



การวิเคราะห์โครงร่างปีกเพื่อจำแนกชนิดและเพศของยุงพาหะนำโรค ในพื้นที่หมู่บ้านห้วยน้ำหนัก อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี

เศรษฐพงศ์ เหล่าจันทร์¹, ธนวัฒน์ ชัยพงศ์พัชรา²

สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา¹

อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา²

E-mail: sedtaponglaojun@gmail.com¹

บทคัดย่อ

ยุงเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุขเป็นพาหะนำโรคมานาน การควบคุมยุงพาหะแต่ละชนิดแตกต่างกันไปตามพฤติกรรมและแหล่งอาศัย การจำแนกชนิดของยุงมักเกิดปัญหาเนื่องจากยุงพาหะบางชนิดมีสายพันธุ์ที่ซับซ้อนและบางชนิดก็มีรูปร่างที่เหมือนกันมาก ซึ่งการจำแนกโดยวิธีปกตินี้ทำได้ยากลำบากทำให้เกิดปัญหาความผิดพลาดขึ้นและส่งผลทำให้เกิดความล้มเหลวในการควบคุมพาหะในพื้นที่ต่างๆ ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีเข้ามาช่วยในการแก้ปัญหามากมาย รวมทั้งวิทยาการที่ทันสมัยในการจดจำและจำแนกวัตถุหรือสิ่งมีชีวิตเริ่มมีการนำมาประยุกต์ใช้ ซึ่งงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคสมัยใหม่ในการวิเคราะห์โครงร่างปีกมาทดลองใช้ในการแก้ปัญหา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดและเพศของยุงพาหะนำโรคในพื้นที่หมู่บ้านห้วยน้ำหนัก อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ในช่วงปลายฤดูฝน เดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2560 การวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้ยุงทั้งหมด 362 ตัว ประกอบไปด้วย ยุงก้นปล่อง 2 ชนิด ได้แก่ *Anopheles barbirostris* (van der Wulp) 48 ตัว และ *An.subpictus* (Grassi) 125 ตัว ยุงรำคาญ 3 ชนิด ได้แก่ *Culex quinquefasciatus* (Say) 22 ตัว *Cx.whitmorei* (Giles) 65 ตัว *Cx.vishnui* (Theobald) 24 ตัว ยุงลาย 2 ชนิด ได้แก่ *Aedes aegypti* (L.) 58 ตัว และ *Ae.albopictus* (Skuse) 20 ตัว ผลการทดลองพบว่า ปัจจัยด้านขนาดและรูปร่างเกือบทุกชนิดมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการวิเคราะห์โครงร่างปีกมีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกกลุ่มของยุงก้นปล่องพาหะนำโรคมาลาเรีย ซึ่งอยู่ในช่วง 84-91% รองลงมา คือ ยุงรำคาญพาหะนำโรคไข้สมองอักเสบและโรคเท้าช้าง ที่อยู่ในช่วง 63-83% แต่อาจไม่ค่อยดีนักสำหรับยุงลายพาหะนำโรคไข้เลือดออกและไข้ช้ำงา สิ่งนี้เป็นหลักฐานสำคัญที่แสดงว่าการวิเคราะห์นี้สามารถนำไปช่วยในการจำแนกชนิดยุงก้นปล่องในประเทศไทยได้และสามารถนำไปพัฒนาเป็นโปรแกรมสำเร็จรูป (ทั้งในระบบมือถือและคอมพิวเตอร์) ที่ใช้หลักการนี้ไปวิเคราะห์ภาพปีก ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะนำไปสู่การควบคุมยุงพาหะได้อย่างมีประสิทธิภาพ นำไปสู่การลดจำนวนของผู้ป่วยจากโรคติดต่อที่นำโดยยุงในพื้นที่ต่างๆ ต่อไป

คำสำคัญ : การวิเคราะห์โครงร่างปีก, การจำแนกชนิด, เทคนิคสัณฐานวิทยาสมัยใหม่, ยุงพาหะนำโรค



Outline-based geometric morphometric analysis for Identification of mosquito vectors in Huay nam nak Village of Ratchaburi province

Sedtapong Laojun¹, Tanawat Chaiphongpachara²

Public health College of Allied Health Sciences, Suan Sunandha Rajabhat University, Thailand¹

Lecturer, Department of Health Science, College of Allied Health Science, Suan Sunandha Rajabhat University²

E-mail: sedtaponglaojun@gmail.com ¹

ABSTRACT

Mosquito is important medical insect that transmit many disease to human especially in tropical and subtropical region. Each species of mosquito has different biology, behaviour, breeding site and epidemiological characteristics, which these information are useful in order to be the basis for planning to control the vector to suit species of mosquito in the area. Mosquito vector identification by morphological characteristic in the field has many obstacles because many mosquito species have similar morphology, cryptic species, sibling species and isomorphic species. Outline-based geometric morphometric or modern morphometric is a technique to analyze shape and size. This research was study of outline-based of GM technique to separate species of mosquito in Huay nam nak Village as mosquito-borne diseases endemic area, Ratchaburi province, Thailand. Mosquito samples from collection in a field found *Anopheles barbirostris* (van der Wulp), *An.subpictus* (Grassi), *Culex quinquefasciatus* (Say), *Cx.whitmorei* (Giles), *Cx.vishnui* (Theobald), *Aedes aegypti* (L.) and *Ae.albopictus* (Skuse) which the total is 362 individuals. The results shown Outline-based geometric morphometric approaches can use identification in this area which are highly effective in *Anopheles* spp. For *Aedes* spp. as dengue vectors, it is not very effective but it can be used in some species. This technique has advantages including ease of use, low cost and quickness. It is very useful to use in the field which led to the successful way to control mosquito vectors.

