral aspirator

ก.

ข.

ค.

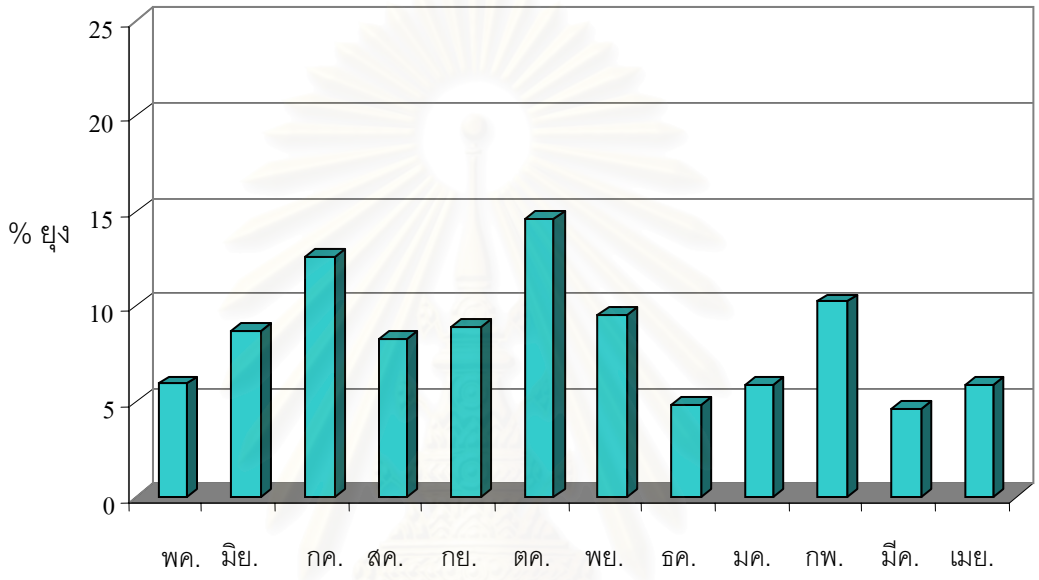
ง.

จ

ฉ.

รูปที่ 8 ลักษณะแหล่งน้ำในรัศมี 1 กิโลเมตรรอบๆ ฟาร์มสุกร

ก. และ ข. นาข้าว ค.-ฉ. แหล่งน้ำสะอาดที่มีวัชพืชน้ำ



รูปที่ 9 จำนวนร้อยละของตัวอย่างยุงในแต่ละเดือนที่เก็บได้ขณะเข้ามาดูดเลือดสุกรในฟาร์ม ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม 2547 ถึงเดือนเมษายน 2548 ระหว่างเวลา 18.00 - 22.00 น. จากจำนวนตัวอย่างยุงที่จับได้ทั้งปี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.

ข.

ค.

ง.

จ.

ฉ

รูปที่ 10 ยุงที่จับได้ขณะเข้ามาดูดเลือดสุกรในฟาร์ม ระหว่างเวลา 18.00 - 22.00 น.

ก. *Culex tritaeniorhynchus* ข. *Cx. gelidus*

ค. *Mansonia uniformis* ง. *Ma. annulifera*

จ. *Anopheles peditaeniatus* ฉ. *An. vagus*

ตารางที่ 1 ผลการสำรวจนิดและจำนวนคิดเป็นร้อยละของยุงที่พบในฟาร์มสุกรที่มีการระบาดของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในจังหวัดนครปฐม ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2547 ถึงเมษายน 2548 ระหว่างเวลา 18.00 - 22.00 น.

เดือน	จำนวนยุง (%)	% Cxt	% Cxg	% Mau	% Maa	% Anp	% Anv
พฤษภาคม	5,440 (5.92)	92.68	4.72	0.01	0	0.26	2.33
มิถุนายน	8,000 (8.71)	69.43	29.76	0.11	0	0.29	0.41
กรกฎาคม	11,600 (12.63)	88.53	10.0	0.41	0	0.31	0.75
สิงหาคม	7,600 (8.28)	90.81	7.82	0.13	0	0.45	0.79
กันยายน	8,200 (8.93)	91.76	6.17	0.24	0	0.41	1.42
ตุลาคม	13,400 (14.59)	83.48	15.0	0.35	0.02	0.44	0.71
พฤศจิกายน	8,800 (9.58)	89.04	7.50	0.05	0	1.30	2.11
ธันวาคม	4,400 (4.79)	95.75	1.73	0.40	0.05	1.34	0.73
มกราคม	5,400 (5.88)	91.95	3.81	0.28	0	2.15	1.81
กุมภาพันธ์	9,400 (10.24)	94.48	3.06	0.12	0	0.83	1.51
มีนาคม	4,200 (4.57)	60	38.64	0.07	0	0.96	0.33
เมษายน	5,400 (5.88)	93.67	0.78	0.05	0	0.46	5.04
จำนวนเฉลี่ย %		86.80	10.75	0.19	0.006	0.77	1.49

Cxt = *Culex tritaeniorhynchus* Cxg = *Culex gelidus*

Mau = *Mansonia uniformis* Maa = *Mansonia annulifera*

Anv = *Anopheles vagus* Anp = *Anopheles peditaeniatus*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 <u>การตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุงทดลอง</u>

ในวันที่ 7 หลังการฉีดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ให้แก่สุกรทดลองกลุ่มที่ 2 พบ Viral titer ต่อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่ $10^{2.70}$ $TCID_{50}$/ml. ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี RT-PCR และ Virus isolation ในระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 12 ,24, 48, 72 ชั่วโมง 7 และ 14 วันหลังการสัมผัสกับสุกร พบว่าในยุงกลุ่มที่ให้กัดดูดเลือดสุกรกลุ่มควบคุมลบ ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสในยุงทุกช่วงระยะเวลา ในขณะที่ผลการตรวจยุงในกลุ่มที่ให้กัดดูดเลือดสุกรกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อ พบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในตัวอย่างยุงทั้งตัว ที่ระยะเวลา 0-48 ชั่วโมงหลังการสัมผัสกับสุกร ส่วนขายุงและส่วนน้ำล้างยุง ตรวจไม่พบไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ผลแสดงรายละเอียดในตารางที่ 2 และจากการตรวจด้วยวิธี Virus isolation พบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในตัวอย่างยุงทั้งตัว ที่ระยะเวลา 0-2 ชั่วโมงหลังการสัมผัสกับสุกร ตัวอย่างพบผลบวกของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จากการตรวจด้วยวิธี RT-PCR ปรากฏแถบดี เอ็น เอ ที่ 107 คู่เบส (รูปที่ 11)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจไวรัสพี อาร์ อาร์ เอส ในยุงทดลอง หลังจากดูดเลือดสุกรติดเชื้อด้วยวิธี RT-PCR และ Virus isolation

ยุงทดลอง (ระยะเวลาหลังจากยุงสัมผัสสุกร)	RT-PCR			VI
	ยุงทั้งตัว	ส่วนขายุง	น้ำล้างยุง	
0 ชั่วโมง	+	-	-	+
2 ชั่วโมง	+	-	-	+
4 ชั่วโมง	+	-	-	-
6 ชั่วโมง	+	-	-	-
12 ชั่วโมง	+	-	-	-
24 ชั่วโมง	+	-	-	-
48 ชั่วโมง	+	-	-	-
72 ชั่วโมง	-	-	-	-
7 วัน	-	-	-	-
14 วัน	-	-	-	-

RT-PCR=nested multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction,

VI = virus isolation

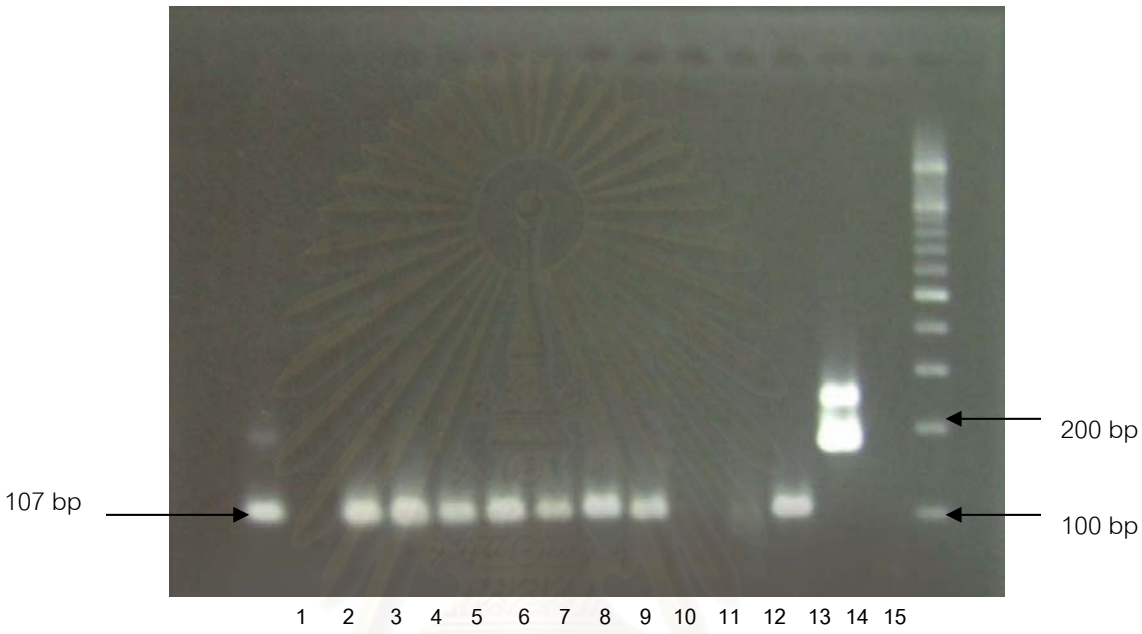
ยุงทั้งตัว = อวัยวะทุกส่วนของยุง

ส่วนขายุง = เฉพาะส่วนขายุงซึ่งแทนองค์ประกอบของเลือดและน้ำเลือดในยุง (haemocoel)

น้ำล้างยุง = น้ำจากผิวด้านนอกของยุง

+ = ผลบวก, - = ผลลบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 แสดงแถบดี เอ็น เอ ของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จากการตรวจด้วยวิธี Nested multiplex RT-PCR. เลนที่ 1 : ซีรั่มสุกรที่ติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส. เลนที่ 2 : ตัวอย่างยุงควบคุม *Culex tritaeniorhynchus* เลนที่ 3-11 : ตัวอย่างยุงทั้งตัวที่ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 ชั่วโมง และ 7 วัน. เลนที่ 12 : ตัวอย่างบวกของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา เลนที่ 13 : ไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์ยุโรป เลนที่ 14 : ตัวควบคุมลบ. L : DNA ladder

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 2. การทดสอบความสามารถในการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ของยุง *Cx. tritaeniorhynchus* จากสุกรติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ไปยังสุกรปลอดเชื้อ

<u>การตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จากสุกรกลุ่มตัวรับ</u>

วันที่ 7 หลังการฉีดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ให้แก่สุกรกลุ่ม A (กลุ่มตัวให้) พบ viral titer ต่อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่ $10^{2.23}$ $TCID_{50}$/ml. สำหรับสุกรกลุ่ม B-E (กลุ่มตัวรับ) ให้ผลลบต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จากการทดสอบด้วยวิธี ELISA ก่อนเริ่มต้นการศึกษา สำหรับยุงทดลองหลังจากสัมผัสกับสุกรกลุ่มตัวให้ และก่อนที่จะนำไปสัมผัสกับสุกรกลุ่มตัวรับจะแบ่งยุงออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ยุงทดลองจำนวน 100 ตัวนำไปสัมผัสกับสุกรกลุ่มตัวรับจำนวน 1 ตัว (mosquito contact protocol) และยุงส่วนที่ 2 ยุงทดลองจำนวน 50 ตัว นำไปบด และกรองผ่านตัวกรองพร้อมกับผสมยาปฏิชีวนะ และฉีดเข้าไปในสุกรกลุ่มตัวรับจำนวน 1 ตัว (swine bioassay) ที่ระยะเวลา 30 นาที, 6 ชั่วโมง, 7 และ 14 วัน ในสุกรกลุ่ม B-E ตามลำดับ

ในวันที่ 14 หลังการการฉีดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ให้แก่สุกร ทำการชันสูตรสุกรทุกตัว ผลการศึกษาในสุกรกลุ่ม A พบปอดเกิด multifocal tan-mottled consolidation 8% ร่วมกับเกิดการขยายใหญ่ของต่อมน้ำเหลือง (รูปที่ 12) และยืนยันการตรวจแอนติเจนของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส อีกครั้งด้วยวิธีทาง immunohistochemistry (IHC) นอกจากนี้สุกรในกลุ่ม E จำนวน 1 ตัว เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน ในขณะที่สุกรกลุ่มอื่นๆมีรอยโรคไม่เด่นชัด จากการตรวจเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรกลุ่มตัวรับ ด้วยวิธี ELISA และ RT-PCR พบผลบวกต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรกลุ่ม B จำนวน 1 ตัว จากการที่สุกรได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยวิธี swine bioassay ในขณะที่สุกรกลุ่มตัวรับอื่นๆให้ผลลบต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (ตารางที่ 3) ผลการตรวจเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี ELISA ในสุกรกลุ่ม B จากการที่สุกรได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยวิธี swine bioassay พบผลบวกต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ตั้งแต่วันที่ 10 หลังจากสุกรได้รับเชื้อจากสุกรกลุ่มตัวให้ (รูปที่ 13)

จากการตรวจเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี Virus isolation พบผลบวกของตัวอย่างซีรั่มสุกรกลุ่ม B จากการที่สุกรได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยวิธี swine bioassay เท่านั้น ในขณะที่ตัวอย่างจาก bronchial alveolar larvage, ต่อมน้ำเหลืองและปอดของสุกรกลุ่มตัวรับทุกกลุ่มให้ผลลบ และจากการตรวจด้วยวิธีทาง immunohistochemistry ให้ผลลบต่อสุกรกลุ่มตัวรับทุกกลุ่ม

ตารางที่ 3 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในวันที่ 14 จากการผ่าซากสุกรหลังจากได้รับเชื้อโดยวิธี mosquito contact protocol และ swine bioassay ในระยะเวลาต่างๆกัน

