



## รายงานการวิจัย (ร่าง)

การก่อตั้งสายพันธุ์แมลงวันหัวเขียว (*Lucilia sericata*) เพื่อใช้สำหรับวิธีการรักษาแผลด้วยหนอนแมลงวัน  
Establishment of greenbottle blowfly (*Lucilia sericata*) line for maggot debridement therapy

โดย

รศ. นพ. เผด็จ สิริยะเสถียร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดร. อุษาวดี ดาวัระ และ ดร. อภิวัฏ รัชชสิน

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ทุนอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2552

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้โดยได้รับความร่วมมือจากบุคลากรทั้งสถาบันวิจัย  
วิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และ จาก  
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนงานวิจัยเรื่องการก่อตั้งสายพันธุ์แมลงวันหัวเขียว (*Lucilia sericata*) เพื่อใช้สำหรับ  
วิธีการรักษาแผลด้วยหนอนแมลงวัน ได้รับทุนอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปี  
งบประมาณ 2552

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อประชาชน และ  
บุคลากรทางการแพทย์

## บทคัดย่อ

การสำรวจแมลงวันหัวเขียวใน 6 จังหวัดของประเทศไทยได้แก่ กรุงเทพมหานคร, พิษณุโลก, เชียงใหม่, ตาก, ชุมพร และบุรีรัมย์ การศึกษาทางสัณฐานวิทยาพบเป็นแมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies* และ *Lucilia cuprina* และการศึกษาทางอณูชีววิทยาของยีน cytochrome oxidase ช่วยยืนยันว่าเป็น 3 species นี้ นอกจากนี้การใช้เทคนิค Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ยังสามารถช่วยจำแนกแมลงวันหัวเขียวทั้ง 3 ชนิดนี้ได้ PCR ให้ผลผลิต 1324 เบส ในแมลงวันหัวเขียวทั้ง 3 ชนิด การย่อยผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย *Taq*<sup>α</sup> I and *Vsp*I ให้รูปแบบที่จำเพาะในแมลงวันหัวเขียวแต่ละชนิด ประโยชน์ของการใช้เทคนิค PCR-RFLP นี้ นอกจากจะช่วยในการสำรวจแมลงวันหัวเขียวง่ายขึ้นแล้วยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางนิติวิทยาศาสตร์อีกด้วย ได้แก่การนำมาใช้ประมาณเวลาตาย (post mortem interval (PMI)) ส่วน *Lucillia sericata* ไม่สามารถพบได้จากการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตามได้ทำการทดลองเลี้ยงแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* ด้วยอาหารเทียมพบว่าหนอนแมลงวัน *Chrysomya megacephala* สามารถเจริญในอาหารเทียมได้และไม่พบแบคทีเรียเจริญในอาหารเทียมนี้ และหนอนแมลงวันหัวเขียวสามารถเจริญจนเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ แสดงว่าอาหารเทียมที่ใช้ในการทดลองนี้เหมาะสำหรับใช้เลี้ยงหนอนแมลงวันหัวเขียว

## Abstract

Blow fly surveillance was performed in 6 provinces of Thailand including Bangkok, Phitsanulok, Chiang-Mai, Tak, Chumphon and Buri-Ram. *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies* and *Lucilia cuprina* were identified morphologically. Molecular studies of the cytochrome oxidase gene were confirmed the identification. PCR-RFLP also assist to identification of these three blow fly species, The PCR yields a single 1,324 bp-sized amplicon in all blowfly specimens, followed by direct DNA sequencing. *Taq*<sup>α</sup> I and *Vsp*I predicted from the sequencing data provide different RFLP profiles among these three species. Other benefit of the study is used for forensic entomology, in order to estimation post mortem interval (PMI). *Lucillia sericata* was not collected from this study, however we were able to establish system to maintain sterile *Chrysomya megacephala* instead. Artificial media was tested to maintain complete cycle of *Chrysomya megacephala* and no bacteria was detected, therefore the artificial media prepared from this study is suitable for maintaining blowfly larvae.