Keywords: Outline-based analysis, identification, geometric morphometric, mosquito vector



บทนำ

ยุงเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข เนื่องจากเป็นพาหะนำโรคมามากมายมาสู่มนุษย์^{1,2} เช่น ยุงลาย (*Aedes spp.*) นำโรคไข้เลือดออกและไข้ชิก้า ยุงก้นปล่อง (*Anopheles spp.*) นำโรคมาลาเรีย ยุงรำคาญ (*Culex spp.*) นำโรคเท้าช้างและโรคไข้สมองอักเสบเจอี พบได้เกือบทุกภูมิภาคของโลก ยกเว้นในพื้นที่หนาวจัด มีรายงานว่าทั่วโลกมียุงมากกว่า 4,000 ชนิด ซึ่งยุงแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ทั้งพฤติกรรม นิเวศวิทยา ความไวต่อการรับเชื้อ ความเป็นพาหะ และความต้านทานต่อสารเคมีกำจัด³ ปัจจุบันโรคที่เกิดจากยุงจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยเช่นเดียวกัน จากข้อมูลการเฝ้าระวังโรคติดต่อโดยแมลงของกระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย ปี พ.ศ. 2559 มีผู้ป่วยจากโรคที่เกิดจากยุงพาหะเป็นจำนวนมาก ประมาณกว่า 2 แสนคน ซึ่งส่วนใหญ่ป่วยด้วยโรคไข้เลือดออกและมาลาเรีย⁴

การควบคุมยุงพาหะแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันไปตามพฤติกรรมและแหล่งอาศัย ดังนั้นการควบคุมพาหะที่มีประสิทธิภาพ ขั้นต้นเราต้องทราบถึงชนิดของยุงพาหะ อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดของยุงมักเกิดปัญหาเนื่องจากบางชนิดมีสายพันธุ์ที่ซับซ้อนและบางชนิดมีรูปร่างที่เหมือนกันมาก ซึ่งการจำแนกโดยวิธีปกตินั้นทำได้ยากลำบาก² สำหรับวิธีปกติหรือวิธีมาตรฐานซึ่งใช้คู่มือเทียบกับตัวอย่างทำให้เกิดปัญหาความผิดพลาดขึ้นได้ง่ายและส่งผลทำให้เกิดความล้มเหลวในการควบคุมพาหะในพื้นที่ต่างๆ แม้ปัจจุบันได้มีการนำวิธีทางอนุชีววิทยา

เข้ามาช่วย ซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้องสูงแต่ก็มีค่าใช้จ่ายที่สูงมากตามไปด้วยไม่เหมาะกับการประยุกต์ใช้ในภาคสนาม³

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีเข้ามาช่วยในการแก้ปัญหามากมาย วิทยาการที่ทันสมัยในการจดจำและจำแนกวัตถุ ซึ่งสำหรับสิ่งมีชีวิตก็เริ่มมีการนำมาประยุกต์ใช้ เช่น มอร์โฟเมตริกส์ (morphometrics) เป็นเทคนิคหนึ่งในการศึกษา ลักษณะสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการเปรียบเทียบเชิงปริมาณโดยใช้หลักการทางคณิตศาสตร์มาประยุกต์ โดยเทคนิคนี้สามารถอธิบายและเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความคลุมเครือใกล้เคียงกันหรือซับซ้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁵ ซึ่งมันมีความเป็นไปได้ที่จะนำเทคนิคเหล่านี้มาใช้ในการแก้ปัญหาที่ยากต่อการจำแนกชนิด สัณฐานวิทยาสมัยใหม่หรือสัณฐานวิทยาเชิงเรขาคณิตเป็นเทคนิคที่ได้มีการนำมาใช้แก้ปัญหาการจำแนกสิ่งมีชีวิตหรือวัตถุต่างๆ^{6,7} มีข้อดีคือการที่ใช้จ่าย มีราคาถูกและเป็นที่ยอมรับในด้านการวิจัย การทำงานจะใช้หลักการเชิงเรขาคณิตในการวิเคราะห์ อธิบายและเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะโครงสร้างของสิ่งมีชีวิต ปัจจุบันวิธี Landmark ของเทคนิคสัณฐานวิทยาเชิงเรขาคณิต เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับในการนำมาใช้แต่มันมีข้อจำกัดคือสิ่งที่นำมาวิเคราะห์ต้องมีตำแหน่งในการกำหนดจุดที่ชัดเจนและเหมือนกันทุกตัวอย่าง

วิธี Outline หรือการวิเคราะห์โครงร่างก็เป็นอีกหนึ่งวิธีทางสัณฐานวิทยาสมัยใหม่ที่น่าสนใจที่จะนำมาแก้ปัญหานี้⁸ โดยใช้เพียงลักษณะโครงร่างใน



การวิเคราะห์ ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้นำวิธีนี้มาใช้ จำแนกยุงลายในประเทศไทยและพบว่าสามารถ จำแนกได้ดี⁵ แต่สำหรับยุงสายพันธุ์อื่นๆยังไม่มีการ นำวิธี Outline มาทดสอบในประเทศไทย

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำเทคนิคสัณฐานวิทยา สมัยใหม่ด้วยวิธีการวิเคราะห์โครงสร้างมาใช้ในการ จำแนกชนิดและเพศ ของยุงพาหะในพื้นที่การ ระบาดของโรคมาลาเรีย ณ หมู่บ้านห้วยน้ำหนัก ตำบลตะนาวศรี อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ซึ่งผล ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้เป็นแนวทางใหม่ในการจำแนก ชนิดของยุงพาหะในพื้นที่ของประเทศไทยและ นำไปสู่การพัฒนาโปรแกรมสำเร็จรูปในการจำแนก ชนิดและเพศของยุงพาหะจากภาพถ่ายเพื่อใช้ในการ ควบคุมป้องกันปัญหาที่เกิดจากยุงพาหะทาง สาธารณสุขอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