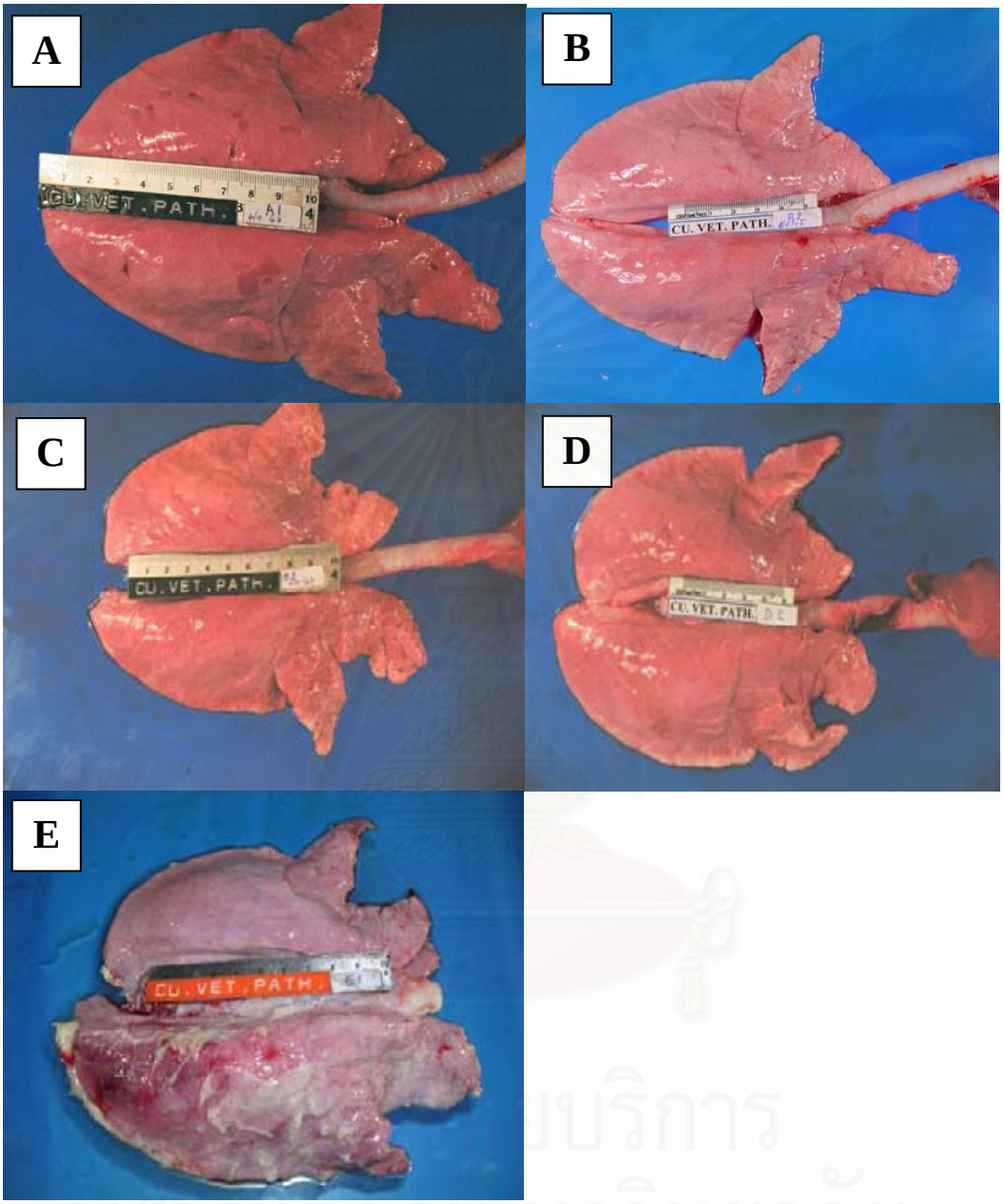
กลุ่มสุกร	RT-PCR			VI		IHC
	ซีรั่ม	ของเหลวจากหลอดลม	ต่อมน้ำเหลืองและปอด	ซีรั่ม	ของเหลวจากหลอดลม	ต่อมน้ำเหลืองและปอด
30 นาทีหลังได้รับเชื้อ						
B1	-	-	-	-	-	-
B2	+	+	+	+	-	-
6 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อ						
C1	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-	-
24 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อ						
D1	-	-	-	-	-	-
D2	-	-	-	-	-	-
7 วันหลังได้รับเชื้อ						
E1	-	-	-	-	-	-
E2	-	-	-	-	-	-

RT-PCR = nested multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction

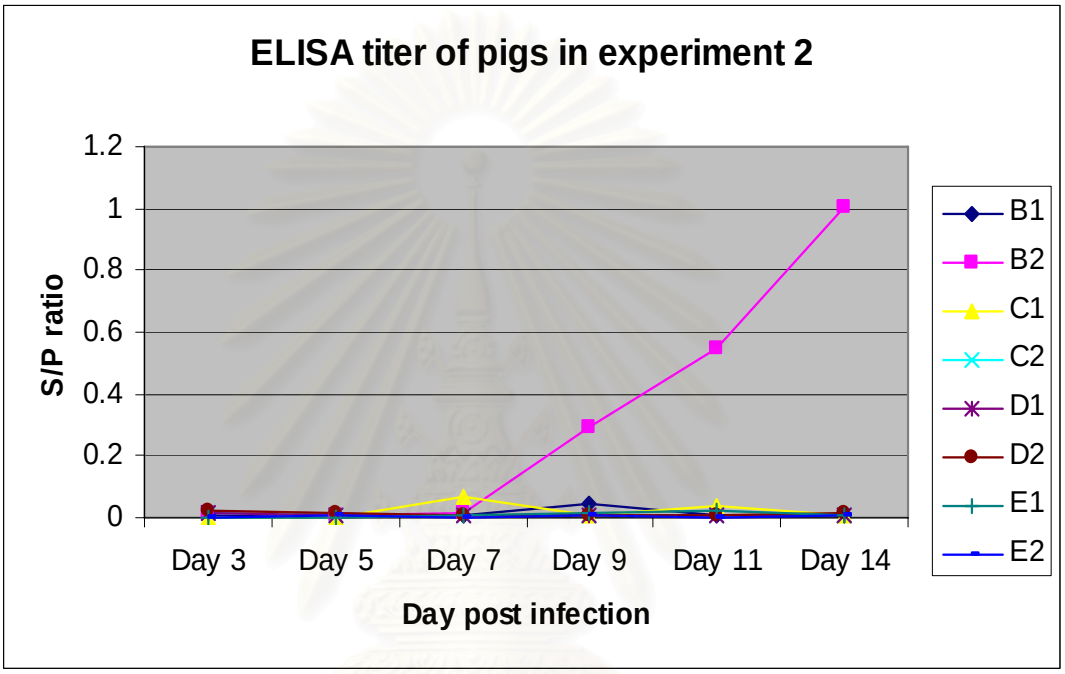
VI = virus isolation, IHC = immunmohistochemistry

ELISA = enzyme linked immunosorbent assay

+ = ผลบวก, - = ผลลบ



รูปที่ 12 แสดงปอดสุกร จากการชันสูตรซากหลังจากสุกรได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส 14 วัน : (รูป 12A) 14 วันหลังจากสุกรกลุ่มตัวให้ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สายพันธุ์อเมริกา (O1NP1), (รูป 12B-12E) 14 วันหลังจากสุกรกลุ่มตัวรับได้รับเชื้อโดยวิธี mosquito contact protocol. เกิดรอยโรคที่ปอดในสุกรกลุ่ม A ในขณะที่สุกรกลุ่มอื่นๆมีรอยโรคไม่เด่นชัด (รูป 12B-12D). เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน แต่ไม่พบรอยโรคของการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรกลุ่ม E (รูป 12 E)



รูปที่ 13 การตรวจสอบแอนติบอดี้ต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ด้วยวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

อัตราส่วน S/P $\geq$ 0.04 ให้ผลบวก

B1, C1, D1 และ E1 = สุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยวิธี mosquito contact protocol

B2, C2, D2 และ E2 = สุกรที่ได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยวิธี swine bioassay

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายผล

จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่ายุง *Cx. tritaeniorhynchus* เป็นยุงที่มีปริมาณมากที่สุดในฟาร์มสุกร จังหวัดนครปฐม ซึ่งน่าจะเป็นพาหะที่มีศักยภาพในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แบบเชิงกลในฟาร์มสุกรได้

จากการทดลองที่ 1 ผลการสำรวจชนิดของยุงที่พบในฟาร์มสุกร จังหวัดนครปฐม ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2547 ถึงเดือนเมษายน 2548 พบว่ายุงที่พบมากที่สุดในแต่ละเดือนคือยุง *Cx. tritaeniorhynchus* คิดเป็นค่าเฉลี่ย 86.80% รองลงมาเป็นยุง *Cx. gelidus* ยุง *An. vagus*. *An. peditaeniatus* ยุง *Ma. uniformis* และ *Ma. annulifera* คิดเป็น 10.75%, 1.49%,0.77%, 0.19% และ 0.006% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการสำรวจชนิดของยุงที่พบในฟาร์มสุกรในประเทศมาเลเซียคือ ยุง *Cx. tritaeniorhynchus* เป็นยุงที่พบมากที่สุด รองลงมาคือยุง *Cx. gelidus* ยุง *Anopheles* spp. และยุง *Mansonia* spp. ตามลำดับ (Vythilingam et al., 1994) ซึ่งยุงที่พบทั้งหมดเป็นยุงที่ออกหากินในช่วงเวลาพลบค่ำและตอนกลางคืน ซึ่งสอดคล้องกันกับช่วงเวลาที่ออกสำรวจ สำหรับเดือนที่พบปริมาณยุงมากที่สุดคือเดือนตุลาคม ซึ่งเป็นเดือนที่ปริมาณฝนตกชุกจึงทำให้บริเวณรอบๆฟาร์มสุกรมีแหล่งน้ำขังซึ่งเหมาะต่อการเพาะพันธุ์ยุงโดยเฉพาะยุง *Culex* spp. (Geevarghese et al., 1994) และจากการศึกษาของ Macdonald และคณะ (1967) พบว่ายุง *Cx. tritaeniorhynchus* เป็นยุงที่มีอุปนิสัยชอบดูดเลือดสุกรมากกว่าดูดเลือดคน ผลการสำรวจหาตัวอ่อนและตัวกลางวัยของยุงในแหล่งน้ำต่างๆ พบเฉพาะยุง *Culex* และยุง *Anopheles* แต่ไม่พบยุง *Mansonia* ทั้งนี้เพราะลักษณะแหล่งน้ำโดยเฉพาะในนาข้าวที่มีน้ำขัง แหล่งน้ำขังสะอาดที่มีวัชพืชจำพวก ต้นหญ้าสูงๆ ผักบุ้ง คู คลองระบายน้ำสะอาดหรือ น้ำขังในหลุมบ่อที่เป็นรอยเท้าสัตว์ เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ตามธรรมชาติของ ยุง *Cx. tritaeniorhyncus* , *Cx. gelidus, An. vagus* และ *An. peditaeniatus* ซึ่งตัวอ่อนของยุงเหล่านี้จะหากินอยู่ในแหล่งน้ำและใช้ท่อหายใจ (siphon tube) แตะผิวน้ำเพื่อหายใจ (Vythilingam et al., 1992) ดังนั้นเมื่อผู้ทำการศึกษาเก็บตัวอย่างโดยใช้กระบวยจ้วงตักน้ำจากแหล่งน้ำที่ทำการศึกษา จึงสามารถพบตัวอย่างของยุงเหล่านี้ได้ ในขณะที่แหล่งเพาะพันธุ์ตามธรรมชาติของยุง *Mansonia* เป็นหนองน้ำปิด แหล่งน้ำปิดหรือคูคลองที่มีวัชพืชจำพวก ผักตบชวา จอก แหน ต้นกก (Chiang, 1993) ซึ่งผลการสำรวจในครั้งนี้ไม่พบทั้งตัวอ่อนและตัวกลางวัยของยุง *Mansonia* ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวิธีการสำรวจในครั้งนี้อาจจะยังไม่เหมาะสมเนื่องจากตัวอ่อน หรือตัวกลางวัยของยุง *Mansonia* จะหากินอยู่ใต้ผิวน้ำและเกาะติดอยู่กับวัชพืชใต้น้ำ โดยใช้ท่อหายใจที่มีลักษณะปลายแหลมคล้ายฟันเลื่อยแทงเข้าไปในลำต้นหรือรากของวัชพืชเพื่อหายใจ ดังนี้การตรวจหาตัวอ่อนหรือตัวกลางวัยของยุงชนิดนี้ วิธีที่ดี

ที่สุดคือตรวจหาตัวอ่อนหรือตัวกลางวัยที่เกาะติดอยู่กับวัชพืช (Chiang, 1993) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการสำรวจโดยวิธีดังกล่าวจึงทำให้ไม่พบตัวอ่อนและตัวกลางวัยของยุง *Mansonia* ได้