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3
สารบัญเรื่อง	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญภาพ	6
บทนำ	7
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	8
ระเบียบวิธีการวิจัย	13
ผลการวิจัย	14
อภิปรายและวิจารณ์ผล	30
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	32
บรรณานุกรม	33
Appendix	38

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 หมายเลข Code, เพศ, ตำแหน่งที่ทำการจับ และ accession number ของแมลงวันหัวเขียว	17
ตารางที่ 2 รูปแบบของ PCR-RFLP ที่แตกต่างกันระหว่าง สปีชีส์แมลงวันหัวเขียว	20

## สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงวันหัวเขียว <i>Chrysomya megacephala</i> ตัวเต็มวัย	11
รูปที่ 2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงวันหัวเขียว <i>Phaenicia sericata</i> ตัวเต็มวัย	12
รูปที่ 3 แผนที่ประเทศไทยแสดงตำแหน่งที่มีการจับแมลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัย	15
รูปที่ 4 6% native polyacrylamide gel แสดงรูปแบบของ PCR-RFLP ที่แตกต่างกันระหว่างสปีชีส์ของแมลงวันหัวเขียว	19
รูปที่ 5 Identity matrix แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสองตัวอย่าง	21
รูปที่ 6 แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่าง แมลงวันของทั้ง 3 สปีชีส์โดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COI-COII	22
รูปที่ 7 การล่อให้แมลงวันหัวเขียววางไข่	23
รูปที่ 8 ไข่แมลงวันหัวเขียว	24
รูปที่ 9 ไข่แมลงวันหัวเขียวเมื่อแยกไว้ในจานปลอดเชื้อ และ ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 0.05% โซเดียมไฮโปคลอไรด์	25
รูปที่ 10 หนอนแมลงวันหัวเขียวที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ	26

## บทนำ

โดยทั่วไปมนุษย์มักรู้จักแมลงวันในเชิงลบ โดยแมลงวันเป็นสัญลักษณ์ของความสกปรก และนำเชื้อโรคมาสู่คน ทั้งนี้เนื่องจากแมลงวันอาศัยหากินในทุกพื้นที่ที่สกปรก เช่น กองขยะ เศษใบไม้ ซากพืชซากสัตว์ หรือแม้กระทั่งอาหารของคน นอกจากนี้แมลงวันยังมีระยะตัวอ่อนที่เป็นตัวหนอนแมลงวันที่มีรูปร่างซึ่งทำให้ผู้คนจำนวนมากที่เกลียดกลัวหนอนแมลงวัน อย่างไรก็ตาม เนื่องจากประเทศไทยมีสภาพอากาศร้อนชื้นเหมาะแก่การเจริญเติบโตของแมลงวันทำให้สามารถพบแมลงวันได้ทั่วไป

แมลงวันก่อให้เกิดปัญหาแก่คนมากมาย ก่อให้เกิดความรำคาญต่อคนและสัตว์ แมลงวันสามารถนำโรคได้โดยมีเชื้อโรคติดไปกับส่วนต่างๆของร่างกาย เช่น ปาก ขา และขน เชื้อโรคจะถูกถ่ายทอดไปขณะที่แมลงวันตอมอาหาร เมื่อคนรับประทานอาหารที่มีแมลงวันตอมเข้าไปอาจจะก่อให้เกิดโรคต่างๆหลายชนิด เช่น โรคระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ ท้องร่วงอย่างรุนแรง ไทฟอยด์ พาราไทฟอยด์ อหิวาตกโรค อาหารเป็นพิษ นอกจากนี้อาจก่อให้เกิดโรคโปลิโอ และโรคไวรัสอื่นๆ เช่น โรคริคตเซียดวงตา เยื่อบุตาอักเสบ และตาแดง แมลงวันบางชนิดไซเข้าทางผิวหนังของคนและสัตว์ ก่อให้เกิดอาการอักเสบของผิวหนังและเป็นแผลเน่า ได้แก่ แมลงวันหัวเขียวและแมลงวันหลังลายบางชนิด ถึงแม้แมลงวันก่อให้เกิดโทษในคน แต่อย่างไรก็ตามแมลงวันยังมีคุณประโยชน์ต่อคนทั้งทางตรงและทางอ้อม ตัวเต็มวัยของแมลงวันหัวเขียวสามารถช่วยในการผสมพันธุ์พืชซึ่งเป็นการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ในขณะที่ตัวอ่อนของแมลงวันบ้านถูกนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับไก่กวาง ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจได้ดี นอกจากนี้ตัวอ่อนของแมลงวันยังช่วยในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ให้สลายไปอย่างรวดเร็วสำหรับประโยชน์ทางการแพทย์หนอนแมลงวันสามารถนำมาใช้ในการรักษาบาดแผลเน่ารวมทั้งใช้ประโยชน์ทางนิติวิทยาศาสตร์ในการประมาณเวลาตายอีกด้วย



## ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การรักษาแผลโดยอาศัยหนอนแมลงวันเป็นวิธีที่มีการใช้มาตั้งแต่โบราณ (Chan et al, 2007) ต่อมาได้มีการสังเกตและบันทึกผลของหนอนแมลงวันที่มีต่อบาดแผลโดยศัลยแพทย์ชาวอเมริกัน Forney Zacharias โดยสังเกตพบว่าบาดแผลของทหารอเมริกันที่มีหนอนแมลงวันจะหายเร็วกว่าบาดแผลที่ไม่มีหนอนแมลงวัน (Chan et al, 2007; Steenvoorde et al, 2007) อย่างไรก็ตามเมื่อมีการค้นพบยาปฏิชีวนะวิธีการรักษาบาดแผลด้วยหนอนแมลงวันจึงไม่ได้รับความนิยม และเมื่อเกิดปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลชีพ วิธีการรักษาบาดแผลด้วยหนอนแมลงวันจึงได้กลับมาได้รับความนิยมอีกครั้งหนึ่ง (Whitaker et al, 2007; Collier M, 2006; Nigam et al, 2006)

แมลงวันที่นำมาใช้สำหรับการรักษาบาดแผลคือแมลงวันหัวเขียว greenbottle blowfly (*L. sericata*) โดยวิธีการรักษาบาดแผลนี้เรียกว่า maggot therapy หรือ maggot debridement therapy หรือ biosurgery (Chan et al, 2007; Whitaker et al, 2006; Steenvoorde et al, 2006; Wolff and Hansson, 2005; Sherman, 2005) สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของหนอนแมลงวันในการรักษาบาดแผลนั้นมี 3 ประการคือ ช่วยกำจัดเนื้อที่เน่าเสีย กำจัดเชื้อแบคทีเรีย และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการรักษาของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ที่ได้จากการรักษาบาดแผลโดยหนอนแมลงวันอีกคือช่วยลดกลิ่นเหม็นของบาดแผลลงได้ (James, 2007; Brin et al, 2007; Smith et al, 2006; Thomas, 2006; Steenvoorde et al, 2006; Steenvoorde and Oskam, 2005) จากข้อดีของวิธีการนี้ดังที่กล่าวมาแล้ว รวมทั้งยังลดค่าใช้จ่ายในการดูแลบาดแผลลงได้มาก ทำให้เป็นที่นิยมในประเทศต่างๆ หลายประเทศ อาทิเช่น สหรัฐอเมริกา อังกฤษ ออสเตรเลีย และญี่ปุ่น (Sherman, 2002; Tanyuksel et al, 2005; Raynor et al, 2004; Steenvoorde and Jukema, 2004) โดยมีการนำหนอนแมลงวันมาใช้ในการรักษาบาดแผลชนิดต่างๆ เช่น บาดแผลติดเชื้อเรื้อรัง บาดแผลเบาหวาน บาดแผลติดเชื้อภายหลังการผ่าตัดเป็นต้น (Chan et al, 2007; Nigam et al, 2006; Steenvoorde et al, 2006; Wolff and Hansson, 2005; Sherman, 2005; James, 2007)