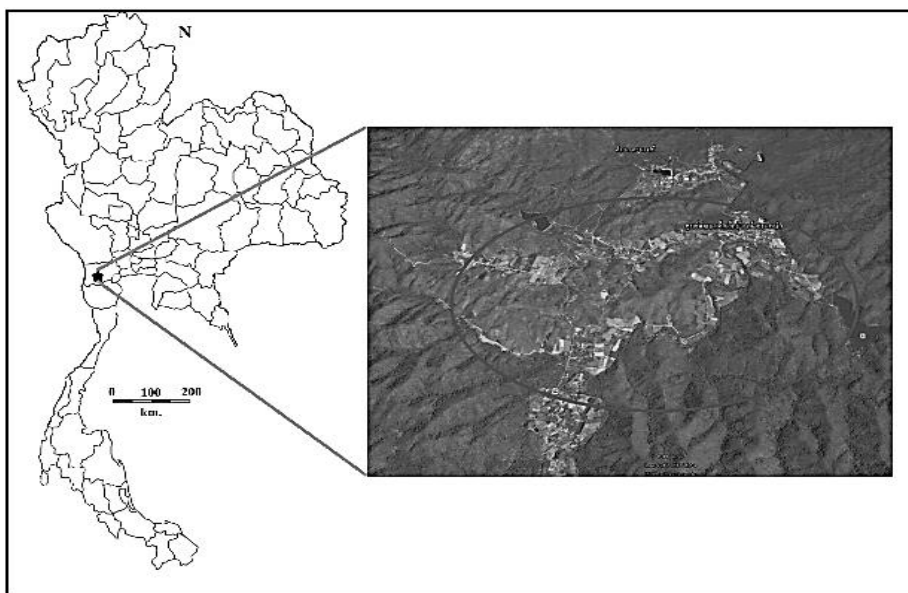
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการจำแนกชนิด และเพศของยุงพาหะนำโรคในพื้นที่หมู่บ้านห้วย น้ำหนัก ตำบลตะนาวศรี อำเภอสวนผึ้ง จังหวัด ราชบุรีด้วยวิธีการวิเคราะห์โครงสร้างปีกหรือวิธี Outline ของเทคนิคสัณฐานวิทยาเชิงเรขาคณิต

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บรวบรวมยุงพาหะนำโรค

รวบรวมกลุ่มตัวอย่างยุงพาหะจากหมู่บ้าน ห้วยน้ำหนัก ตำบลตะนาวศรี อำเภอสวนผึ้ง ซึ่งเป็น หมู่บ้านที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียมากที่สุดของ จังหวัดราชบุรี (ภาพที่ 1) อ้างอิงจากข้อมูลของ สาธารณสุขจังหวัดราชบุรีในปี 2559 โดยการเก็บ รวบรวมตัวอย่างได้โดยใช้กับดัก Black light trap ในช่วงเวลาเย็นถึงรุ่งเช้า 18.00 น. – 06.00 น. และ การดักจับตัวอ่อนยุงในแหล่งน้ำจำนวน 20 จั๋ง (Dip) ต่อแหล่งน้ำในช่วงเวลาเช้า 08.00 น. – 10.00 น. ดำเนินการทุกวันในช่วงปลายฤดูฝน เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2560 ตัวอย่างที่รวบรวมมาได้นั้นถูกส่งต่อไปใน ห้องปฏิบัติการ วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัย ราชภัฏสวนสุนันทา ศูนย์การศึกษาจังหวัด สมุทรสงคราม เพื่อจำแนกชนิดและเพศของยุงพาหะ ตัวเต็มวัยโดยใช้คู่มือ Illustrated key to the mosquitoes of Thailand⁹ โดยตัวอย่างยุงตัวเต็ม วัยที่ได้รับมาต้องถูกเก็บมาไม่นานเกิน 2 สัปดาห์ เนื่องจากตัวอย่างอาจไม่สมบูรณ์ได้รับความเสียหาย หรืออาจมีราเกิดขึ้นทำให้ไม่สามารถจำแนกได้ถูกต้อง ขณะที่ลูกน้ำนั้นเรานำมาเลี้ยงให้เป็นตัวเต็มวัยก่อน และนำไปจำแนกชนิดของยุงพาหะนำโรคทาง สัณฐานวิทยาต่อไป



ภาพที่ 1 พื้นที่การศึกษา หมู่บ้านห้วยน้ำหนัก จังหวัดราชบุรี

การเตรียมตัวอย่างยุงพาหะสำหรับการวิเคราะห์

นำตัวอย่างยุงพาหะมาตัดปีกเพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมฐานวิธานสมัยใหม่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สตอริโอ (Nikon Corp., Tokyo, Japan) ซึ่งตัวอย่างต้องมีสภาพที่ดีไม่มีการฉีกขาดของปีกกลดต่าง ๆ มีความสมบูรณ์ เริ่มแรกผ่าเอาปีกด้านขวาของยุงออกจากลำตัวแล้วนำมาวางบนสไลด์ที่ทำการหยดน้ำยา Hoyer's medium ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์พร้อมกับระบุชนิดของยุงและเพศ จากนั้นนำไปบันทึกภาพปีกของยุงพาหะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงปกติ (Nikon Corp., Tokyo, Japan, under 40x magnification) เชื่อมกับกล้องถ่ายภาพดิจิทัลผ่านโปรแกรม NIS-Elements พร้อมลงสเกล ซึ่งภาพที่ได้นำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมฐานวิธานสมัยใหม่ต่อไป

การจำแนกชนิดและเพศของยุงพาหะนำโรคด้วยวิธีการวิเคราะห์โครงร่าง

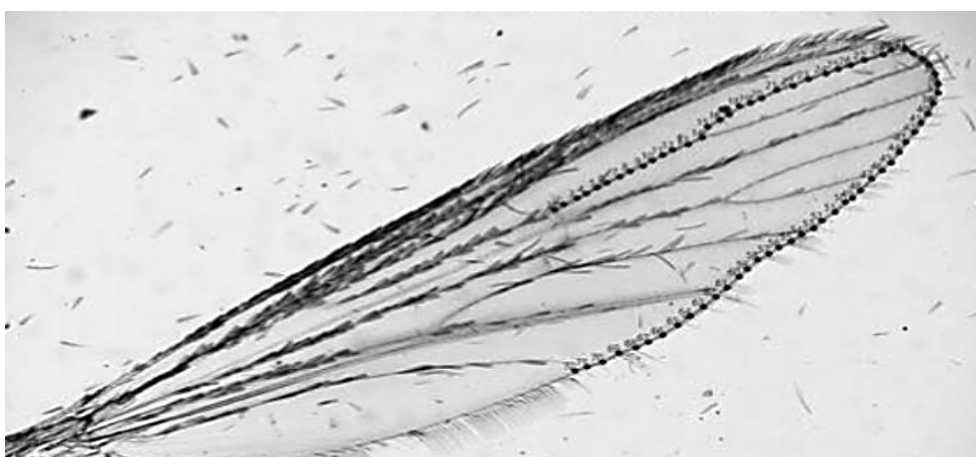
การวิจัยนี้ได้ใช้โปรแกรมฐานวิธานสมัยใหม่ CLIC (Collection of Landmarks for Identification and Characterization) ในการวิเคราะห์ ซึ่งได้พัฒนาโดย Prof. Jean-Pierre Dujardin ซึ่งเป็นฟรีโปรแกรมสามารถดาวน์โหลดได้ที่ <http://mome-clic.com>