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุงโดยวิธี RT-PCR หลังจากการจับยุงจากฟาร์มสุกรได้ จากผลลัพธ์นี้จึงมีสมมติฐานว่า ยุง *Cx. tritaeniorhynchus* มีแนวโน้มของการเป็นพาหะในการนำโรค พี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มสุกรได้ และจากการตรวจเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุงนี้สามารถตรวจพบผลบวกต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในตัวอย่างรวมของยุง *(Cx. tritaeniorhynchus*) ได้นาน 48 ชั่วโมงจากการตรวจด้วยวิธี RT-PCR หลังการสัมผัสกับสุกรติดเชื้อ โดยที่เชื้อไม่มีการเพิ่มจำนวนภายในตัวยุงหลังจากสัมผัสสุกรติดเชื้อเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในส่วนที่พบนั้นเป็นเพียงสารพันธุกรรม (genetic material) เท่านั้น ซึ่งไม่ใช่ไวรัสที่มีชีวิต (Benson et al., 2002; Yoon and Stevenson, 2002) อย่างไรก็ตามจากการยืนยันการตรวจด้วยวิธี Virus isolation นั้นสามารถพบว่าให้ผลบวกต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุงในชั่วโมงที่ 2 หลังการสัมผัสกับสุกรติดเชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส สามารถมีชีวิตอยู่ภายในยุงได้นานเพียง 2 ชั่วโมง หลังจากการสัมผัสกับสุกรติดเชื้อ ซึ่งจากการตรวจด้วยวิธี Virus isolation จากตัวอย่างยุงรวมทั้งหมดที่ระยะเวลาต่างๆกันคือ 4, 6, 12, 24, 48, 72 ชั่วโมง 7 และ 14 วัน พบว่าให้ผลลบต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส มีระยะในการฟักตัวในยุงภายใน 5-10 วัน (Stewart et al., 1975) หรือ 7-14 วัน (Beerntsen et al., 2000) จากการทดลองนี้จึงบ่งชี้ว่าเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ไม่สามารถเพิ่มจำนวนในตัวยุงได้ ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งพบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในทางเดินอาหารยุง *Ae. vaxans* นาน 6 ชั่วโมงหลังจากยุงสัมผัสกับสุกรติดเชื้อ (Otake et al., 2003a) สำหรับผลการศึกษานี้ไม่ได้แสดงค่า viral titer ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรติดเชื้อ ความแตกต่างของระยะที่ไวรัสแพร่กระจายทั่วร่างกายในสุกรต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในแต่ละการทดลองแตกต่างกันจึงทำให้ตรวจพบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุงที่ระยะเวลาต่างกัน

ระยะเวลาในการปรากฏตัวของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุงนั้นสามารถบอกถึงความสามารถในการนำเชื้อไวรัสได้ โดยเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ที่มีระยะเวลาในการปรากฏตัวของเชื้อในตัวยุงได้นาน ซึ่งแสดงถึงระยะเวลาในการฟักตัวของเชื้อในตัวยุง บ่งบอกได้ว่ายุงนั้นมีความสามารถในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แบบ biological transmission ได้ และจากการตรวจไม่พบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ใน haemocoel ของยุง ซึ่งเป็นบริเวณที่ไวรัสจะมีการเพิ่มจำนวน

นั้น แสดงให้เห็นว่าไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ไม่สามารถเพิ่มจำนวนในยุงได้ จึงทำให้บอกได้ว่ายุง *Cx. tritaeniorhynchus* ไม่มีประสิทธิภาพในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แบบ biological transmission แต่อย่างไรก็ตามการตรวจพบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุงนั้นอาจขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อไวรัสในสุกร และความแตกต่างของระยะเวลาในการศึกษาการมีชีวิตอยู่ของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุงได้

จากการทดลองที่ 2 สามารถตรวจพบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในซีรั่มสุกรกลุ่มตัวรับ ด้วยวิธี ELISA และ Virus isolation จากการที่สุกรได้รับเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยวิธี swine bioassay ซึ่งพบผลบวกต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ภายใน 30 นาทีหลังจากได้รับเชื้อเท่านั้น ส่วนสุกรกลุ่มตัวรับอื่นหลังจาก 30 นาทีผ่านไปนั้นตรวจไม่พบเชื้อ แสดงให้เห็นว่ายุง *Cx. tritaeniorhynchus* มีประสิทธิภาพในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แบบ mechanical transmission คือ เชื้อไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนในยุงได้ แต่เป็นการนำเชื้อเป็นไปในระดับต่ำ เพราะว่ายุงทดลองหลังจากสัมผัสกับสุกรกลุ่มตัวให้ และนำไปสัมผัสกับสุกรกลุ่มตัวรับพบว่าสุกรกลุ่มตัวรับทุกตัวไม่ติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แต่ยุงทดลองอีกส่วนที่นำไปบด และกรองผ่านตัวกรองพร้อมกับผสมยาปฏิชีวนะ และฉีดเข้าไปในสุกรกลุ่มตัวรับนั้นปรากฏว่ามีสุกรจำนวน 1 ตัว ตรวจพบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้ แต่อย่างไรก็ตามผลบวกของไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในสุกรกลุ่มตัวรับนั้นอาจขึ้นอยู่กับปริมาณไวรัสที่อยู่ในกระแสเลือดของสุกรกลุ่มตัวให้ และจำนวนยุงที่นำไปดูดเลือดสุกรกลุ่มตัวให้ แต่จากทั้ง 2 การทดลองสามารถบอกได้ว่ายุง *Cx. tritaeniorhynchus* มีแนวโน้มที่สามารถนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มสุกรได้

จากการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่ายุง *Cx. tritaeniorhynchus* ไม่สามารถนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แบบ biological ได้ ถึงอย่างไรก็ตามยุง *Cx. tritaeniorhynchus* สามารถนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แบบ mechanical หรือแบบทางกลจากสุกรกลุ่มตัวให้ไปยังสุกรกลุ่มตัวรับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อสรุป

จากผลการทดลองพบว่าชนิดและปริมาณของยุงจะแปรผันตามลักษณะของสภาพแวดล้อม โดยเดือนที่มีฝนตกชุกและมีน้ำขัง จะพบว่ามีปริมาณยุงในฟาร์มมากกว่าในเดือนที่มีฝนตกน้อย หรือในเดือนที่ไม่มีน้ำขัง แต่ถ้าในเดือนที่มีฝนตกปริมาณมากเกินไป น้ำฝนจะพัดพาเอาไข่และตัวอ่อนของยุงไหลออกไปหมด ทำให้จำนวนยุงลดน้อยลง นอกจากนี้แล้วยุงที่พบในฟาร์มสุกรเป็นยุงที่ออกหากินในเวลากลางคืน ได้แก่ ยุง *Cx. tritaeniorhynchus* ซึ่งเป็นยุงที่พบได้มากที่สุดในแต่ละเดือน เฉลี่ยสูงถึง 86.80% และรองลงมาเป็นยุง *Cx. gelidus*, *An. vagus*, *An. peditaeniatus* , *Ma. uniformis* และ *Ma. annulifera* พบเฉลี่ย 10.75%, 1.49%, 0.19% และ 0.006 % ตามลำดับ ดังนั้นจากผลการศึกษานี้ จึงได้นำยุง *Cx. tritaeniorhynchus* ซึ่งเป็นยุงชนิดที่พบได้มากที่สุดในทุกๆเดือนมาเป็นยุงทดลอง โดยนำยุงมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการอย่างต่อเนื่อง และได้ผลเป็นอย่างดียิ่งเพื่อที่จะนำยุงตัวเต็มวัยไปใช้ศึกษาถึงศักยภาพในการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มสุกร

นอกจากนี้แล้ว จากการทดลองที่ 1 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จากยุงที่จับมาจากฟาร์มสุกร เมื่อนำมาตรวจ ด้วยวิธี RT-PCR ทันที พบว่าให้ผลเป็นบวก เช่นเดียวกันกับผลจากการศึกษานำร่อง ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่ายุงที่พบในฟาร์มสุกรนั้น มีแนวโน้มของการเป็นพาหะของเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้ โดยพบว่ายุงที่มีศักยภาพในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้คือ *Cx. tritaeniorhynchus* ซึ่งมีการนำเชื้อไวรัสชนิดนี้แบบ mechanical transmission แต่เป็นการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในระดับต่ำ สำหรับผลการทดลองที่ 2 พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส โดยวิธี RT-PCR และ virus isolation ในซีรั่มสุกรจากการให้สุกรกลุ่มตัวรับได้รับเชื้อไวรัส พี พี อาร์ อาร์ เอส โดยวิธี swine bioassay ในช่วง 30 นาทีหลังจากได้รับเชื้อ แสดงให้เห็นว่ายุง *Cx. tritaeniorhynchus* มีประสิทธิภาพในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้จริง แต่ความสามารถในการนำเชื้ออยู่ในระดับต่ำ

จากการทดลองชี้ให้เห็นว่ายุง *Cx. tritaeniorhynchus* เป็นยุงที่พบมากที่สุดในฟาร์มสุกรในจังหวัดนครปฐม และยุงชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ได้แบบทางกล แต่มีความสามารถในการนำเชื้อไวรัสได้ในระดับต่ำ อย่างไรก็ตามสามารถบอกได้ว่า ยุง *Culex tritaeniorhynchus* มีแนวโน้มที่สามารถนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แบบทางกลในฟาร์มสุกรได้ ซึ่งในอนาคตควรเน้นย้ำถึงความสำคัญในการนำเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ของยุงชนิดต่างๆในพื้นที่ที่มีการเลี้ยงสุกรต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาเฉพาะศักยภาพการนำโรคของ *Cx. tritaeniorhynchus* ซึ่งพบมากที่สุดในฟาร์มสุกร อย่างไรก็ตามยังมียุงอีกหลายชนิดที่พบได้ในฟาร์มสุกรและอาจมีศักยภาพในการนำโรค พี อาร์ อาร์ เอส แตกต่างจาก *Cx. tritaeniorhynchus* จึงควรที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมในยุงชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับการศึกษาใน *Cx. tritaeniorhynchus* นอกจากนี้ผลจากการวิจัยครั้งนี้ ยังช่วยในการจัดการฟาร์มด้านการป้องกันทางชีวภาพ ในฟาร์มที่ปลอดจากโรค พี อาร์ อาร์ เอส ที่ต้องควบคุมจำนวนประชากรของแมลงดูดเลือดที่อาจนำโรคเข้าสู่ฟาร์มได้ โดยเฉพาะฟาร์มที่อยู่ในเขตโรคระบาด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บรรณานุกรม

ทริกา จันทมณีโชติ, จิรา คงครอง และ ตวงทอง ปัจฉิมะศิริ. 2543. การชันสูตรโรค Porcine reproductive and respiratory syndrome โดย immunohistochemistry เทคนิค. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. หน้า 160.

สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์, สุวรรณี นิธิอุทัย และ ถิรายุทธ์ โฆสิตะมงคล. 2543. การสำรวจชนิดของยุงในแหล่งระบาดของโรคมาลาเรียไก่ในประเทศไทย. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. หน้า 143.

สุวรรณี นิธิอุทัย, สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์ และถิรายุทธ์ โฆสิตะมงคล._2543 ยุงที่มีศักยภาพเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียไก่ในประเทศไทย. การประชุมวิชาการครั้งที่ 38. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2-4 กุมภาพันธ์ 2543.

Albina E. 1997. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) : an overview. Vet. Microbiol. 55 : 309-316.

Beernsten A.N., James A.A. and Cristensen B.M. 2000. Genetics of Mosquitoes vector competence. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64 (1) : 115-137.

Benson J.E., Yaeger M.J., Hennings J.C., Lager K. and Yoon K-J. 2002. A comparison of Virus isolation, immunohistochrmistry, fetal serology, and reverse-transcription polymerase chain reaction assay for the identification of porcine reproductive and repiratory syndrome virus transplacental infection in the fetus. J. Vet. Diagn. Invest. 14 : 8-14.

Chiang G.L. 1993. Update on the bionomics of Mansonia vectors of brugian filariasis. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 24. Suppl. 2 : 69-75.

Clements A.N. 1992. The biology of mosquiotoes. Chapman & Hall. 509 pages.

Damrongwatanapokin S., Arsayuth K., Konkrong C., Parchariyanon S., PinyochonW. and Tantaswasdi U. 1996. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. J. Thai. Vet. Med. Assoc. 47 (2) : 19-31.

Damrongwatanapokin S., Parchariyanon S., Pinyochon W. and Tantaswasdi U. 1998. Isolation and characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. Proceeding of the 15th IPVS Congress. Bermingham. England. page 321.

Denac H., Moser C., Tratschin J.D. and Hofmann M.A. 1997. An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen. J. Virol. Methods. 65 : 169-181.

Geevarghese T.L., Mishra A.C., Jacop G.P. and Bhat H.R. 1994. Stydy on the mosquites vectors of Japanese encephalitis virus in Mandya district, Karnataka, India. Southest Asian J. Trop. Med. Public. Health. 25 (2) : 378-382.

Johansen C.A., Hall R.A., Van den hurk A.F., Ritchie S.A. and Mackenzie J.S. 2002. Detection and stability of Japanese encephalitis virus RNA and virus viability in dead infected mosquitoes under different storage conditions. Am. J. Trop. Med. Hyg. 67 (6) : 656-661.

Kristensen C.S., Botner A., Takai H., Nielson J.P. and Jorsal S.E. 2004. Experimental airborne transmission of PRRS virus. Vet. Microbiol. 99 : 197-202.

Macdonal W.W., Smith C.E.G., Dawson P.S., Ganapathipillai A. and Mahadevan S. 1967. Arbovirus infection in Sarawak: Further observations on mosquitoes. J. Med. Entomol. 4 : 146-157.

Otake S., Dee S.A., Rossow K.D., Moon R.D. and Pijoan C. 2002. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes. *Aedes vaxans* (Meigen). Can. J. Vet. Res. 66 : 191-195.

Otake S., Dee S.A., Moon R.D., Rossow K.D., Trincado C. and Pijoan C. 2003a. Evalution of mosquitoes, *Aedes vaxans*, as biological vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can. J. Vet. Rev. 67 : 265-270. (a)

Otake S., Dee S.A., Moon R.D., Rossow K.D., Trincado C. and Pijoan C. 2003b. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*). Vet. Rec. 152 : 73-76. (b)

Otake S., Dee S.A., Moon R.D., Rossow K.D., Trincado C., Franham M. and Pijoan C. 2003c. Survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. Can. J. Vet. Res. 67 : 198-203. (c)

Plagemann P.G.W. 2003. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus : Origin Hypothesis. Emerg. Infect. Dis. 9 (8) : 903-908.

Prullage J.B.,Williams R.E. and Gaafar S.M.1993. On the transmissibility of

Eperythrozoon suis by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. Vet. Parasitol. 50 (1-2) : 125-135.

Rattanarithikul R., Harrison B.A., Panthusiri P. and Coleman R.E. 2005. Illustraed keys to the mosquitoes of Thailand I. Background; geographic distribution; lists of genera, subgenera, and species; and a key to the genera. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 36. Suppl. 1 : 1-80.

Segales J. and McCaw M.B. 2002. Bacterial infections are potentiated by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus : Fact of Fiction? In Morilla A., Yoon K.J. and Zimerman J (ed)., Trends in emerging viral infections of swine. Iowa state press. 359-364.