สำหรับประเทศไทยยังไม่มี การเลี้ยง หนอนแมลงวันชนิดนี้เพื่อใช้ในการรักษาบาดแผลมาก่อน รวมทั้งข้อมูลเกี่ยวกับแมลงวันชนิดนี้มีน้อยมาก จากการสำรวจของตุมราสวิน และคณะเมื่อปี พ.ศ. 2519 (Tumrasvin et al, 1976) รายงานว่าสามารถพบแมลงวันชนิดนี้ได้ ในกรุงเทพมหานคร ในปี พ.ศ. 2550 คณะผู้วิจัยได้สำรวจแมลงวันในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ก็สามารถพบแมลงวันชนิดนี้ได้ (ข้อมูลยังไม่ได้รายงาน) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถสำรวจและเลี้ยงแมลงวันหัวเขียว *L. sericata* โดยใช้แมลงวันสายพันธุ์ของประเทศไทยเพื่อใช้ในการรักษาบาดแผลได้ ด้วยความสำคัญของแมลงวันหัวเขียวชนิดนี้ดังกล่าวแล้ววิธีการรักษาโดยใช้หนอนแมลงวันจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะถูกนำมาใช้ในประเทศไทย แต่การนำเข้าหนอนแมลงวันจากต่างประเทศยังมีราคาแพงมาก ประเทศไทยเองเป็นประเทศที่มีสายพันธุ์แมลงวันชนิดนี้อยู่แล้ว และมีศักยภาพที่จะผลิตหนอนแมลงวันชนิดนี้ได้ คณะผู้วิจัยจึงต้องคัดเลือกและเลี้ยงแมลงวัน *L. sericata* สำหรับใช้ในการรักษาบาดแผล เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาบาดแผลติดเชื้อ และเป็นการลดการนำเข้าปฏิชีวนะลงได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเพื่อการค้าในอนาคตต่อไป

### วงชีวิตและชีววิทยาของแมลงวัน

ในประเทศไทยมีแมลงวันหลายชนิดอาศัยอยู่ และแมลงที่คนไทยรู้จักกันดีที่สุดคือแมลงวันบ้าน (house fly: *Musca domestica*) และแมลงวันหัวเขียว (blow fly) แมลงวันบ้านและแมลงวันหัวเขียวจัดอยู่ในอันดับ (Order) Diptera, อันดับย่อย (Suborder) Brachycera, Suborder Muscomorpha (เดิมคือ Cyclorrhapha), แมลงวันบ้านจัดอยู่ในวงศ์ (Family) Muscidae และแมลงวันหัวเขียวจัดอยู่ในวงศ์ Calliphoridae แมลงวันมีการเปลี่ยนสัณฐาน (metamorphosis) แบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis หรือ holometabolous) โดยมี 4 ระยะในวงจรชีวิตคือ ไข่ (egg) ตัวอ่อนหรือตัวหนอน (larva หรือ maggot) คี๊ดแค้ (pupa) และตัวเต็มวัย (adult)

## แมลงวันหัวเขียว (Blow flies)

แมลงวันหัวเขียวจัดอยู่ใน Family Calliphoridae แมลงวันใน Family นี้ มีหลายชนิด ตัวอ่อนของแมลงวันพวกนี้กินซากสัตว์ที่ตายแล้ว หรือกินเนื้อเน่า นอกจากนี้ยังพบเป็นปรสิตของสัตว์ขาปล้องหลายชนิดด้วย แมลงวันใน Family นี้ มีลำตัวใหญ่เทอะทะ และพบขนแข็ง (bristle) ตามลำตัวจำนวนมาก Family นี้ ประกอบด้วยหลาย subfamily แต่ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ ได้แก่ Subfamily Calliphorinae และ Subfamily Chrysomyinae

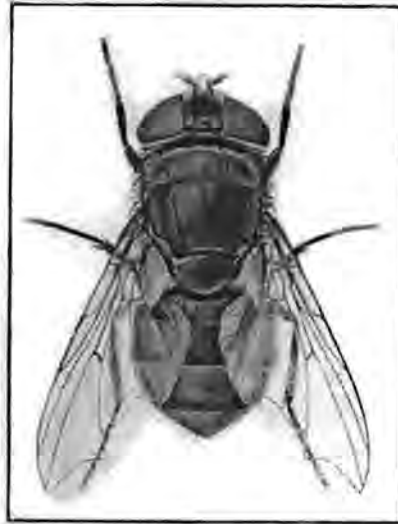
Subfamily Chrysomyinae มีลักษณะที่สำคัญดังนี้คือ ขนแข็ง (bristle) บนอกปล้องกลาง (mesonotum) เจริญไม้คีนัก เส้นปีก stem vein จะไม่มีขนขึ้นเป็นแถว ตระกูลที่พบมากได้แก่ *Chrysomya* เป็นแมลงวันที่มีสีเขียวจนถึงสีน้ำเงินปนดำ และตระกูล *Cochliomyia* เป็นแมลงวันที่มีสีเขียวจนถึงเขียวอมม่วง