การวิเคราะห์ได้นำข้อมูลภาพปีกที่ถ่ายไว้เข้า module COO เพื่อทำการกำหนดโครงร่างปีกของแต่ละตัวอย่าง (ภาพที่ 2) จากนั้นตรวจสอบความคลาดเคลื่อนของจุดกำหนดที่ได้ลงไว้ ซึ่งถ้าตรวจพบความคลาดเคลื่อนต้องดำเนินการกลับไปแก้ไขใหม่และหากไม่สามารถแก้ไขได้ต้องตัดตัวอย่างนั้นออกจากการวิเคราะห์ จากนั้นนำข้อมูลเข้า



module TET เพื่อเตรียมข้อมูลในการวิเคราะห์ แล้วนำเข้า module FOG ใช้เพื่อวิเคราะห์ปัจจัย โดยใช้ elliptic Fourier analysis จากนั้นใช้ module PAD และ VAR วิเคราะห์ความแตกต่างของรูปร่างและขนาดของยุงพาหะ เมื่อได้วิเคราะห์ครบทั้ง 5 module นำข้อมูลมาวิเคราะห์อีกครั้งเพื่อ

ตรวจสอบความถูกต้องในการจำแนกชนิดจากวิธีการวิเคราะห์โครงร่าง (Validated reclassification accuracies) และ นำ ข้อมูล Mahalanobis distances ที่ได้จากการวิเคราะห์รูปร่างมาสร้างแผนผังต้นไม้ทางสัณฐานวิทยา



ภาพที่ 2 ตำแหน่งโครงร่างปีกที่ใช้ในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ได้ใช้ elliptic Fourier analysis และดำเนินการจัดกลุ่มโดยตัวแปรต่างๆ ของรูปร่างโดย Discriminant analysis ของ patial warp และคำนวณค่า Mahalanobis distance เพื่อตรวจสอบความใกล้ชิดในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ส่วนการเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปร่างในแต่ละชนิดและเพศวิเคราะห์โดย non-parametric tests (1000 รอบ) Bonferroni test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยผ่านโปรแกรมสัณฐานวิทยาสมัยใหม่ CLIC

ผลการวิจัย

ปีกยุงที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลมีจำนวนทั้งหมด 362 ปีก ประกอบไปด้วย ยุงก้นปล่อง 2 ชนิด ได้แก่ *Anopheles barbirostris* (van der Wulp) 48 ตัว และ *An.subpictus* (Grassi) 125 ตัว ยุงรำคาญ 3 ชนิด ได้แก่ *Culex quinquefasciatus* (Say) 22 ตัว *Cx.whitmorei* (Giles) 65 ตัว *Cx.vishnui* (Theobald) 24 ตัว ยุงลาย 2 ชนิด ได้แก่ *Aedes aegypti* (L.) 58 ตัว และ *Ae.albopictus* (Skuse) แสดงในตารางที่ 1



ตารางที่ 1 จำนวนยุงพาหะที่ใช้ในการวิเคราะห์จำแนกตามชนิดและเพศ

ชนิดของยุงพาหะ	จำนวนยุงพาหะที่ใช้ในการวิเคราะห์		
	เพศผู้	เพศเมีย	รวม
<i>An.barbirostris</i>	17	31	48
<i>An.subpictus</i>	64	61	125
<i>Cx.quinquefasciatus</i>	0	22	22
<i>Cx.whitmorei</i>	0	65	65
<i>Cx.vishnui</i>	0	24	24
<i>Ae.aegypti</i>	16	42	58
<i>Ae.albopictus</i>	6	14	20
รวม	103	259	362

การวิเคราะห์ขนาดยุงพาหะนำโรค

โครงร่างปีกของยุงแต่ละชนิดได้ถูกคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและพบว่ายุงก้นปล่อง *An.barbirostris* มีขนาดใหญ่ที่สุดโดยเพศเมียมีค่าเฉลี่ย 4.49 ± 0.22 มม. และเพศผู้มีค่าเฉลี่ย 4.24 ± 0.30 มม.

แสดงในตารางที่ 2 ขณะที่ความแตกต่างทางสถิติของโครงร่างปีกของยุงพาหะแต่ละชนิดและเพศพบว่ายุงพาหะส่วนใหญ่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) ยกเว้นคู่ของ *Ae.aegypti* เพศผู้กับ *Ae.albopictus* เพศผู้ ($p=0.75$) และคู่ของ *Ae.albopictus* เพศเมีย และ *An.barbirostris* เพศเมีย ($p=0.62$) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยขนาดโครงร่างปีกของยุงพาหะนำโรคชนิดต่างๆ

วิธี Outline				
ชนิด	เพศ	n	Mean $\pm$ S.D.(มม.)	Min-Max (มม.)
<i>An.barbirostris</i>	ผู้	17	4.24 $\pm$ 0.30	3.67-4.72
	เมีย	31	4.49 $\pm$ 0.22	4.12-4.78
<i>An.subpictus</i>	ผู้	64	3.08 $\pm$ 0.27	2.60-4.43
	เมีย	61	3.39 $\pm$ 0.38	2.91-5.34
<i>Cx.quinquefasciatus</i>	เมีย	22	3.45 $\pm$ 0.54	2.37-4.22
<i>Cx.whitmorei</i>	เมีย	65	3.49 $\pm$ 0.35	2.45-4.05
<i>Cx.vishnui</i>	เมีย	24	3.39 $\pm$ 0.17	3.12-3.64
<i>Ae.aegypti</i>	ผู้	16	3.10 $\pm$ 0.29	2.72-3.76
	เมีย	46	3.74 $\pm$ 0.52	2.74-6.34
<i>Ae.albopictus</i>	ผู้	6	3.17 $\pm$ 0.37	2.65-3.70
	เมีย	14	3.89 $\pm$ 0.19	3.54-4.16