Spagnuolo-Weaver M., Walker I.W., McNeilly F., Calvert V., Graham D., Burns K., Adair B.M. and Allan G.M. 1998. The reverse transcription polymerase chain reaction for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome : Comparison with virus isolation and serology. Vet. Microbiol. 62 : 207-215.

Stewatt W.C., Carbrey E.A., Jenney E.W., Kresse J.I., Snyder M.L. and Wessman S.J. 1975. Transmission of hog cholera virus by mosquitoes. Am. J. Vet. Res. 36 (5) : 611-614.

Sucharit S. 1986. Annotated bibliography on Mosquito borne diseases in Asia. 1983. Museam and Reference centre Seameo-tropical national centre of Thailand, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Thailand. 316 pages

Thanawongnuwech R., Halbur P.G. and Thacker E.L. 2000. The role of pulmonary intravascular macrophages in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Anima. Health. Res. Rev. 1 (2) : 95-102.

Thanawongnuwech R., Tatsnakit A., Damrongwatanapokin S. and Thacker E. 2002. Typing of PRRSV isolates in Thailand by a Nested Multiplex RT-PCR. Proceeding 17th IPVS congress. Page 410.

Tidwell M.A., Dean W.D., Combs G.P., Anderson D.W., Cowart W.O. and Axtell R.C. 1972. Transmission of hog cholera virus by houseflies (Tabanidae : Diptera). Am. J. Vet. Res. 33 : 615-622.

Vythilingam I., Mahadevan S., Zaridah M.Z., Ong K.K., Abdullah G. and Ong Y.F. 1994. Studies on adult mosquito vectors of Japanese encephalitis in a pig farm in

Selangor, Malaysia. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 25 (2) : 383-386.

Weber A.F., Moon R.D., Sorensen D.K., Bates D.W., Meiske J.E., Brown C.A., Rohland N.L., Hooker E.C. and Strand W.D. 1988. Evaluation of the stable fly (*stomoxys calcitrans*) as a vector of enzootic bovine leucosis. Am. J. Vet. Res. 49 : 1543-1549.

Wensvoort G., Terpstra C., Pol J.M., Ter Laak E.A., Bloemraad M., de Kluyver E.P., Kragten C., van Buiten L., den Besten A. and Wagnenaar F. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Q. 13 (3) : 121-130.

Witte S.B., Chard-Bergstrom C., Loughin T.A. and Kapil S. 2000. Development of a Recombinant Nucleocapsid-Based Enzymed-Linked Immunosorbent Assay for the Quantification of Antibodies Against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7 (4) : 700-702.

Yoon K.J. 2002. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus : Virology. In Morilla A., Yoon K.J. and Zimerman J (ed)., Trends in emerging viral infections of swine. Iowa state press. 339-346.

Yoon K.J. and Stevenson G. 2002. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus : Diagnosis. In Morilla A., Yoon K.J. and Zimerman J (ed)., Trends in emerging viral infections of swine. Iowa state press. 347-354.

Zimmerman J.J. 2002. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus : Epidemiology. In Morilla A., Yoon K.J. and Zimerman J (ed)., Trends in emerging viral infection of swine. Iowa state press. 331-337.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนผนวก

1. Study on potential vectors of PRRSV in mosquitoes captured from a PRRSV-positive pig farm in Thailand
2. การสำรวจชนิดของยุงในฟาร์มสุกรที่เป็นโรค พี อาร์ อาร์ เอส จังหวัดนครปฐม เวชชสารสัตวแพทย์ 2548 (ส่งตีพิมพ์)
3. Potential vector of *Culex tritaeniorhynchus* for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) transmission. Vet. Microbiol. 2005 (Submitted)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STUDY ON POTENTIAL VECTORS OF PRRSV IN MOSQUITOES CAPTURED FROM A PRRSV-POSITIVE PIG FARM IN THAILAND.

K. Pringproa, R. Panyathong, S. Chungpivat, W. Kalpravidh, S. Kesdangsakonwut, R. Thanawongnuwech
Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, 10330 Thailand.

Introduction and Objectives

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is one of the most economically significant pathogen of pigs. In Thailand, PRRSV positive antibodies was founded since 1989 and the genotype was related to the US strain(1). PRRSV can be transmitted via direct contact from PRRSV-infected pigs, artificial insemination, or mechanical vectors. Mosquito vector is believed to be one of potential mechanical vectors for PRRSV. In the previous report, *Aedes vexans* could contain the PRRSV in the body up to 6 h after feeding on the PRRSV-infected pig (2). However, that study reported the potential vectors of various mosquito species seen in the North America, where the geographical and environmental factors differ from the Southeast Asian countries. Here, we reported the preliminary study on potential vectors of mosquitoes species captured from a PRRSV-positive farm in Nakornprathom Province, a high density of pig farms in Thailand.

Materials and Methods

Various species of mosquitoes were captured from a PRRSV-positive pig farm in Nakornprathom Province, during 18.00-20.00 pm. The mosquitoes were placed in the Veterinary Parasitology Laboratory section, Chulalongkorn University and maintained with 10% sucrose until used. Species identification was classified using illustrated keys to the medically important mosquitoes of Thailand. *Culex tritaeniorhynchus*, the predominantly species seen in this study was choosen for this experimental study. Ten mosquitoes were randomly selected from each species and tested for the presence of PRRSV right after capturing. In day 7 after captured from the farm, the mosquitoes were completely fed using mice until ready to use in the experiment.

A 3 week old piglet was brought from a PRRSV-negative farm and tested for PRRSV by either ELISA or RT-PCR(3). After quarantine for 3 days, 5 ml of the US strain PRRSV (01NP1, 10^5 $TCID_{50}$/ml) was inoculated intranasally. At 7 days post infection, pig was anesthesized for mosquito feeding (30 minute) and blood sampling from the pig was done for viral titration at the same time. Seventy engorged female mosquitoes were placed in a new plastic container. PRRSV detection from groups of mosquitoes was performed by using pooled 5 engorged mosquitoes at 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 h and 7 days after feeding on the PRRSV-infected pig. Negative control mosquitoes and mosquitoes feeding on the PRRSV-infected pig were tested for PRRSV using RT-PCR.

Results and Discussion

Our preliminary study, showed that there were 4 species (*Culex tritaeniorhynchus*, *Culex gelidus*, *Mansonia uniformis* and *Anopheles spp.*) of mosquitoes captured at the farm and only *Culex gelidus* and *Mansonia uniformis* were tested positive for PRRSV. It suggested that those mosquitoes could be natural vectors for PRRSV in a PRRSV-positive pig farm in Thailand.

In the experimental study, the viremic pig had the titer of 10^3 $TCID_{50}$ /ml and the mosquitoes (*C. tritaeniorhynchus*) were allowed to feed on the PRRSV-infected pig. Interestingly, the results showed that the mosquitoes (*C. tritaeniorhynchus*) could contain the PRRSV up to 48 h after feeding on the PRRSV-infected pig using RT-PCR (figure 1).

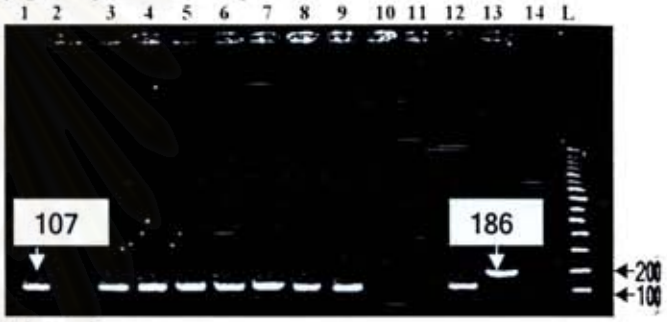


Figure 1
Nested multiplex PCR for PRRSV. Lanes: 1, PRRSV-infected pig serum; 2, negative control of *C. tritaeniorhynchus*; Lanes 3-11 is the pooled sample of *C. tritaeniorhynchus* at 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h and 7 days; Lane: 12, control (US strain) ; 13, control (EU strain); 14, negative control; L, DNA ladder.

In contrast to the previous study (2), *C. tritaeniorhynchus* is able to carry PRRSV longer than *Aedes vexans*. *C. tritaeniorhynchus* could be one of the potential mechanical vectors for PRRSV in Thailand. In addition, *C. gelidus* and *M. uniformis* could be other potential vectors. However, more studies are needed in order to investigate the role of those species in PRRSV transmission.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. S. Suradhat, Dr. W. Sada, Ms. A. Tatsanakit, and P. Wongyanin for technical assistance.

References

(1) Damrongwatanapokin et al. 1996. J. Thai Vet. Med. Assoc. 47(2): 19-31.
(2) Otake et al. 2003. Can J Vet Res 67:265-267.
(3) Thanawongnuwech et al. 2002. Proceeding 17th IPVS congress, 410.

การสำรวจชนิดของยุงในฟาร์มสุกรที่เป็นโรค พี อาร์ อาร์ เอส จังหวัดนครปฐม

สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์[1*] กฤษฎากรณ์ พริ้งเพราะ [2]ระพี ปัญญาทอง[3] วรรณภรณ์ จันทร์หอม[1] รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช[1]

Abstract

Sudchit Chungpivat[1*] Kidsadagon Pringproa[2] Rapee Panyathong[3] Wannaporn Junhom[1] Roongroje Thanawongnuwech[1]

A survey of mosquito species in a porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) positive pig farm in Nakorn Pathom Province

A survey on mosquito species was conducted once a month in a PRRS positive pig farm in Nakorn Pathom province during May 2004 to April 2005. The mosquito larvae were collected in the vicinity of 1 km in diameter and the adult females were captured while feeding on the pigs by using oral aspirators from 6 to 10 pm. Of total 91,840 mosquitoes, there were 3 genera and 6 species as the following *Culex tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus* , *Mansonia uniformis*, *Ma. annulifera, Anopheles vagus* and *An. peditaeniatus* with the predominant *Culex tritaeniorhynchus* (60-95.75%) and *Ma. annulifera* was the least (0.02-0.05%). The collected mosquitoes larvae were found to be *Culex tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus*, *Anopheles vagus* and *An. peditaeniatus.*

Keywords : *Culex tritaeniorhynchus,* mosquitoes, pig farm

[1]Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

[2]Clinic for Food Animal, Faculty of Veterinary Medicine, Chiangmai University, Chiangmai 50100

[2]Bangkok Agroindustrial-products Public Company Limited, Bangkok 10500

[1]ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

[2]ที่อยู่ปัจจุบัน:คลินิกสัตว์บริโภค คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50100

[3]ที่อยู่ปัจจุบัน:บริษัทกรุงเทพผลิตผลอุตสาหกรรมการเกษตรจำกัด (มหาชน) กรุงเทพฯ 10500

[*]ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์[1*] กฤษฎากรณ์ พริ้งเพราะ [2]ระพี ปัญญาทอง[3] วรรณภรณ์ จันทร์หอม[1] รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช[1]

การสำรวจชนิดของยุงในฟาร์มสุกร ที่เป็นโรค พี อาร์ อาร์ เอส จังหวัดนครปฐม

การสำรวจชนิดของยุงในฟาร์มสุกรที่เป็นโรค พี อาร์ อาร์ เอส จังหวัดนครปฐม ทำการศึกษาชนิดของยุงตัวเต็มวัยที่เข้ามาดูดเลือดสุกรในฟาร์ม และสำรวจตัวอ่อนในแหล่งน้ำรอบๆฟาร์มสุกรทดลองในรัศมี 1 กิโลเมตร โดยทำการศึกษาตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2547 ถึงเดือนเมษายน 2548 เดือนละ 1 ครั้ง เก็บตัวอย่างยุงตัวเต็มวัยขณะดูดเลือดบนตัวสุกรด้วย oral aspirator ระหว่างเวลา 18.00 ถึง 22.00 นาฬิกา ใช้กระบวยตักน้ำจากแหล่งน้ำเพื่อตรวจหาตัวอ่อน ผลการศึกษาจำแนกชนิดยุงทั้งหมดจำนวน 91,840 ตัว พบยุง 3 สกุล 6 ชนิด คือ *Culex tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus*, *Mansonia uniformis*, *Ma. Annulifera, Anopheles vagus* และ *An. peditaeniatus* โดยพบยุง *Cx. tritaeniorhynchus* มากที่สุด (60-95.75%) และ *Ma. annulifera* พบน้อยที่สุด (0.02-0.05%) และผลการสำรวจในแหล่งน้ำพบตัวอ่อนของ *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus*, *An. vagus* และ *An. peditaeniatus*

คำสำคัญ : *Culex tritaeniorhynchus* ยุง ฟาร์มสุกร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

สุกรเป็นปศุสัตว์ที่มีการเลี้ยงแบบอุตสาหกรรม ทำรายได้ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงทั้งรายย่อยและรายใหญ่จำนวนมาก ซึ่งมีการเลี้ยงทั้งแบบฟาร์มเปิด และฟาร์มปิด โรคในสุกรที่สำคัญพบได้บ่อยและกำลังเป็นปัญหาในปัจจุบันคือโรค พี อาร์ อาร์ เอส (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus) ที่ทำให้เกิดความสูญเสียเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั่วโลก มีรายงานการเกิดโรคนี้ครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาในปีค.ศ. 1987 สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบแอนติบอดี้ต่อเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2532 (Damrongwatanapokin et al., 1996) และยังพบโรคนี้ได้ในสุกรจนถึงปัจจุบัน การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้มีได้หลายทาง ได้แก่ ผ่านทางรก ทางน้ำเชื้อ การสัมผัสกับสุกรป่วยโดยตรง (Otake et al., 2003a; Otake et al., 2003b) นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส แบบกลไกผ่านทางแมลงพาหะคือ แมลงวันบ้าน (*Musca domestica*) ได้ (Otake et al., 2003a,b; Otake et al., 2003c) ส่วนยุงเป็นแมลงดูดเลือดที่สำคัญในการเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญหลายชนิดสู่คน เช่น โรคฟิลาริเอซีส โรคมาลาเรีย โรคไข้เลือดออก โรคไข้สมองอักเสบซึ่งมีสุกรเป็นแหล่งกักเก็บโรค (Johansen et al., 2002) และยังเป็นพาหะนำโรคในสัตว์ได้เป็นอย่างดี เช่นโรคหนอนพยาธิหัวใจในสุนัขและแมว โรคมาลาเรียไก่ โรค Eperythrozoonosis ในสุกร (Prullage et al., 1993) เป็นต้น และจากการศึกษาของ Otake และคณะ (2002) และ Otake และคณะ (2003a) พบว่ายุง *Aedes vaxan* ซึ่งพบได้มากในฟาร์มสุกรในประเทศสหรัฐอเมริกาสามารถเป็นพาหะนำโรค พี อาร์ อาร์ เอส แบบกลไกได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ Pringproa และคณะ (2004) ได้รายงานการตรวจพบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส จากยุง *Mansonia uniformis* และยุง *Culex gelidus* ที่จับได้จากฟาร์มสุกรที่มีการระบาดของโรค พี อาร์ อาร์ เอส ได้อีกด้วย จากรายงานการระบาดของโรคพี อาร์ อาร์ เอส ในฟาร์มสุกรในประเทศไทยและสามารถแพร่เชื้อผ่านทางยุงได้ แต่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาถึงชนิดของยุงที่พบได้ในฟาร์มสุกร ดังนั้นจุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อสำรวจชนิดของยุงที่เข้ามาดูดเลือดสุกรในฟาร์มที่เป็นโรคไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในจังหวัดนครปฐมเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. สถานที่ศึกษา