Subfamilies Calliphorinae มีลักษณะสำคัญดังนี้ ขนแข็ง (bristle) บนอกปล้องกลาง (mesonotum) เจริญคีน เส้นปีก stem vein จะไม่มีขนขึ้นเป็นแถว ตระกูลที่พบมากได้แก่ *Luicilia*, *Phaenicia* และ *Calliphora* โดยแมลงวัน *Luicilia* และ *Phaenicia* ส่วนอกและส่วนท้องจะมีสีเขียวเป็นเงา เขียวทองแดง หรือทองแดง ขณะที่แมลงวัน *Calliphora* ส่วนอกจะมีสีดำ ส่วนท้องมีสีน้ำเงินปนดำ หรือสีน้ำเงินมันวาวสะท้อนแสง

แมลงวันหัวเขียวที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย ได้แก่ *Chrysomya megacephala*, *C. rufifacies*, *Phaenicia sericata* และ *P. cuprina*

### แมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala*

แมลงวันหัวเขียวชนิดนี้จัดอยู่ใน Subfamily Chrysomyinae พบว่ามีการแพร่กระจายทั่วไปในแถบภูมิภาคตะวันออก และออสเตรเลีย ไม่พบในเขตแอฟริกา เป็นแมลงวันหัวเขียวที่พบมากที่สุดในประเทศไทย แมลงวันชนิดนี้จะมีขนาดใหญ่ ลำตัวมีขนาดใหญ่ประมาณ 8-12 มิลลิเมตร ลำตัวมันวาวสีน้ำเงินเขียว



รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* ตัวเต็มวัย (จาก Greenberg, 1971)

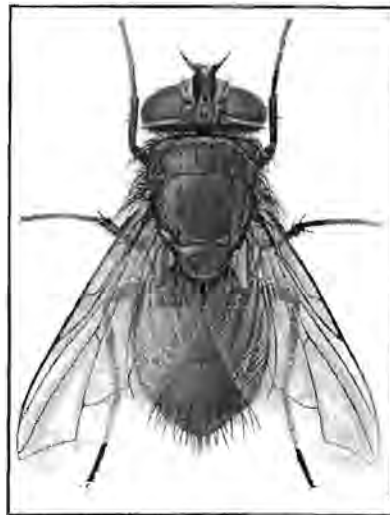
**วงชีวิต (Life cycle)** ไข่แมลงวันหัวเขียวจะฟักเป็นตัวหนอนภายในระยะเวลา 9-10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 24-28 องศาเซลเซียส และสามารถวางไข่ได้ประมาณ 200-250 ฟอง ตัวหนอนจะเจริญได้ดีในอาหารเหลว ตัวหนอนจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มบริเวณส่วนบนของอาหารเนื่องจากต้องการอากาศสำหรับหายใจ ตัวหนอนของแมลงวันหัวเขียวชนิดนี้จะพบมากในมูลของสัตว์กินเนื้อ ส่วนมูลของสัตว์ที่กินพืชจะพบน้อยมาก เมื่อตัวหนอนเจริญเต็มที่แล้ว จะเคลื่อนที่เข้าหาที่แห้งเพื่อการเข้าสู่ระยะดักแด้ และเข้าสู่ระยะเต็มวันในช่วงต่อไป

**พฤติกรรมการกินอาหาร (Feeding behavior)** แมลงวันหัวเขียวจะพบมากบริเวณแหล่งอาหารที่มีโปรตีนสูง เช่น โรงฆ่าสัตว์ แหล่งขายปลา ขายเนื้อสัตว์ โดยจะดูดกินบนเนื้อสัตว์และปลานอกจากนี้ยังสามารถพบได้บริเวณกองขยะบริเวณตลาด แหล่งกำจัดขยะมูลฝอยที่มีความชื้นสูง เศษอาหารและผลไม้ที่มีรสหวาน