ตารางที่ 3 ความแตกต่างทางสถิติของขนาดปีกยุงพาหะนำโรคจำแนกตามชนิดและเพศ

ความแตกต่างในกลุ่ม ยุงก้นปล่อง	<i>An.barbirostris</i> เพศผู้	<i>An.barbirostris</i> เพศเมีย	<i>An.subpictus</i> เพศผู้	<i>An.subpictus</i> เพศเมีย
<i>An.barbirostris</i> เพศผู้	-			
<i>An.barbirostris</i> เพศเมีย	S	-		
<i>An.subpictus</i> เพศผู้	S	S	-	
<i>An.subpictus</i> เพศเมีย	S	S	S	-
ความแตกต่างในกลุ่ม ยุงรำคาญ	<i>Cx.quinquefasciatus</i> เพศเมีย	<i>Cx.whitmorei</i> เพศเมีย	<i>Cx.vishnui</i> เพศเมีย	
<i>Cx.quinquefasciatus</i> เพศเมีย	-			
<i>Cx.whitmorei</i> เพศเมีย	S	-		
<i>Cx.vishnui</i> เพศเมีย	S	S	-	
ความแตกต่างในกลุ่ม ยุงลาย	<i>Ae.aegypti</i> เพศผู้	<i>Ae.aegypti</i> เพศเมีย	<i>Ae.albopictus</i> เพศผู้	<i>Ae.albopictus</i> เพศเมีย
<i>Ae.aegypti</i> เพศผู้	-			
<i>Ae.aegypti</i> เพศเมีย	S	-		
<i>Ae.albopictus</i> เพศผู้	0.75	S	-	
<i>Ae.albopictus</i> เพศเมีย	S	0.62	S	-

S = มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$)

การวิเคราะห์รูปร่างของยุงพาหะนำโรค

จากการวิเคราะห์โครงร่างทั้งหมดของยุงพาหะทั้ง 3 ชนิด ได้สร้างภาพ 2D เส้นค่าเฉลี่ยโครงร่างที่เชื่อมโยงกันเป็นรูปร่างของปีกยุงพาหะแต่ละชนิดและเพศ ซึ่งจากภาพแสดงให้เห็นความแตกต่างในแต่ละกลุ่ม โดยสังเกตได้จากเส้นค่าเฉลี่ยแต่ละชนิดที่ไม่ซ้อนทับกันระหว่างเส้นในภาพที่ 3 (Overlapping) ขณะที่การจำแนกกลุ่มได้ทำการวิเคราะห์ Outline-based discriminant analysis โดย partial warp ซึ่งได้จัดกลุ่มตามชนิดและเพศ

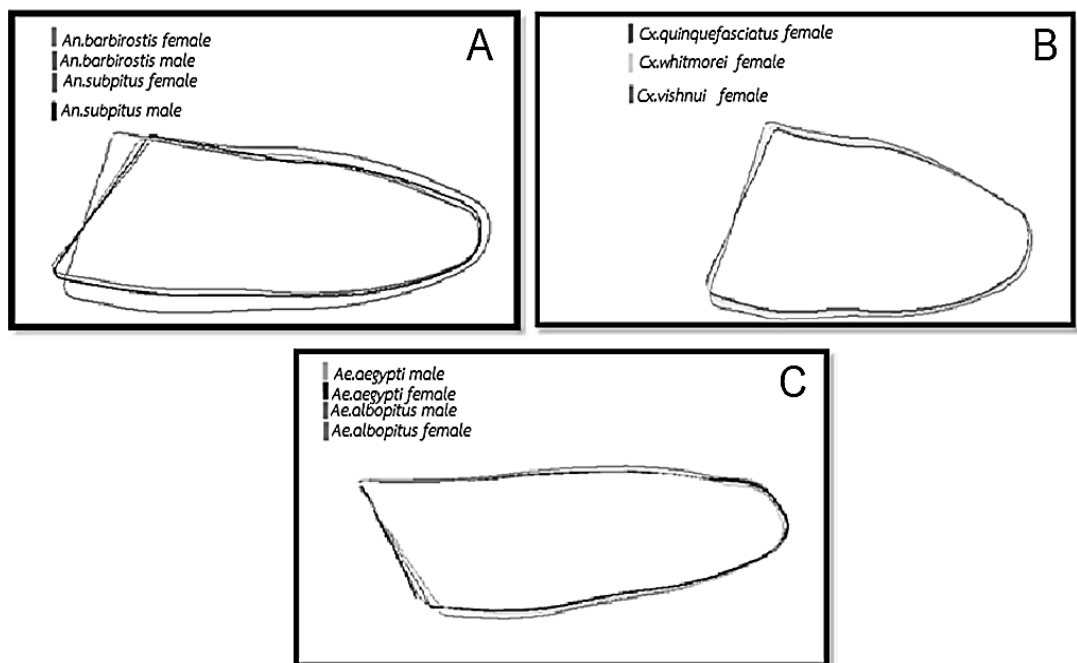
ของยุงพาหะนำโรคให้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาและพบว่าในกลุ่มยุงทั้ง 3 ชนิด (จากภาพที่ 4, A: ยุงก้นปล่อง, B: ยุงรำคาญ, C: ยุงลาย) มีการแยกกลุ่มในแต่ละสายพันธุ์ แต่มีการทับซ้อนกันอยู่ในบางส่วน (ภาพที่ 4)

การวิเคราะห์ความใกล้ชิดกันของรูปร่างของยุงแต่ละชนิดและเพศได้แสดงในค่า Mahalanobis distances ซึ่งถ้ามีค่าต่ำแสดงว่ามีความใกล้ชิดและใกล้เคียงทางรูปร่างมาก โดยค่าน้อยสุดเกิดขึ้นในกลุ่มของยุงลาย คือ *Ae.aegypti* เพศผู้