ฟาร์มสุกรที่เป็นโรค พี อาร์ อาร์ เอส ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ที่ใช้ในการสำรวจยุงเป็นฟาร์มที่มีการเลี้ยงสุกรแม่พันธุ์ ลักษณะเป็นโรงเรือนยกพื้นโล่งมีอากาศถ่ายเทสะดวก และรอบๆฟาร์มในรัศมี 1 กิโลเมตรมีแหล่งน้ำ ได้แก่นาข้าว คลองระบายน้ำที่มีวัชพืชและหญ้า แหล่งน้ำขังสะอาดมีวัชพืชและหญ้า หนองน้ำขนาดใหญ่เป็นแหล่งน้ำสะอาดที่มีวัชพืชจำพวกผักตบชวา กก ผักบุ้งไทย และหญ้า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การสำรวจชนิดของยุงในฟาร์มสุกร

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างยุงระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2547 ถึงเดือนเมษายน 2548 เดือนละ 1 ครั้ง

2.1 ยุงตัวเต็มวัย

เก็บตัวอย่างยุงตัวเต็มวัยที่เข้ามาในฟาร์มและดูดเลือดบนตัวสุกรตั้งแต่เวลา 18.00–22.00 น. โดยใช้ไฟฉายส่อง แล้วใช้ oral aspirator ดูดจับยุงขณะดูดเลือดบนตัวสุกร (รูปที่1) แยกใส่กล่องยุงขนาดเล็กที่เจาะรูด้านข้างและมีผ้าโปร่งคลุมด้านบน กล่องละ 200 ตัว ใช้ก้อนสำลีชุบน้ำพอหมาดๆวางด้านบน (รูปที่ 2) เก็บตัวอย่างจนถึงเวลา 22.00 น. การเก็บตัวอย่างยุงในแต่ละครั้งใช้คน 6 คน นำตัวอย่างยุงทั้งหมดขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการเลี้ยงยุงที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 80% ที่หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการตรวจจำแนกชนิดโดยใช้กุญแจจำแนกชนิดยุงที่พบในประเทศไทย (Rattanarithikul and Panthusiri, 1994) นับจำนวน และจดบันทึกผลการทดลอง

2.2 ตัวอ่อนและตัวกลางวัย

เก็บตัวอ่อนและตัวกลางวัยในแหล่งน้ำในระยะรัศมี 1 กิโลเมตรรอบๆฟาร์มโดยใช้กระบวยตักน้ำที่ต่อด้วยด้ามไม้ไผ่ จ้วงตักน้ำเพื่อตรวจหาตัวอ่อนและตัวกลางวัย ตัวอย่างที่ได้นำไปเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการจนเป็นระยะตัวเต็มวัยเพื่อศึกษาจำแนกชนิด โดยใช้กุญแจจำแนกชนิดยุงที่พบในประเทศไทย (Rattanarithikul and Panthusiri, 1994)

ผล

ผลการสำรวจและศึกษาจำแนกชนิดของยุงตัวเต็มวัยในฟาร์มสุกรโดยใช้ oral aspirator ดูดยุงที่เข้ามาดูดเลือดบนตัวสุกร ในช่วงเวลา 18.00–22.00 น. เดือนละ 1 ครั้ง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2547 ถึงเดือนเมษายน 2548 เป็นเวลา 12 เดือน โดยใช้คน 6 คนเก็บตัวอย่างในแต่ละครั้ง ดูดจับยุงได้ทั้งหมดจำนวน 91,840 ตัว พบยุงจำนวนมากในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤศจิกายน (8.28-14.59%) และพบมากที่สุดในเดือนตุลาคม (14.59%) ต่อจากนั้นจำนวนยุงจะเริ่มน้อยลงในเดือนธันวาคม (4.79%) และเดือนมกราคม (5.88%) ซึ่งเป็นช่วงที่มีอากาศเย็นและความชื้นในอากาศน้อย และพบยุงจำนวนน้อยที่สุดในเดือนมีนาคม (4.57%) (รูปที่ 3) ยุงที่ตรวจจำแนกพบทั้งหมดมี 3 สกุล 6 ชนิด คือ *Culex tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus*, *Mansonia uniformis*, *Ma. annulifera, Anopheles vagus* และ *An. peditaeniatus* โดยทุกๆเดือนจะพบยุง *Cx. tritaeniorhynchus* มากที่สุดเฉลี่ย 86.80 % และ *Ma. annulifera* พบน้อยที่สุดเฉลี่ย 0.006 % (ตารางที่ 1)

ตัวอ่อนของยุงในแหล่งน้ำต่างๆที่ตรวจพบ มี 4 ชนิด ได้แก่ *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus, An. vagus* และ *An. peditaeniatus*

วิจารณ์

ผลจากการศึกษาสำรวจชนิดของยุงที่พบในฟาร์มสุกร พบยุงทั้งหมด 3 สกุล ได้แก่ *Culex, Mansonia* และ *Anopheles* และยุงที่พบมากที่สุดในแต่ละเดือนคือยุง *Culex* รองลงมาเป็นยุง *Anopheles* และยุง *Mansonia* ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการสำรวจชนิดของยุงที่พบในฟาร์มสุกรในประเทศมาเลเซีย (Vythilingam et al., 1994) ซึ่งยุงทั้งหมดชอบออกหากินในช่วงเวลาพลบค่ำและตอนกลางคืน (Chiang, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับช่วงระยะเวลาที่ใช้สำรวจเก็บตัวอย่างยุงในฟาร์มสุกรในครั้งนี้ จำนวนความหนาแน่นของยุงพบมากในช่วงฤดูฝนระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤศจิกายน (8.28-14.59%) ซึ่งมีน้ำมากโดยเฉพาะในนาข้าว และแหล่งน้ำขังอื่นๆ ส่วนในช่วงตั้งแต่เดือนธันวาคม พบจำนวนยุงลดน้อยลง และพบน้อยที่สุดในเดือนมีนาคม (4.57%) ซึ่งเป็นช่วงฤดูแล้ง และอากาศร้อน

ผลการสำรวจหาตัวอ่อนและตัวกลางวัยของยุงในแหล่งน้ำต่างๆ พบเฉพาะยุง *Culex* และยุง *Anopheles* แต่ไม่พบยุง *Mansonia* ทั้งนี้เพราะลักษณะแหล่งน้ำโดยเฉพาะในนาข้าวที่มีน้ำขัง แหล่งน้ำขังสะอาดที่มีวัชพืชจำพวก ต้นหญ้าสูงๆ ผักบุ้ง คู คลองระบายน้ำสะอาด หรือน้ำขังในหลุมบ่อที่เป็นรอยเท้าสัตว์ เป็นแหล่งเพาะพันธุ์ตามธรรมชาติของ ยุง *Cx. tritaeniorhyncus*, *Cx. gelidus, An. vagus* และ *An. peditaeniatus* ซึ่งตัวอ่อนของยุงเหล่านี้จะหากินอยู่ในแหล่งน้ำและใช้ท่อหายใจ (siphon tube) แตะผิวน้ำเพื่อหายใจ (Vythilingam et al., 1992) ดังนั้นเมื่อเก็บตัวอย่างโดยใช้กระบวยจ้วงตักน้ำจากแหล่งน้ำที่ทำการศึกษา จึงสามารถพบตัวอย่างของยุงเหล่านี้ได้ ในขณะที่แหล่งเพาะพันธุ์ตามธรรมชาติของยุง *Mansonia* เป็นหนองน้ำปิด ในแหล่งน้ำปิด หรือคูคลองที่มีวัชพืชจำพวก ผักตบชวา จอก-แหน ต้นกก (Chiang, 1993) ซึ่งผลการสำรวจในครั้งนี้ไม่พบทั้งตัวอ่อนและตัวกลางวัยของยุง *Mansonia* ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวิธีการสำรวจในครั้งนี้อาจจะยังไม่เหมาะสมเนื่องจากตัวอ่อน หรือตัวกลางวัยของยุง *Mansonia* จะหากินอยู่ใต้ผิวน้ำและเกาะติดอยู่กับวัชพืชใต้น้ำ โดยใช้ท่อหายใจที่มีลักษณะปลายแหลมแทงเข้าไปในลำต้นหรือรากของวัชพืชเพื่อเอาออกซิเจนหายใจผ่านทางพืชน้ำ ดังนั้นการตรวจหาตัวอ่อนหรือตัวกลางวัยของยุงชนิดนี้ วิธีที่ดีที่สุดคือตรวจหาตัวอ่อนหรือตัวกลางวัยที่เกาะติดอยู่กับวัชพืช (Chiang, 1993) ซึ่งในการเก็บตัวอย่างไม่ได้ใช้วิธีดังกล่าวจึงทำให้ไม่พบตัวอ่อนและตัวกลางวัยของยุง *Mansonia*

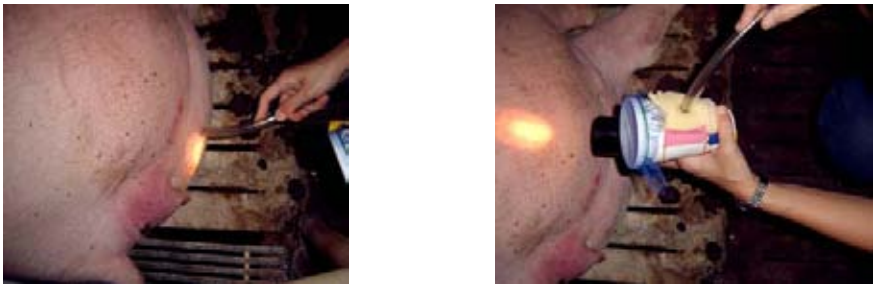
ยุงรำคาญ (*Culex*) เป็นยุงที่พบมากที่สุดในการศึกษาในครั้งนี้มี 2 ชนิดคือ *Cx. tritaeniorhyncus* และ *Cx. gelidus* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Vythilingam (1994) ที่พบยุงทั้ง 2 ชนิดมากที่สุดในฟาร์มสุกรเช่นเดียวกัน ซึ่งต่างจากผลการสำรวจยุง *Culex* ในพื้นที่เกษตรกรรมทางภาคเหนือของประเทศไทยซึ่งพบทั้งหมด 8 ชนิด และชนิดที่พบมากที่สุดได้แก่ *Cx. tritaeniorhyncus*, *Cx. vishnui* และ *Cx. gelidus* ตามลำดับ (Takagi et al., 2005) แต่ในการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบ *Cx. vishnui* เข้ามาดูดเลือดสุกรในฟาร์ม ยุง *Cx. tritaeniorhyncus* และ *Cx. gelidus* เป็นพาหะนำโรคไข้สมองอักเสบในประเทศไทย (Sucharit et al., 1989; Samboon et al., 1989) ซึ่งยุงทั้ง 2 ชนิดนี้พบได้มากในช่วงฤดูฝนและจำนวนของยุงมีความสัมพันธ์กับแหล่งเพาะพันธุ์โดยเฉพาะ นาข้าว แหล่งน้ำในที่รกร้าง และแหล่งน้ำสะอาด และยังพบว่าแอนติบอดี้ของเชื้อ Japanese encephalitis ในสุกรเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับจำนวนยุง (Gingrich et al., 1992) นอกจากนี้ยุงทั้ง 2 ชนิดชอบดูด

เลือดสัตว์ใหญ่ เช่น โค สุกร แพะ แกะ มากกว่าดูดเลือดคน (Macdonal et al., 1967; Kanojia et al., 1997; Arunachalam et al., 2004)

ยุงก้นปล่อง (*Anopheles*) ที่เข้ามาดูดเลือดสุกรในฟาร์มมีจำนวนน้อยเพียง 0.7-5.5% โดยพบมากที่สุดในเดือนเมษายน (5.5%) ยุงที่พบมี 2 ชนิดคือ *An. vagus* และ *An. peditaeniatus* ยุงทั้ง 2 ชนิดนี้มีแหล่งเพาะพันธุ์ในพื้นที่ทำการเกษตร นาข้าว แหล่งน้ำขังในหลุมบ่อ หรือรอยเท้าสัตว์ มีพฤติกรรมชอบออกดูดเลือดโฮสต์ในเวลาโพล้เพล้ และชอบดูดเลือดสัตว์ใหญ่ เช่น สุกร และโค (Rahmam et al., 1995) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ายุง *An. vagus* มีแนวโน้มในการเป็นพาหะนำเชื้อ *Plasmodium falciparum* และ *P. vivax* ได้อีกด้วย (Somboon et al., 1994)

