EVALUATION OF DENSONUCLEOSIS VIRUSES AS POTENTIAL BIOLOGICAL CONTROL AGENTS OF DENGUE VECTORS

SUPANEE HIRUNKANOKPUN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (BIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การประเมินความเป็นไปได้ในการใช้เดนโซไวรัสเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของยุงพาหะนำโรคไข้เลือดออก (EVALUATION OF DENSONUCLEOSIS VIRUSES AS POTENTIAL BIOLOGICAL CONTROL AGENTS OF DENGUE VECTORS)

สุภาณี หิรัญกนกพันธ์ 4537993 SCBI/D
ปร.ด. (ชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ปัทมาภรณ์ กฤตยพงษ์, Ph.D., วิสุทธิ์ ใบไม้, Ph.D., JOHN R. MILNE, Ph.D.

บทคัดย่อ

ยุงลายชนิด *Aedes aegypti* เป็นพาหะที่สำคัญในการนำโรคไข้เลือดออกและทำให้เกิดปัญหาที่สำคัญต่อสุขภาพ ถึงแม้ว่าจะมีการพัฒนาการควบคุมยุงลายด้วยวิธีต่างๆ แต่ก็ยังมีข้อจำกัดทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการควบคุมโรคไข้เลือดออก การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะประเมินศักยภาพของเดนโซไวรัสในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของยุงลาย *Ae. aegypti* โดยการเปรียบเทียบอัตราการตายและการติดเชื้อของไวรัสในยุงระหว่างเดนโซไวรัสสี่สายพันธุ์คือ *ATh*DNV, *Aa*PV, *Ae*DNV และ *APe*DNV พบว่าเดนโซไวรัสทุกสายพันธุ์สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลาย และมีการติดเชื้อมากกว่า 80% ในยุงลายทั้งสามสายพันธุ์ ยุงลายมีอัตราการตายสูงสุดถึง 90% ภายใน 10 วัน เมื่อมีการติดเชื้อเดนโซไวรัสสายพันธุ์ *Aa*PV ยุงลายจากฉะเชิงเทราและกรุงเทพฯ จำนวนหนึ่งที่ติดเชื้อเดนโซไวรัสสายพันธุ์ *ATh*DNV และ *Ae*DNV สามารถถ่ายทอดไวรัสไปยังรุ่นต่อไปประมาณ 22-50% เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าเดนโซไวรัสแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม จากการประเมินประสิทธิภาพของไรน้ำ *Mesocyclops thermocyclopoides* แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* และเดนโซไวรัสสายพันธุ์ไทยในการควบคุมลูกน้ำยุงลาย *Ae. aegypti* โดยทำการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการและในสภาพกึ่งจำลองธรรมชาติ พบว่าการใช้ไรน้ำร่วมกับจุลินทรีย์ Bti และเดนโซไวรัสสายพันธุ์ไทยนั้นมีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมปริมาณลูกน้ำยุงลาย จึงคาดว่าวิธีการควบคุมยุงลายแบบผสมผสานนี้เป็นวิธีการใหม่ที่สามารถจะนำไปใช้ในธรรมชาติเพื่อป้องกันการระบาดของไข้เลือดออก นอกจากนี้ได้มีการประเมินประสิทธิภาพของเดนโซไวรัสสายพันธุ์ *Ae*DNV ที่ทำให้กลายพันธุ์โดยการเปลี่ยนลำดับดีเอ็นเอบริเวณรอบๆ จุดเริ่มต้นของบริเวณที่มีการสังเคราะห์โปรตีนของ NS1 ในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย *Ae. aegypti* สายพันธุ์ Rexville-D การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไวรัสกลายพันธุ์และไวรัสปกตินั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ไวรัสกลายพันธุ์ที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกับลำดับเบสของ Kozak (*Ae*DNV-mutant2) สามารถทำให้ลูกน้ำยุงลายตายสูงสุด (58.33%) แต่เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธีไคสแคว์พบว่าไม่มีความแตกต่างของอัตราการตายของลูกน้ำระหว่างไวรัสกลายพันธุ์และไวรัสปกติ

EVALUATION OF DENSONUCLEOSIS VIRUSES AS POTENTIAL BIOLOGICAL CONTROL AGENTS OF DENGUE VECTORS

SUPANEE HIRUNKANOKPUN 4537993 SCBI/D
Ph.D. (BIOLOGY)

THESIS ADVISORS: PATTAMAPORN KITTAYAPONG, Ph.D., VISUT BAIMAI, Ph.D., JOHN R. MILNE, Ph.D.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the main vector of dengue and dengue hemorrhagic fever and represents a significant public health problem. Many strategies, such as vector eradication programs, chemical control measures and environmental sanitation with community participation, have been used to prevent or control dengue outbreaks. Although many programs for mosquito control have been developed, there has been limited contemporary success in controlling the dengue vector. The purpose of this research was to determine the potential of densoviruses as biological control agents of *Ae. aegypti* mosquitoes. Four mosquito densovirus strains, *ATh*DNV, *Aa*PV, *Ae*DNV and *APe*DNV were assayed for mortality and infectivity against larvae of *Aedes aegypti* from different geographic regions. All strains of densoviruses exhibited larvicidal activity and caused >80% mortality and infectivity in the three mosquito strains. *Aa*PV-infected *Ae. aegypti* larvae had the highest mortality rate, >90% mortality within 10 days in all mosquito strains. A few mosquitoes from Chachoengsao and Bangkok exposed to *Ae*DNV and *ATh*DNV survived to the adult stage and showed 22-50% vertical transmission in the F1 generation. Phylogenetic analysis of four densovirus strains used in this study and those other reference strains indicated that these mosquito densoviruses could be separated into two clades. Laboratory and semi-field studies were conducted to evaluate the efficiency of *Mesocyclops thermocyclopiodes* (copepods), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) and the Thai densovirus strain (*ATh*DNV) against *Aedes aegypti* larvae collected from dengue endemic areas in Chachoengsao Province, Thailand. Mosquito larvae were exposed to each biocontrol agent alone and to combinations of them and the surviving mosquitoes were monitored weekly. The combination of copepod-Bti-densovirus provided better mosquito control than using each treatment alone or using combinations of two of them. These novel integrative approaches could possibly be applied in different endemic areas to control dengue transmission. The pathogenicity to *Ae. aegypti* mosquitoes of the *Ae*DNV strain with altered sequence context at the starting codon of the NS1 gene was evaluated. Viral DNA replication determined by real-time PCR was not significantly different among *Ae*DNV-mutant and wild type strains. *Ae*DNV-mutant2 caused the highest mortality in mosquitoes (58.33%) but was not significantly different from the others when analyzed by ANOVA analysis ($F= 1.915$; $df= 11, 44$; $p= 0.140$).

KEY WORDS : *AEDES AEGYPTI*/ DENGUE/ DENSOVIRUS/ *MESOCYCLOPS THERMOCYCLOPOIDES*/ *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS*/ DENGUE VECTOR/ MOSQUITO CONTROL

111 pp.