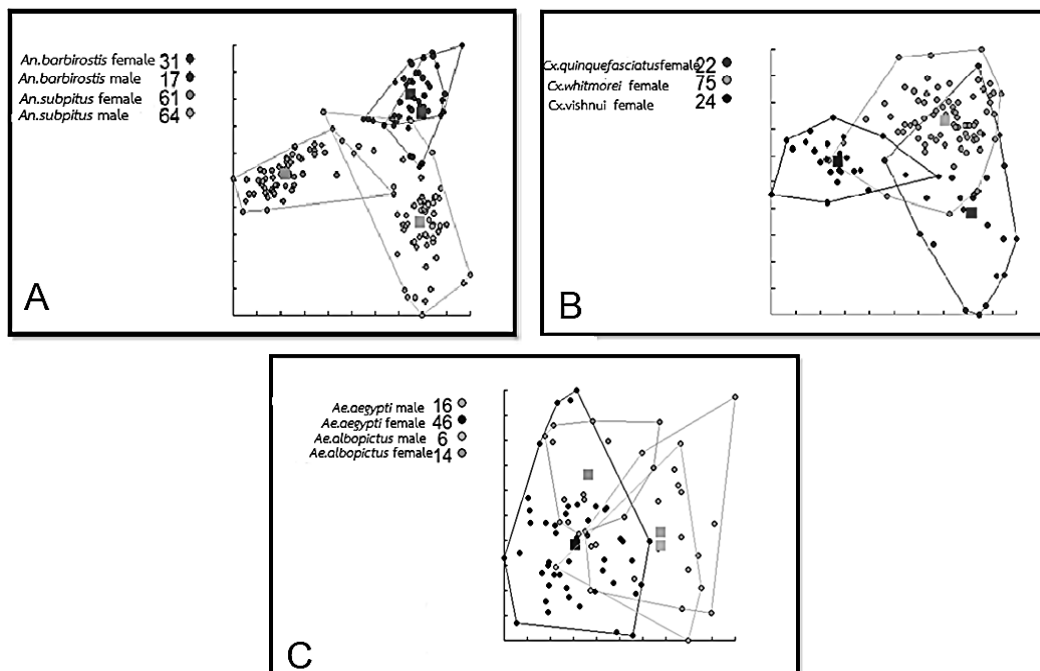


กับ *Ae.albopictus* เพศผู้ (0.29) และค่ามากที่สุดเกิดขึ้นในกลุ่มของยุงก้นปล่อง คือ *An.barbirostris* เพศผู้กับ *An.subpictus* เพศเมีย (6.38) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของ Mahalanobis distances ของรูปร่างปีกยุงพาหะนำโรคในแต่ละชนิดและเพศโดย Non-parametric tests พบว่ายุงพาหะนำโรคเกือบทุกชนิดมีความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$ ยกเว้นคู่ของยุงลาย *Ae.aegypti* เพศผู้กับ *Ae.albopictus* เพศผู้ และคู่ของยุงลาย *Ae.aegypti* เพศเมียบกับ *Ae.albopictus* เพศเมีย (ตารางที่ 4)

การวิเคราะห์ความถูกต้องในการจำแนกชนิดจากวิธีการวิเคราะห์โครงร่าง (Validated reclassification accuracies) พบว่ายุงก้นปล่องสามารถแยกชนิดและเพศได้ชัดเจนมากที่สุด ซึ่งอยู่ในช่วง 84-91% รองลงมาคือยุงรำคาญซึ่งอยู่ในช่วง 63-83% ขณะที่ในกลุ่มยุงลายจำแนกได้ยากที่สุดซึ่งอยู่ในช่วง 0-60% (ตารางที่ 5) สำหรับการความเหมือนและความความใกล้ชิดทางสัณฐานวิทยาในแต่ละกลุ่มชนิดได้นำมาสร้างแผนผังต้นไม้ทางสัณฐานวิทยาแสดงในภาพที่ 5, 6 และ 7

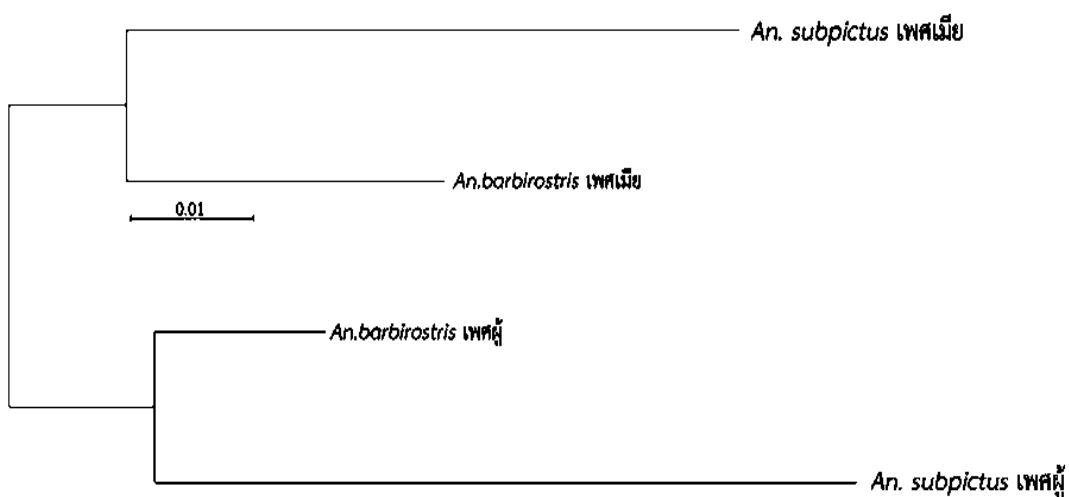


ภาพที่ 3 เส้นค่าเฉลี่ยโครงร่างปีกของยุงพาหะนำโรคในแต่ละกลุ่ม , A: ยุงก้นปล่อง, B: ยุงรำคาญ, C: ยุงลาย