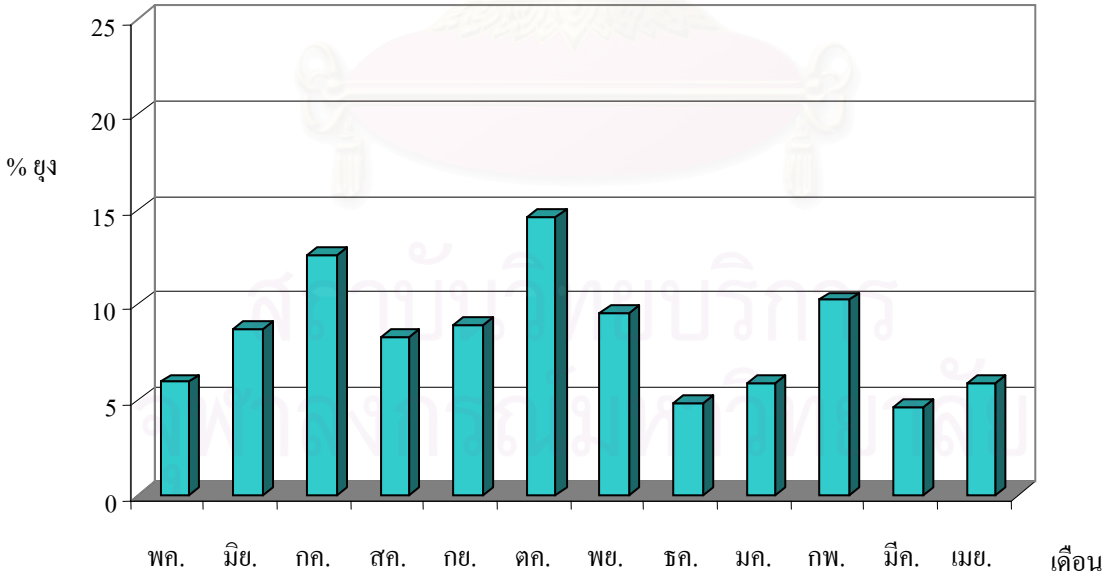
ยุงเสือ (*Mansonia*) ที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนน้อยที่สุด (0.01-0.45%) มี 2 ชนิดคือ *Ma. uniformis* และ *Ma. annulifera* โดยพบยุง *Ma. uniformis* มากในเดือนกรกฎาคม (0.41%) และธันวาคม (0.40%) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chiang (1993) ที่รายงานว่ายุง *Ma. uniformis* จะพบมากในช่วงเดือนกรกฎาคม ถึงกันยายน และอีกช่วงในเดือนธันวาคมถึงมกราคม โดยยุง *Mansonia* จะมีแหล่งเพาะพันธุ์เป็นหนองน้ำปิดมีวัชพืชจำพวก จอก แหน กก ผักตบชวา (Chiang, 1993) แต่แหล่งน้ำที่ศึกษาในครั้งนี้ในรัศมี 1 กิโลเมตรรอบๆฟาร์มสุกรทดลอง เป็นหนองน้ำที่มีวัชพืช จำพวกผักบุ้ง หญ้า กก และผักตบชวาอยู่ไม่มากนัก จึงเป็นไปได้ที่อาจพบยุง *Mansonia* น้อยกว่ายุงชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ยุง *Ma. uniformis* และ *Ma. annulifera* เป็นพาหะนำเชื้อหนอนพยาธิ *Brugia* ในคนและแมวได้เป็นอย่างดี (Chiang, 1993; Lek-Uthai and Tomoens, 2005)

ผลการศึกษาในครั้งนี้ พบยุงทั้งหมด 3 สกุล 6 ชนิด และยุงทุกชนิดสามารถเป็นพาหะนำโรคต่างๆได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยุง *Cx. tritaeniorhyncus* พบจำนวนมากที่สุดเฉลี่ย 86.80 % รองลงมาคือยุง *Cx. gelidus* พบเฉลี่ย 10.75 % ซึ่งยุงทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นพาหะที่สำคัญในการนำเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้สมองอักเสบในคน และยังเป็นยุงที่พบได้มากที่สุดในฟาร์มไก่ รวมทั้งมีศักยภาพในการนำโรคมาลาเรียไก่ในประเทศไทยอีกด้วย (สุดจิตต์และคณะ, 2543; สุวรรณีและคณะ, 2543) นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบเชื้อไวรัส พี อาร์ อาร์ เอส ในยุง *Cx.. tritaeniorhyncus* และ *Ma. uniformis* ที่จับได้จากฟาร์มสุกรที่มีการระบาดของโรค พี อาร์ อาร์ เอส (Pringproa et al., 2004) ได้อีกด้วย ดังนั้นผลจากการศึกษาการสำรวจชนิดของยุงในฟาร์มสุกรที่เป็นโรคพี อาร์ อาร์ เอส ในจังหวัดนครปฐมในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับศึกษาการเป็นพาหะนำโรคชนิดต่างๆของยุงในสุกรต่อไป



รูปที่ 1 แสดงวิธีการเก็บตัวอย่างยุงตัวเต็มวัยที่เข้ามากัดและดูดเลือดสุกรในฟาร์มโดยใช้ไฟฉายส่องและดูดจับด้วย oral aspirator

รูปที่ 2 ตัวอย่างยุงที่เก็บได้จากตัวสุกรแยกเก็บใส่กล่องขนาดเล็กที่มีผ้าโปรงคลุมด้านบน กล่องละ 200 ตัว ใช้ก้อนสำลีชุบน้ำวางไว้ด้านบนกล่อง สำหรับขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 3 จำนวนร้อยละของตัวอย่างยุงในแต่ละเดือนที่เก็บได้ขณะเข้ามาดูดเลือดสุกรในฟาร์มระหว่างเวลา 18.00 - 22.00 น. ของเดือนพฤษภาคม 2547 ถึงเดือนเมษายน 2548

ตารางที่ 1 ผลการสำรวจชนิดของยุง และจำนวนชนิดของยุงคิดเป็นร้อยละของยุงที่พบในฟาร์มสุกรที่เป็นโรค พี อาร์ อาร์ เอส ในจังหวัดนครปฐม ระหว่างเวลา 18.00 - 22.00 น.ในช่วงเดือนพฤษภาคม 2547 ถึงเมษายน 2548

เดือน	จำนวนยุง (%)	% Cxt	% Cxg	% Mau	% Maa	% Anp	% Anv
พฤษภาคม	5,440 (5.92)	92.68	4.72	0.01	0	0.26	2.33
มิถุนายน	8,000 (8.71)	69.43	29.76	0.11	0	0.29	0.41
กรกฎาคม	11,600 (12.63)	88.53	10.0	0.41	0	0.31	0.75
สิงหาคม	7,600 (8.28)	90.81	7.82	0.13	0	0.45	0.79
กันยายน	8,200 (8.93)	91.76	6.17	0.24	0	0.41	1.42
ตุลาคม	13,400 (14.59)	83.48	15.0	0.35	0.02	0.44	0.71
พฤศจิกายน	8,800 (9.58)	89.04	7.50	0.05	0	1.30	2.11
ธันวาคม	4,400 (4.79)	95.75	1.73	0.40	0.05	1.34	0.73
มกราคม	5,400 (5.88)	91.95	3.81	0.28	0	2.15	1.81
กุมภาพันธ์	9,400 (10.24)	94.48	3.06	0.12	0	0.83	1.51
มีนาคม	4,200 (4.57)	60	38.64	0.07	0	0.96	0.33
เมษายน	5,400 (5.88)	93.67	0.78	0.05	0	0.46	5.04
จำนวนเฉลี่ย %		86.80	10.75	0.19	0.006	0.77	1.49

Cxt = *Culex tritaeniorhynchus* Cxg = *Culex gelidus*

Mau = *Mansonia uniformis* Maa = *Mansonia annulifera*

Anv = *Anopheles vagus* Anp = *Anopheles peditaeniatus*

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ศึกษา ขอขอบคุณ คุณศิวะพร กล่ำคล้าย ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างยุง รศ.ดร.ชำนาญ อภิวัฒนศร ภาควิชากีฏวิทยา คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ในการช่วยตรวจยืนยันชนิดของยุงตัวเต็มวัย และทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ที่ให้เงินสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์ สุวรรณี นิธิอุทัย และถิรายุทธ์ โฆสิตะมงคล. 2000(2543). การสำรวจชนิดของยุงในแหล่งระบาดของโรคมาลาเรียไก่ในประเทศไทย การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543 : 143.

สุวรรณี นิธิอุทัย สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์ และถิรายุทธ์ โฆสิตะมงคล. (2000) 2543. ยุงที่มีศักยภาพเป็นพาหะนำโรคมาลาเรียไก่ในประเทศไทย การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543 : 142.

Arunachalam, N., Samuel, P.P., Hiriyan, J., Rajendran, R. and Dash, A.P. 2004. Short report: observation on the multiple feeding behavior of *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae), the vector of Japanese encephalitis in Kerala in southern India. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 35(2): 325-333.

Chiang, G.L. 1993. Update on the bionomics of Mansonia vectors of brugian filariasis. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 24. Suppl. 2: 69-75.

Damrongwatanapokin, S., Arsayuth, K., Konkrong, C., Parchariyanon, S., Pinyochon, W. and Tantaswasdi, U. 1996. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. J. Thai. Vet. Med. Assoc. 47 (2): 19-31.

Gingrich, J.B., Nisalak. A., Latendresse. J.R., Sattabongkot. J., Hoke. C.H., Pomsdhit. J., Chantalakana. C., Satayaphanta, C., Uechiewcharnkit, K. and Innis, B.L. 1992. Japanease encephalitis virus in Bangkok: factors influencing vector infections in the three suburban communities. J. Med. Entomol. 29(3): 436-444.

Johansen,C.A., Hall, R.A., Van den hurk, A.F., Ritchie, S.A. and Mackenzie, J.S. 2002. Detection and stability of Japanese encephalitis virus RNA and virus viability in dead infected mosquitoes under different storage conditions. Am. J. Trop. Med. Hyg. 67(6): 656-661.

Kanojia, P.C., Shetty, P.S. and Geevarghese, G. 1997. A long-term study on vector abundance & seasonal prevalence in relation to the occurrence of Japanese encephalitis in Gorakhpur district, Uttar Pradesh. Parasitologia. 39(4): 375-382.

Lek-Uthai, U. and Tomoen, W. 2005. Susceptibility of *Mansonia uniformis* to *Brugia malayi* microfilariae from infected domestic cat. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 36(2): 434-441.

Macdonal, W.W., Smith, C.E.G., Dawson, P.S., Ganapathipillai, A., Mahadevan, S. 1967. Arbovirus infection in Sarawak: Further observations on mosquitoes. J. Med. Entomol. 4: 146-157.

Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D. and Pijoan,C. 2002. Mechanical transmission of porcine

reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vaxans* (Meigen). Can. J. Vet. Res. 66: 191-195.

Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C. and Pijoan, C. 2003a. Evalution of mosquitoes, *Aedes vaxans*, as biological vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can. J. Vet. Rev. 67: 265-270.

Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C. and Pijoan, C. 2003b. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*). Vet. Rec. 152: 73-76.

Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C., Franham, M. and Pijoan, C. 2003c. Survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. Can. J. Vet. Res. 67: 198-203.

Pringproa, K., Panyathong, R., Chungpivat, S., Kalpravidh, W., Kesdangsakowut, S. and Thanawongnuwech, R. 2004. Study on potential vectors of PRRSV in mosquitoes captured from a PRRSV-positive pig farm in Thailand. 18th International Pig Veterinary Society. Hamburg, Germany, June 28-July 1.

Prullage,J.B., Williams,R.F. and Gaafar,S.M. 1993. On the transmissibility of *Eperythrozoon suis* by *Stomoyxs calcitrans* and *Aedes aegypti*. Vet Parasitol. 50(1-2) : 125-135.

Rahman, W.A., Abu Hassan, A., Adanan, C.R. and Mohd Razha, R. 1995. A report of Anopheles (Diptera : Culicidae) attracted to cow bait in a malaria endemic village in Pininsular malaysia near the Thailand border. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 26(2): 259-263.

Rattanarithikul, R. and Panthusiri, P. 1994. Illustrated keys to the medically important mosquitos of Thailand . Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 25. Supp l : 1-66.

Somboon, P., Choochote, W., Khamboonruang, C., Keha, P., Suwanphanit, P., Sukontasan, K. and Chaivong, P. 1989. Studies on the Japanese encephalitis vectors in Amphoe Muang, Chiang Mai, Northern Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 20(1): 9-17.

Somboon, P., Suwonkerd, W. and Lines, J.D. 1994. Susceptibility of Thai zoophilic Anophelines and suspected malaria vectors to local strains of human malaria parasites. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 25(4): 766-770.

Sucharit, S., Surathin, K. and Shrestha, S.R. 1989. Vectors of Japanease encephalitis virus (JEV): species complexes of the vectors. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 20(4): 611-621.

Takagi, M., Suwonkers, W.,Tsuda, Y., Sugiyama, A. and Wada, Y. 2005. Effects of rice culture practices

on the abundance of Culex mosquitoes (Diptera:Culicidae) in Northern Thailand. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 21(2): 194-200.

Vythilingam, I., Mahadevan, S., Zaridah, M.Z., Ong, K.K., Abdullah, G. and Ong, Y.F. 1994. Studies on adult mosquito vectors of Japanese encephalitis in a pig farm in Selangor, Malaysia. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 25(2): 383-386.