**พฤติกรรมและการแพร่กระจาย (Behavior and distribution)** แมลงวันหัวเขียวชนิดนี้พบแพร่กระจายทั่วไปตามแหล่งอาหารและแหล่งเพาะพันธุ์ที่มีความชื้นสูงกว่าแมลงวันบ้าน ความยืนยาวของอายุขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความชื้น ในธรรมชาติแมลงวันหัวเขียวชนิดนี้จะวางไข่ในอุจจาระคน นอกจากนี้ยังชอบวางไข่ในซากสัตว์ที่ตายแล้ว

## แมลงวันหัวเขียว *Phaenicia sericata*

แมลงวันหัวเขียวชนิดนี้จัดอยู่ใน Subfamilies Calliphorinae มีลักษณะที่สำคัญคือ ขนแข็ง (bristle) บนอกปล้องกลางเจริญได้ดี และส่วนปีก stem vein จะไม่มีขนขึ้นเป็นแถว เป็นแมลงวันที่มีลำตัวมันวาวสีเขียวสด จึงมีชื่อภาษาอังกฤษว่า green bottles ลำตัวมีขนาด 5-10 มิลลิเมตร



รูปที่ 2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงวันหัวเขียว *Phaenicia sericata* ตัวเต็มวัย

(จาก Greenberg, 1971)

**พฤติกรรมการกินอาหาร (Feeding behavior)** แมลงวันหัวเขียวชนิดนี้จะดูดกินอาหารเหลวรวมทั้งอาหารจากแหล่งเพาะพันธุ์ โดยดูดกินของหวานของของเหลว ของเหลวที่เกิดจากการหมัก น้ำหวานจากเกสรดอกไม้ ตัวเต็มวัยตัวเมียต้องการ โปรตีนเพื่อใช้ในการพัฒนาของไข่ให้มีการเจริญเต็มที่

**แหล่งเกาะพัก (Resting places)** การเกาะพักในช่วงเวลากลางวันจะเกาะพักนอกบ้านตามต้นพืช ส่วนการเกาะพักในเวลากลางคืนจะใกล้เคียงกับแหล่งที่หากินในเวลากลางวัน

พฤติกรรมและการแพร่กระจาย (Behavior and distribution) พฤติกรรมการผสมพันธุ์ของแมลงวันหัวเขียวชนิดนี้คือ จะมีการผสมพันธุ์หลังจากออกจากคักได้แล้ว 3-8 วัน หลังจากเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้ 8-14 วัน จะเริ่มการวางไข่โดยเลือกพื้นที่ผิวที่มีความชื้นสูง ชอบวางไข่บนซากสัตว์หรือเนื้อสัตว์ที่เน่าเหม็น การวางไข่ในแต่ละครั้งจะวางไข่ประมาณ 80-170 ฟอง

### ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

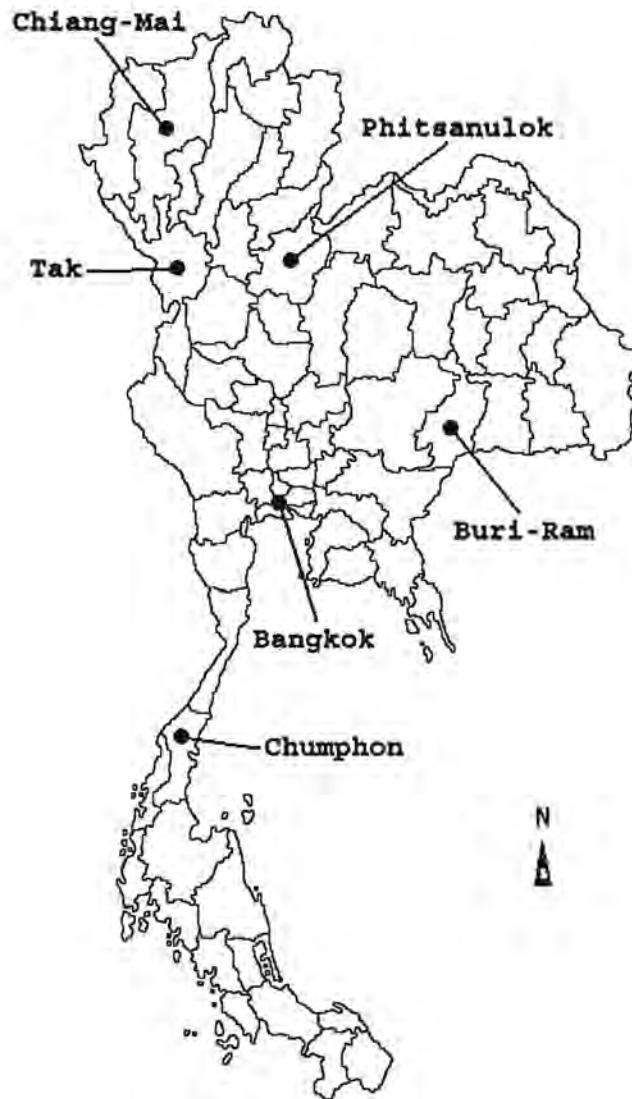
#### วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ดำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงวันหัวเขียวจากภูมิภาคต่างๆแบบเจาะจง (Purposive sampling) ใน 6 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพมหานคร, พิษณุโลก, เชียงใหม่, ตาก, ชุมพร และบุรีรัมย์
2. จำแนกชนิดของแมลงวันหัวเขียวที่เก็บมาโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา
3. สกัด DNA จากตัวอย่างแมลงวันหัวเขียวเพื่อศึกษาทางอนุชีววิทยาของยีน cytochrome oxidase
4. เปรียบเทียบข้อมูลทางพันธุกรรมของแมลงวันหัวเขียวที่จับได้จากภูมิภาคต่างๆ
5. ทดลองเลี้ยงหนอนแมลงวันหัวเขียวในอาหารเทียม