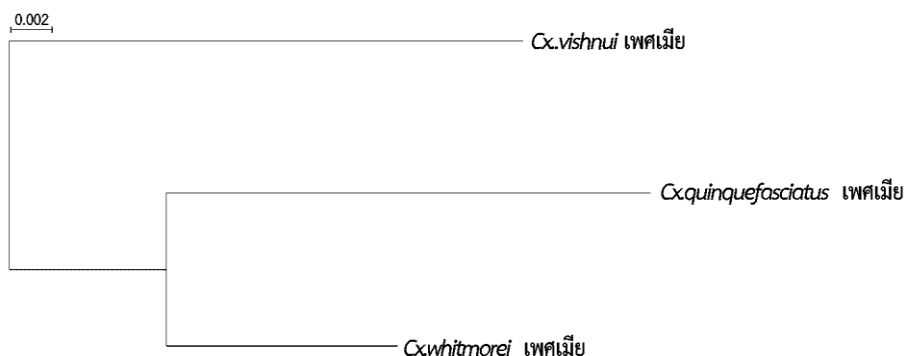


ภาพที่ 4 การจำแนกชนิดและเพศของยุงพาหะนำโรคในแต่ละกลุ่มโดย Discriminant analysis,

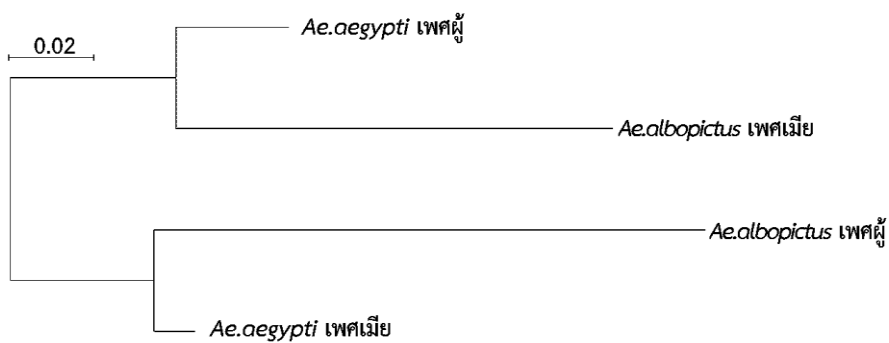
A: ยุงก้นปล่อง, B: ยุงรำคาญ, C: ยุงลาย



ภาพที่ 5 แผนผังต้นไม้ทางสัณฐานวิทยาของยุงก้นปล่อง



ภาพที่ 6 แผนผังต้นไม้ทางสัณฐานวิทยาของยุงรำคาญ



ภาพที่ 7 แผนผังต้นไม้ทางสัณฐานวิทยาของยุงลาย



ตารางที่ 4 ค่า Mahalanobis distances และความแตกต่างทางสถิติจำแนกตามชนิดและเพศของยุงพาหะ

ความแตกต่าง ในกลุ่มยุงก้นปล่อง	<i>An.barbirostris</i> เพศผู้	<i>An.barbirostris</i> เพศเมีย	<i>An.subpictus</i> เพศผู้	<i>An.subpictus</i> เพศเมีย
<i>An.barbirostris</i> เพศผู้	-			
<i>An.barbirostris</i> เพศเมีย	2.93*	-		
<i>An.subpictus</i> เพศผู้	5.96*	6.38*	-	
<i>An.subpictus</i> เพศเมีย	4.15*	4.01*	5.92*	-
ความแตกต่าง ในกลุ่มยุงรำคาญ	<i>Cx.quinquefasciatus</i> เพศเมีย	<i>Cx.whitmorei</i> เพศเมีย	<i>Cx.vishnui</i> เพศเมีย	
<i>Cx.quinquefasciatus</i> เพศเมีย	-			
<i>Cx.whitmorei</i> เพศเมีย	2.68*	-		
<i>Cx.vishnui</i> เพศเมีย	4.08*	3.25*	-	
ความแตกต่าง ในกลุ่มยุงลาย	<i>Ae.aegypti</i> เพศผู้	<i>Ae.aegypti</i> เพศเมีย	<i>Ae.albopictus</i> เพศผู้	<i>Ae.albopictus</i> เพศเมีย
<i>Ae.aegypti</i> เพศผู้	-			
<i>Ae.aegypti</i> เพศเมีย	2.14*	-		
<i>Ae.albopictus</i> เพศผู้	0.29	2.13*	-	
<i>Ae.albopictus</i> เพศเมีย	2.08*	1.30	2.21*	-

* = มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) (ในตารางนี้ไม่แสดงค่า sig. แต่แสดงค่า Mahalanobis distances)



ตารางที่ 5 ค่าความถูกต้องในการจำแนกชนิดและเพศของยุงพาหะจากวิธีการวิเคราะห์โครงร่าง

ชนิดของยุงพาหะ	เพศ	n	ร้อยละความถูกต้องในการจำแนก
<i>An.barbirostris</i>	ผู้	17	87%
	เมีย	31	88%
<i>An.subpictus</i>	ผู้	64	91%
	เมีย	61	84%
<i>Cx.quinquefasciatus</i>	เมีย	22	63%
<i>Cx. Whitmorei</i>	เมีย	65	81%

สรุปและอภิปรายผล

ในการศึกษาครั้งนี้ เราได้รวบรวมยุงพาหะนำโรคจากหมู่บ้านห้วยน้ำหนัก ตำบลตะนาวศรี อำเภอสวนผึ้ง โดยพบยุงทั้งหมด 7 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 3 ชนิด (ยุงก้นปล่อง, ยุงรำคาญ และยุงลาย) ซึ่งทั้ง 7 สายพันธุ์มีความสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข เริ่มจากยุงก้นปล่อง *An. barbirostris* ในประเทศไทย

เป็นพาหะต้องสงสัยในการนำโรคมาลาเรีย (suspected vector) และยังมีรายงานในประเทศว่าพบเชื้อ *Plasmodium* ในยุงชนิดนี้¹⁰ ขณะที่ยุงก้นปล่อง *An. subpictus* ไม่มีรายงานว่าเป็นพาหะนำโรคในประเทศไทย แต่เป็นพาหะในประเทศศรีลังกาที่สำคัญ¹¹ สำหรับยุงรำคาญที่พบในพื้นที่นี้ได้แก่ *Cx.quinquefasciatus*, *Cx.whitmorei* และ *Cx.vishnui* เป็นพาหะสำคัญที่นำโรคไข้สมองอักเสบเจอีและโรคเท้าช้าง⁹ ขณะที่ยุงลาย *Ae.aegypti* และ *Ae.albopictus* เป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออก ไข้ชิก้าและไข้ซิกนุกุนยาในประเทศไทย³ การวิจัยนี้เราได้วิเคราะห์โครงร่างปีกของยุงพาหะนำโรค 3 กลุ่ม

ได้แก่ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) ยุงรำคาญ (*Culex* spp.) ยุงลาย (*Aedes* spp.) โดยแบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ปัจจัยได้แก่ ขนาดและรูปร่าง