Vythilingam, I.,Chiang, G.L., Lee, H.L. and Inder Singh, K. 1992. Bionomics of important mosquito vectors in Malaysia. 23(4) : 587-603.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary Microbiology

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Potential vector of Culex tritaeniorhynchus for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) transmission

Article Type: Research Paper

Section/Category:

Keywords: Mechanical transmission; Mosquitoes; Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV); Pigs

Corresponding Author: Dr. Roongroje Thanawongnuwech, DVM, PhD

Corresponding Author's Institution: Chulalongkorn University

First Author: Kidsadagon Pringproa, DVM, MS

Order of Authors: Kidsadagon Pringproa, DVM, MS; Sudchit Chungpivat, BS, MS; Rapee Panyathong, DVM, MS; Roongroje Thanawongnuwech, DVM, PhD

Manuscript Region of Origin:

Abstract:

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Title: Potential vector of *Culex tritaeniorhynchus* for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) transmission

Authors: Kidsadagon Pringproa[a,b], Sudchit Chungpivat[a], Rapee Panyathong[a] and Roongroje Thanawongnuwech[a,*]

[a] Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri dunang, Bangkok 10330 Thailand

[b] Present address: Clinic for Food Animal, Faculty of Veterinary Medicine, Chiangmai University, Maehia, Muang, Chiangmai 50100 Thailand

* Corresponding author: Roongroje Thanawongnuwech, DVM., Ph.D.
Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Henri-Dunant Rd., Pathumwan
Bangkok 10330, Thailand
Tel: +662-218-9616; Fax: +662-252-0779.
E-mail address: roongroje.t@chula.ac.th

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

At least, 4 mosquito species, *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex gelidus*, *Anopheles spp*. and *Mansonia uniformis* were identified in a pig farm in Nakorn Pathom, Thailand. Of which, *C. tritaeniorhynchus* was predominant (88.38±7.63%). To determine whether *C. tritaeniorhynchus* could serve as a potential vector for PRRSV transmission, 2 experiments were conducted: the duration of PRRSV within the mosquitoes and the PRRSV transmission from the PRRSV-infected pigs to the naive pigs by infected mosquitoes. PRRSV could be detected in mosquito pooled samples for up to 48 hours post feeding on the PRRSV-infected pig (PFP) using RT-PCR, whereas the PRRSV could be isolated from the mosquito samples for up to 2 hours PFP. The results of PRRSV transmission showed that all naive pigs used in the direct mosquitoes feeding were negative, whereas, the swine bioassay using pooled mosquitoes 30 minutes PFP was positive for PRRSV detection by both RT-PCR and ELISA. The results of this study demonstrated that *C. tritaeniorhychus*, a predominant mosquito species found in a pig farm in Thailand, was able to transmit PRRSV mechanically and was likely to serve as a potential vector for PRRSV transmission in the PRRSV-positive pig farms.

Keywords: Mechanical transmission; Mosquitoes; Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV); Pigs

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. Introduction

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) caused by PRRS virus (PRRSV), is one of the most economically devastating diseases of the pig industry today. PRRSV affects pigs of all ages causing poor conception rate, late - term abortion, stillborn and weak live-born pigs, post-weaning pneumonia and increase in mortality rate in nursery pigs. PRRSV has emerged in the late 1980s resulting in reproductive failure and respiratory disease of infected pigs in the North America and Europe (Albina, 1997) and later in Asia (Saito et al., 1996). The first retrospective report of PRRSV infection in Thailand revealed that Thai pigs had seroconversion to PRRSV since 1989 and the genomic organization of the first isolate was similar to the US genotype (Damrongwatanapokin et al., 1996). Later, both US and EU genotypes were reported in Thailand (Thanawongnuwech et al., 2004).

PRRSV is a small, enveloped RNA virus and is classified as a member of the genus *Arterivirus*, family Arteriviridae in the order Nidovirales. Other viruses in the genus *Arterivirus* are Lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) of mice, equine arteritis virus (EAV), and simian hemorrhagic fever virus (SHFV) (Yoon, 2002). The Arterivirus process common biological properties, including primary replication in host macrophages and establishment of asymptomatic persistent infection in the host (Yoon, 2002). Currently, known routes of PRRSV transmission are direct contact, contaminated semen, contaminated needles, fomites, insect vectors and mammary secretion and transplacental infection as well as airborne transmission (Rossow, 1998; Wagstrom et al., 2001). In addition, previous reports found that some insects such as houseflies (*Musca domestica* Linnaeus) and mosquitoes (*Aedes vaxans*) could serve as mechanical vectors for PRRSV transmission (Otake et al., 2003a,b). These reports also indicated that the infectious PRRSV could survive in the intestinal tract of

mosquitoes for up to 6 hours following the feeding on an infected pig. Those findings also suggested that PRRSV did not replicate within the mosquitoes to establish a sufficient concentration of the virus during the 14-days incubation period and the mosquitoes, therefore, could not serve as the biological vectors for PRRSV transmission (Otake et al., 2003a).

Since Thailand has differences in the geographical region and variety in mosquito species from the North America, the objectives of this study were to survey mosquito species seen in a pig farm in Nakorn Pathom province, the highest pig raising area in Thailand and to determine whether *C. tritaeniorhynchus* could serve as a potential vector for PRRSV transmission.

2. Materials and methods

2.1. Mosquito survey and mosquito colonization

During March 2004 – February 2005, mosquitoes were captured once a month from a PRRSV-positive pig farm in Nakorn Prathom province, Thailand, using mouth aspirators (Figure 1). The mosquitoes were, then, brought to the Insectary room, Veterinary Parasitology Unit, Chulalongkorn University. Species identification was done using illustrated keys of the medically important mosquitoes of Thailand (Rattanarithikul et.al., 1994), and the number of mosquitoes in each species was counted and recorded. Based on the preliminary study, *C. tritaeniorhynchus* was the predominant mosquito species found in the pig farm. This particular species was used in the following study. The colony of *C. tritaeniorhynchus* was established, and the adults female were maintained with 10% sucrose solution until used.

2.2. Experiment 1: Assessment of the presence of PRRSV within mosquitoes after feeding on a PRRSV- infected pig

Source of mosquitoes: The mosquitoes used in this study were from the established colony of *C. tritaeniorhynchus*. Three to five days old of adult female mosquitoes were starved for 8 hours prior to the study. To ensure the PRRSV-negative status, 50 mosquitoes were randomly selected and tested for the presence of PRRSV using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) (Thanawongnuwech et al., 2004).

Experimental pigs and virus inoculation: Two 3-week-old piglets were purchased from a commercial, PRRSV free herd. Nested multiplex RT-PCR was also done using pooled sera to verify the PRRSV – negative status. Pigs were housed in a separated room in the isolation facility, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University to prevent the cross contamination of the pathogens between groups. After acclimatization for 3 days, a pig in the infected group was inoculated intranasally with 4 ml of the US genotype PRRSV (01NP1) at a concentration of 10^4 $TCID_{50}$/ml as previously described (Talummug et al, 2004). The other group was served as a negative control group. In order to prevent cross contamination of PRRSV between groups, stricted biosecurity measures were implemented.

Experimental design: At 7 Days post infection (DPI), the PRRSV transmission by mosquitoes was performed. The experimental time was selected based on the previous published data indicating peaked PRRS – viremia (Talummug et al., 2004). To allow mosquitoes to feed on the experimental pigs, pigs in both PRRSV-infected group and negative control group were anesthesied with Pentobarbital sodium. Blood sampling from the pigs was also done for viral titration at the same time. The anesthesied pigs were placed upon the mosquito cages, and

mosquitoes then were allowed to feed on each pig through the mesh roof of the cage for at least 30 minutes (Figure 2). A total of 300 engorged female mosquitoes in each group were collected and placed in a new mosquito cages. The full-fed mosquitoes were kept in an insectary room and were given 10% sucrose solution until used.

PRRSV detection from fed mosquitoes was performed using pooled 30 mosquitoes at 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 h and 7 days post feeding on the PRRSV-infected pig (PFP). At each time point, the mosquitoes were knocked with low temperature and pooled in sterile tubes. In order to prevent cross contamination, the exterior surface wash of mosquitoes from pooled samples was done with 1 ml of minimum essential medium (MEM, Hyclone®, Logan, Utah) by centrifuging at 5000 rpm for 1 min and collected. The legs of mosquitoes were removed and placed in a new microcentrifuge tube containing 1 ml of MEM. The mosquito legs were labeled according to each sampling time and tested for the presence of PRRSV by RT-PCR. The remaining pooled mosquitoes were crashed against the tube wall with sterile swab containing MEM and centrifuged at 4500 rpm for 5 min. The supernatants derived from pooled samples were tested for the presence of PRRSV by both RT-PCR and viral isolation (Thanawongnuwech et al., 2004).

2.3. Experiment 2: PRRSV transmission by C. tritaeniorhynchus from a PRRSV-infected pig to the naive pigs

Source of mosquitoes: The mosquitoes used in this study were from the established colony of *C. tritaeniorhynchus*. The mosquitoes were sampled and tested for the presence of PRRSV negative status as mentioned above. Approximately 8 hours prior to the study, the mosquitoes were starved to ensure the feeding success.

Experimental pigs and virus inoculation: Nine 3-week-old piglets were purchased from a commercial, PRRSV-free herd. One pig was served as a donor pig (group A), while others were divided into 4 groups (2 pigs each) as B, C, D and E. Virus inoculation was performed in a donor pig as mentioned before using the same PRRSV inoculum. At day 7 post innoculation, the peaked PRRS–viremia was expected, and the experiment was conducted.

Experimental design: At day 7 post PRRSV inoculation, the PRRSV-infected pig (group A) was anesthesized with Pentobarbital sodium, blood sampling was performed and the mosquitoes were allowed to feed on the infected pig. During feeding on the infected pigs, the mosquitoes were interrupted and the total of 150 mosquitoes were collected and placed in a new small plastic cage. A total of 4 small plastic cages of mosquitoes were placed in the humidity incubation room. The attempts of PRRSV transmission by mosquitoes were performed in pigs in group B to E at appropriated time as mentioned below.

Approximately 30 minutes PFP, a total of 100 mosquitoes were allowed to feed on pig number 1 (group B) similar to the donor pigs. A pooled sample of 50 remaining mosquitoes was tested for the presence of infectious PRRSV using swine bioassay by intramuscular injection of the grounded filtered mosquitoes into the pig as described by Stewart et al. (1975). Similarly, the other 3 small plastic cages containing partially fed mosquitoes, were allowed to feed on the recipient pigs in group C, D and E at 6, 24 hours and 7 days PFP, respectively.

Blood sampling was done on those pigs at 3, 5, 7, 9 and 11 days after contacting with the mosquitoes and tested for the presence of PRRSV by both RT-PCR and ELISA. At day 14 after contacting with the mosquitoes, the animals were euthanized with pentobarbital sodium and necropsied. Samples from lungs, lymph

nodes and bronchial alveolar larvage fluid were collected and tested for the presence of PRRSV by both RT-PCR and virus isolation (Thanawongnuwech et al., 2004). Lungs and lymph nodes of all pigs were also tested with immunohistochemistry (Laohasittikul et al., 2004) for the presence of PRRSV antigen using SDOW-17 (Kindly provided by Dr. E. Thacker, Iowa State University, Ames, Iowa).

3. Results

3.1. Mosquito surveys

The results of mosquito survey from a pig farm in Nakorn Pathom Province, Thailand during March 2004 to February 2005 were shown in Table 1. The total number of mosquitoes collected by approximately 6 peoples in each month was demonstrated and the mosquitoes were identified as *C. tritaeniorhynchus* (88.38±7.63%), *C. gelidus* (9.17±8.50%), *Anopheles spp.* (2.26±1.42%). and *M. uniformis* (0.19±0.15%). The mosquito population was highest in October (Table 1), which is during the rainy season (June-November) in Thailand.

3.2. Experiment 1: Assessment of the presence of PRRSV within the mosquitoes post feeding on the PRRSV-infected pig (PFP)

On day 7 post infection, PRRS-viremia was demonstrated in the infected pigs and yielded a viral titer at $10^{2.70}$ $TCID_{50}$/ml. The PRRSV detection from mosquito samples was summarized in Table 2. Pooled mosquito legs and pooled washing fluid from exterior surface of the mosquito samples were tested negative for PRRSV by RT-PCR. The mosquito pooled samples from the samples at 0 to 48 hours PFP were tested positive for PRRSV by RT-PCR, whereas virus isolation was able to detect the infectious PRRSV from mosquito pooled samples only at 0 and 2 hours PFP.

3.3. Experiment 2: PRRSV transmission by C. tritaeniorhynchus from a PRRSV-infected pig to the naive pigs

The donor pig had PRRS-viremia at the time of mosquitoes feeding on day 7 post infection with the virus titer of $10^{2.23}$ $TCID_{50}$/ml. On day 14 after contacting with infected mosquitoes or injected with homogenized mosquitoes, all recipient pigs were euthanized and necropsied. Only the recipient pig from group B (30 minutes PFP) or swine bioassay group was positive for PRRSV, detected by ELISA, RT-PCR and virus isolation. This particular swine bioassay had seroconversion to PRRSV on day 10 post infection. PRRSV was isolated from serum of this pig when necropsied at day 14 post injection. Likewise, RT-PCR demonstrated positive results in all tissues tested (Table 4). Immunohistochemistry could not demonstrate any PRRSV antigen in the tissues of all pigs. It is suggested that immunohistochemistry is less sensitive than the RT-PCR or the virus isolation. These findings agree with the previous report that RT-PCR and virus isolation are more sensitive than the immunohistochemistry (Benson et al., 2002).

4. Discussion

The results of this study strongly suggested that *C. tritaeniorhynchus*, a predominant mosquito species seen in a pig farm in Thailand, could serve as a potential mechanical vector for PRRSV. However, the role of *C. gelidus, Anopheles* spp. and *M. uniformis* in PRRSV transmission is needed since these species were also regularly seen in a pig farm. It should be noted that the results of this study were similar to the previous report in Malaysia that *C. tritaeniorhynchus* was the predominant mosquito specie found in the pig farms following by *C. gelidus*, *Anopheles* spp. and *Mansoia spp*., respectively (Vythilingam et al., 1994). Since, it

has been reported that *C. tritaeniorhynchus* has a preference on pigs more than humans (Macdonald et al., 1967), *C. tritaeniorhynchus* could play a major role in mosquito borne disease in pigs.

In experiment 1, we confirmed our preliminary report that PRRSV could be detected from the mosquito pooled samples (*C. tritaeniorhynchus*) for up to 48 hours PFP by RT-PCR. No evidence of virus multiplication in the mosquitoes was detected over 14 days PFP. In general, the positive for RT-PCR indicated the presence of genetic materials of PRRSV, but it does not necessary indicating the presence of the infectious virus (Benson et al., 2002; Yoon and Stevenson, 2002). Therefore, we confirmed the presence of infectious PRRSV by virus isolation. Interestingly, the results of our study showed that the infectious virus was able to survive in the mosquitoes (*C. tritaeniorhynchus*) for up to 2 hours PFP. None of the mosquito pooled samples at 4, 6, 12, 24, 48, 72 hours, 7 or 14 days PFP were tested positive. Since the extrinsic incubation periods of mosquito-borne viruses were approximately 5 to 14 days post feeding on the infected animals (Stewart et al., 1975; Beerntsen et al., 2000), it should be noted that PRRSV replication did not occur within the particular mosquitoes (*C. tritaeniorhynchus*).

However, the previous report found that PRRSV persisted within the gut of mosquitoes (*An. vaxans*) for up to 6 hours PFP (Otake et al, 2003a). One possible explanation is the difference in mosquitoes species used in the study, which may lead to the different capabilities in carrying pathogens (Beerntsen et al., 2000). Moreover, it should be noted that, the differences of PRRS-viremia in each experiment might lead to the differences in viral load and survival time of the virus within the mosquitoes. In addition, several reports indicated that PRRSV titers of the PRRSV-

infected pigs were varied depending either on the pig age (Thanawongnuwech et al., 1998) or on the strains of PRRSV (Johnson et al., 2004).

The presence of infectious PRRSV for a longer time period inside the mosquitoes may represent the possible status of being a biological vector for PRRSV, since the character of the biological vector of mosquito-borne virus is determined by the extrinsic incubation period. The extrinsic incubation period is variable depending on the genetic of the viruses, the initial dose of the viruses, the mosquito species and the environmental temperatures (Meller, 2000). Moreover, the replication of the virus within the mosquitoes before reaching a sufficient viral titer and the presence of the virus in hemocoel are the major characteristics of the biological vector (Beerntsen et al., 2000). However, this study demonstrated that there was no evidence of the PRRSV in the legs of the mosquitoes tested by RT-PCR or the inability to detect PRRSV several days PFP. Therefore, our study suggested that *C. tritaeniorhynchus* could not serve as a biological vector for PRRSV transmission.

During the experiment, it was essential to minimize the risk of cross contamination of PRRSV by plastic containers or contaminated mosquitoes, since it has been reported that PRRSV could be detected from the contaminated containers during the warm and moist condition (Dee et al., 2003). In this study, the contamination was minimized by using new plastic containers at each step, and the contaminated mosquitoes were tested using the washing fluid from the exterior surface of the mosquitoes. No PRRSV contamination was observed in this study. In conclusion, our study suggested that the infectious PRRSV could not survive within mosquitoes for longer than 2 hours and again *C. tritaeniorhynchus* could not serve as a biological vector for PRRSV transmission.

In experiment 2, we demonstrated whether the mosquitoes were able to transmit the infectious PRRSV from the donor pigs to the naive pigs at different time points. In order to perform this experiment, swine bioassay was also done along with the mosquito feeding protocol. The results of this study showed that only the pig in group B (30 minutes PFP) was tested positive for PRRSV by the swine bioassay. Swine bioassay is considered to be the most sensitive test for PRRSV detection (Benson et al., 2002), and only 10 or fewer infectious PRRSV particles either by intranasal or by intramuscular route is sufficient to cause infection (Yoon et al., 1999). The PRRSV positive swine bioassay indicated that the virus could survive within the mosquitoes for up to 30 minutes PFP. In contrast to the swine bioassay, the pigs used for the mosquito feeding protocol did not have PRRSV tested by either ELISA or RT-PCR at all times. It indicated that the mosquitoes, *C. tritaeniorhynchus,* used in this study were unlikely to transmit PRRSV mechanically in this experiment or even in the field condition. However, it is possible that the PRRSV titers of the infected donor pigs did not exceed the thresholds of infection or the number of mosquitoes used in this study did not reach the threshold for mechanical transmission. Since the success of the mechanical transmission depends on the virus concentration in the mouthpart of the mosquitoes (Webb et al., 1989), the higher number of mosquitoes used in the experiment the more susceptible of recipient pigs to the infection is expected.

According to the results in experiment 1, the viability of PRRSV was demonstrated within the mosquitoes for up to 2 hours PFP when tested by virus isolation. However, the results of the experiment 2 showed that PRRSV remained infective only 30 minutes PFP, while the previous study had 6 hours positive for swine bioassay (Otake et al., 2003a). During 30 minutes to 6 hrs, PRRSV in this study might not survive due to many factors such as lower titer in the viremic pig or

the differences in the mosquito species or the higher environmental temperatures (Yoon and Stevenson, 2002) especially in Thailand.

PRRSV could be isolated only from the serum of the B2 pig (30 minutes PFP), whereas the results of virus isolation from bronchial alveolar larvage fluid, lungs and lymph nodes remained negative at necropsy. In young pigs, viremia persists for a longer period, and PRRSV is more stable in the serum than in the tissues (Yoon and Stevenson, 2002). As a result, the PRRSV isolation from the serum is more sensitive than that of from the tissue samples. In addition, PRRSV persistence may depend on age of the pigs and the stage of infection. Although previous study has shown that PRRSV antigen was detected frequently in the lungs, lymph nodes and tonsils, PRRSV antigen distribution depends on the stage of infection and the viral strains (Halbur et al., 1996).

In summary, our study indicated that *C. tritaeniorhynchus*, a predominant mosquito species found in a pig farm in Nakorn Prathom Province, Thailand, was unable to transmit PRRSV biologically. Although, the inability of *Cu. tritaeniorhynchus* to transmit PRRSV mechanically from the infected donor pig to the susceptible pigs indicated that mosquitoes were unlikely to transmit PRRSV mechanically in the field condition. However, the positive result from the swine bioassay of B2 pig indicated that mechanical transmission could occur and *C. tritaeniorhynchus* could serve as a potential vector for PRRSV transmission in a pig farm. This study suggests that mosquitoes could serve as a low potential mechanical vector for PRRSV transmission in the pig farms. Further studies in other mosquito species are needed. The results could be useful for preventing PRRSV transmission by mosquitoes especially in the PRRSV-negative herds locating in the PRRSV endemic areas along with other strict biosecurity measures.

Acknowledgements

The authors thank Piya Wongyanin, Wannaporn Junhom and Siwaporn Klamklie for laboratory assistant. This study was funded by the Ministry of University Affairs (MUA)-CU thesis grant and The Rachadapiseksompoch Endowment Fund, Chulalongkorn University, Thailand.

References

Albina, E., 1997. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. Vet. Microbiol. 55, 309-316.

Beerntsen, B.T., James, A.A., Christensen, B.M., 2000. Genetics of Mosquitoes vector competence. Micro. Mol. Bio. Review. 64 (1), 115-137.

Benson, J.E., Yaeger, M.J., Hennings, J.C., Lager, K., Yoon, K-J., 2002. A comparison of virus isolation, immunohistochemistry, fetal serology, and reverse-transcription polymerase chain reaction assay for the identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus transplacental infection in the fetus. J. Vet. Diagn. Invest. 14, 8–14.

Damrongwatanapokin, S., Arsayuth, K., Konkrong, C., Parchariyanon, S., Pinyochon, W., Tantaswasdi, U., 1996. Serological studies and isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Thailand. J. Thai Vet. Med. Assoc. 47 (2), 19-31.

Dee, S., Deen, J., Rossow, K., Weise, C., Eliason, R., Otake, S., Joo, H.S., Pijoan, C., 2003. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during warm weather. Can. J. Vet. Res. 67, 12-19.

Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X-J., Lum, M.A., Andrews, J.J., Rathje, J.A., 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. Vet. Pathol. 32, 648-660.

Johnson, W., Roof, M., Christipher-Hennings, J., Johnson, C.R., Murtaugh, M.P., 2004. Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 102, 233-247.

Laohasittikul, P., Boonarpha, N., Pongprapachen, Y., Kesdangskonwut, S., Wangnitham, S., Thanawongnuwech, R., 2004. Antigen distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thai crossbred pigs using immunohistochemistry. Thai J. Vet. Med. 34 (1), 39-48.

Macdonald, W.W., Smitt, C.E.G., Dawson, P.S., Ganapathipillai, A., Mahadevan, S., 1967. Arbovirus infection in Sarawak: Further observations on mosquitoes. J. Med. Entomol. 4, 146-157.

Meller, P.S., 2000. Replication of arboviruses in insect vectors. J. Comp. Pathol. 123, 231-247.

Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C., Pijoan, C., 2003a. Evaluation of mosquitoes, *Aedes vexans*, as biological vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can. J. Vet. Res. 67, 265-270.

Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C., Pijoan, C., 2003b. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*). Vet. Rec. 152, 73-76.

Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., Pijoan, C., 2002. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). Can. J. Vet. Res. 66, 191-195.

Rattanarithikul, R., Panthusiri, P., 1994. Illustrated keys to the medically important mosquitoes of Thailand. Department of Entomology, USA medical Component, AFRIMS, Thailand

Rossow, K.D., 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. Vet. Pathol. 35 (1), 1-20.

Stewart, W.C., Carbrey, E.A., Jenney, E.W., Kresse, J.I., Snyder, M.L., Wessman, S.J., 1975. Transmission of hog cholera virus by mosquitoes. Am. J. Vet. Res. 36 (5), 611-614.

Talummug, S., Ratanaramig, J., Noparatkrailas, N., Kesdaengsakonwut, S., Whangnaitham, S., Thanawongnuwech, R., 2004. Pathogenesis of Thai porcine reproductive and respiratory syndrome virus in weanling pigs. Thai J. Vet. Med. 34 (3), 33-44.

Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit, A., Damrongwatanapokin, S., 2004. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. Vet. Microbiol. 101, 9-21.

Thanawongnuwech, R., Thacker, E.L., Halbur, P.G., 1998. Influence of pig age on virus titer and bactericidal activity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pulmonary intravascular macrophages (PIMS). Vet. Microbiol. 63, 177-187.

Vythilingam, I., Mahadevan, S., Zaridah, M.Z., Ong, K.K., Abdullah, G., Ong, Y.F., 1994. Studies on adult mosquito vectors of Japanese encephalitis in a pig farm in Selangor, Malaysia. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 25 (2), 383-386.

Wagstrom, E.A., Chang, C-C., Yoon, K-J., Zimmerman, J.J., 2001. Shedding of

porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary gland secretions of sows. Am. J. Vet. Res. 62 (12), 1876-1880.

Webb, P.A., Happ, C.M., Maupin, G.O., Johnson, B.J.B., Ou, C-Y., Monath, T.P., 1989. Potential for insect transmission of HIV: Experiment exposure of *Cimex hemipterus* and *Toxorhynchites amboinensis* to human immunodeficiency virus. J. Infec. Dis. 160 (6), 970-977.

Yoon, K.J., 2002. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Virology. In: Morilla, A., Yoon, K.J., Zimmerman, J. (Eds.), Trends in emerging viral infections of swine, Iowa State University Press, pp. 339-346.

Yoon, K.J., Stevenson, G., 2002. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Diagnosis. In: Morilla, A., Yoon, K.J., Zimmerman, J. (Eds.), Trends in emerging viral infections of swine, Iowa State University Press, pp. 347-354.

Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Chang, C.C., Cancel-Tirado, S., Harmon, K.M., McGinley, M.J., 1999. Effect of challenge dose and route on porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) injection in young swine. Vet. Res. 30 (6), 629-638.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Legends

Table 1. Total numbers of mosquito captured and percentage of species identification from a pig farm in Nakorn Pathom Province, Thailand

Table 2. The presence of PRRSV in mosquitoes post feeding on the PRRSV-infected pig (PFP)

Table 3. PRRSV results at necropsy (14 days post PRRSV inoculation)

Figure 1. Mosquito collection using a mouth aspirator

Figure 2. A model for mosquitoes feeding on the PRRSV-infected pig

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 1. Total numbers of mosquito captured and percentage of species identification from a pig farm in Nakorn Pathom Province, Thailand

Month	Number of mosquitoes	Species identification			
		Ct	*Cg*	*Anopheles.spp*	*Mn. .uniformis*
March, 04	4,200	78.92 %	19.73 %	1.28 %	0.07 %
April, 04	5,400	93.67 %	0.78 %	5.50 %	0.05 %
May, 04	5,400	92.68 %	4.72 %	2.59 %	0.01 %
June, 04	8,000	69.44 %	29.76 %	0.69 %	0.11 %
July, 04	11,600	88.53 %	10.00 %	1.06 %	0.41 %
August, 04	7,600	90.83 %	7.80 %	1.24 %	0.13 %
September, 04	8,200	91.76 %	6.17 %	1.83 %	0.24 %
October, 04	13,400	83.48 %	15. 00 %	1.15 %	0.37 %
November, 04	8,800	89.04 %	7.50 %	3.41 %	0.05 %
December, 04	4,400	95.75 %	1.73 %	2.07 %	0.45 %
January, 05	5,400	91.95 %	3.81 %	3.96 %	0.28 %
February, 05	9,400	94.48 %	3.06 %	2.34 %	0.12 %
Total	91,800	88.38 %	9.17 %	2.26 %	0.19 %

Ct = Culex tritaeniorhynchus *Cg = Culex gelidus*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 2. The presence of PRRSV in mosquitoes post feeding on the PRRSV-infected pig (PFP)

Time post feeding on the infected-pig	RT-PCR			VI
	Whole body	Legs	Washing fluid	
0 hr	+ ve	- ve	- ve	+ ve
2 hr	+ ve	- ve	- ve	+ ve
4 hr	+ ve	- ve	- ve	- ve
6 hr	+ ve	- ve	- ve	- ve
12 hr	+ ve	- ve	- ve	- ve
24 hr	+ ve	- ve	- ve	- ve
48 hr	+ ve	- ve	- ve	- ve
72 hr	- ve	- ve	- ve	- ve
7 days	- ve	- ve	- ve	- ve
4 days	- ve	- ve	- ve	- ve

RT-PCR = nested multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction
Legs = leg of mosquitoes (pooled sample)
VI = virus isolation from homogeneous mosquito pooled sample

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 3. PRRSV results at necropsy (14 days post PRRSV inoculation)

Group	PCR			VI			IHC
	serum	BAL	organs	serum	BAL	organs	
30 min. pf							
B1	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve
B2	+ ve	+ ve	+ ve	+ ve	- ve	- ve	- ve
6 hours. pf							
C1	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve
C2	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve
24 hours. pf							
D1	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve
D2	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve
7 days. pf							
E1	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve
E2	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve	- ve

pf = time post feeding
RT-PCR = nested multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction
VI = virus isolation
IHC = immunohistochemistry
ELISA = enzyme linked immunosorbent assay
BAL = bronchial alveolar larvage fluid, Organs = lymph nodes and lungs

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure

Click here to download high resolution image

Figure

Click here to download high resolution image