การวิเคราะห์ปัจจัยขนาด พบว่าขนาดยุงก้นปล่องและรำคาญมีความแตกต่างทางสถิติในทุกสายพันธุ์ ($p < 0.05$) ขณะที่ยุงลายมี 2 คู่ที่เราไม่พบความแตกต่าง อย่างไรก็ตามสำหรับการจำแนกชนิดนั้น ปัจจัยด้านขนาดอาจไม่เหมาะสำหรับการจำแนกชนิด เนื่องจากมันมีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิ ความชื้นและคุณภาพหรือปริมาณของอาหารที่พวกยุงได้รับ⁶ ซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการจำแนกได้ มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้แจ้งถึงข้อควรระวังนี้¹² อย่างไรก็ตามมีการแนะนำปัจจัยด้านรูปร่างที่มีความเหมาะสมมากเนื่องจากความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาที่แสดงออกทางรูปร่างที่เกิดขึ้นในแต่ละชนิดเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ซึ่งรวมทั้งยุง¹³



การวิเคราะห์ปัจจัยด้านรูปร่าง จากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบความแตกต่างเกือบทุกชนิด ยกเว้น 2 คู่ ในกลุ่มยุ้งลาย อาจเนื่องมาจากลักษณะปีกของยุ้งลายมีความเหมือนกัน ซึ่งมีการรายงานถึงปัญหาในการจำแนกชนิดอยู่บ่อยครั้ง และจากการตรวจสอบความถูกต้องของการจำแนกของยุ้งพาหะ พบว่าวิธีการวิเคราะห์โครงร่างมันมีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกกลุ่มของยุ้งกันปล่องที่อยู่ในช่วง 84-91% รองลงคือยุ้งรำคาญ ที่อยู่ในช่วง 63-83% แต่อาจไม่ค่อยดีนักสำหรับยุ้งลาย ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่นำวิธีการวิเคราะห์โครงร่างไปใช้ในการจำแนกชนิดยุ้งกันปล่อง 11 ชนิดในประเทศโคลัมเบีย¹⁴

ผลเหล่านี้เป็นหลักฐานสำคัญที่แสดงว่าการวิเคราะห์โครงร่างสามารถนำไปช่วยในการจำแนกชนิดยุ้งกันปล่องพาหะนำโรคมาลาเรียของประเทศไทยได้ ซึ่งเป็นทางเลือกในการระบุชนิดของพาหะนำโรค จุดเด่นของเทคนิคนี้ คือ สามารถใช้งานได้ง่าย รวดเร็วและราคาไม่แพง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเทียบกับเทคนิคทางพันธุกรรมและไม่ต้องใช้อุปกรณ์มากกว่าที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้มีความเป็นไปได้ที่จะนำหลักการนี้ไปพัฒนาเป็นโปรแกรมสำเร็จรูป (ทั้งในระบบมือถือและคอมพิวเตอร์) ในการวิเคราะห์ภาพปีกเพื่อจำแนกชนิด ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะนำไปสู่การควบคุมยุ้งพาหะได้อย่างมีประสิทธิภาพ นำไปสู่การลดจำนวนผู้ป่วยจากโรคติดต่อที่นำโดยยุ้งในพื้นที่ต่างๆ ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาขั้นต้นในการตรวจสอบประสิทธิภาพของการจำแนกชนิดยุ้งพาหะนำโรค แม้ว่าผลการศึกษานี้ประสบความสำเร็จในการจำแนกชนิดยุ้งกันปล่อง แต่เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ดังนั้นถ้าจะนำวิธีนี้ไปใช้ควรทดสอบกับยุ้งในพื้นที่อีกครั้ง

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

ผู้วิจัยจะพัฒนาฐานข้อมูลโครงร่างปีกของยุ้งกันปล่องพาหะนำโรคหลักในประเทศไทยเพื่อนำไปสร้างเป็นโปรแกรมสำเร็จรูปในการวิเคราะห์ชนิดของพาหะมาลาเรียในพื้นที่ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทาที่สนับสนุนด้านการศึกษาและโอกาสในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Chaiphongpachara T, Sumruayphol S. Species diversity and distribution of mosquito vectors in coastal habitats of Samut Songkhram province, Thailand. Trop Biomed. 2017;34(3):524–32.
2. Tolle MA. Mosquito-borne Diseases. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. 2009;39(4):97–140.



3. Service M. Medical entomology for students, fourth edition. Medical Entomology for Students, Fourth Edition. 2008. 1-301 p.
4. Ministry of Public Health (MOPH), Thailand. Annual Report. Bureau of Epidemiology: MOPH; 2013, 2014 and 2015. 2015;2015.
5. Sumruayphol S, Apiwathnasom C, Ruangsittichai J, Sriwichai P, Attrapadung S, Samung Y, et al. DNA barcoding and wing morphometrics to distinguish three *Aedes* vectors in Thailand. *Acta Trop* [Internet]. 2016;159:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.010>
6. Ruangsittichai J, Apiwathnasom C, Dujardin JP. Interspecific and sexual shape variation in the filariasis vectors *Mansonia dives* and *Ma. bonneae*. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2011;11(8):2089–94.
7. Rohlf FJ. Geometric morphometrics in systematics. *Morphol shape phylogenetics*. 2002;175–93.
8. Dujardin JP, Kaba D, Solano P, Dupraz M, McCoy KD, Jaramillo-O N. Outline-based morphometrics, an overlooked method in arthropod studies? *Infect Genet Evol*. 2014;28:704–14.
9. Rattanarithikul R. Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand. 2016;(April).
10. Sriwichai P, Samung Y, Sumruayphol S, Kiattibutr K, Kumpitak C, Payakkapol A, et al. Natural human *Plasmodium* infections in major *Anopheles* mosquitoes in western Thailand. *Parasit Vectors* [Internet]. 2016;9(1):17.
11. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Chareonviriyaphap T, Patil AP, Temperley WH, et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Asia-Pacific region: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors* [Internet]. 2011;4(1):89.
12. Wilke ABB, De Oliveira Christe R, Multini LC, Vidal PO, Wilk-Da-silva R, De Carvalho GC, et al. Morphometric wing characters as a tool for mosquito identification. *PLoS One*. 2016;11(8).
13. Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. *Infect Genet Evol*. 2008;8(6):875–90.
14. Jaramillo-O N, Dujardin JP, Calle-Londoño D, Fonseca-González I. Geometric morphometrics for the taxonomy of 11 species of *Anopheles* (Nysorhynchus) mosquitoes. *Med Vet Entomol*. 2015;29(1):26–36.