## ผลการทดลอง

### การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างแมลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัยจากทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยได้แก่ จังหวัดกรุงเทพฯ, พิษณุโลก, เชียงใหม่, ตาก, ชุมพร และบุรีรัมย์ (รูปที่ 1 และตารางที่ 1) โดยใช้วิธี fly trap ซึ่งมีขั้นตอนที่สำคัญดังนี้ เริ่มจากการใช้ดักหมูเป็นเหยื่อล่อในถุงพลาสติกเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้แมลงวันมาตอม แมลงวันที่จับได้จะถูกสลบโดยใช้ความเย็นที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการจําแนกสปีชีส์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (รุ่น SZX9, Olympus, Tokyo, Japan) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ ที่บรรยายโดย Crosskey และ Lane (Crosskey and Lane, 1993) เมื่อทำการระบุสปีชีส์เป็นที่เรียบร้อยแล้ว แมลงวันหัวเขียวจะถูกเก็บไว้ในหลอดทดลองที่มี 70% ethanol ที่ความเย็น 4 องศาเซลเซียสก่อนทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 3 แผนที่ประเทศไทยแสดงตำแหน่งที่มีการจับแมลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัย

#### การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากส่วนอกและขาของตัวอย่างแมลงวันหัวเขียวโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) ทำตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตได้ชี้แจง ดีเอ็นเอของแมลงวันที่สกัดได้จะถูกเก็บระยะยาวที่ความเย็น -20 องศาเซลเซียส และทำการหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรด้วย



เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์และทำการเจือจางให้ได้ค่าความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ก่อนเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

### การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณยีน mitochondrial cytochrome oxidase I-II โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ในขั้นตอนก่อนหน้านี้เป็นแม่พิมพ์ (template) และใช้ไพรเมอร์ (primer) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังต่อไปนี้: forward primer (5' GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCATCT 3') และ reverse primer (5' GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCATCT 3') (Wells and Sperling, 2001; Schroeder et al, 2003) ปฏิบัติการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 150 นาโนกรัม, forward และ reverse primer อย่างละ 0.4 ไมโครโมลาร์,  $MgCl_2$  2.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 200 ไมโครโมลาร์ และ Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) 1 ยูนิต โดยใช้เครื่อง GeneAmp PCR System 2400 thermal cycler (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA) ภายใต้อุณหภูมิดังต่อไปนี้: initial denaturation 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที, 30 รอบของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที, 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที, final extension 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis

Blowfly species	Sex	Location	Accession no.
<i>Chrysomya megacephala</i>			
A01	♂	Tak	FJ153258
A02	♀	Chiang-Mai	FJ153259
A03	♂	Chiang-Mai	FJ153260
A04	♂	Chiang-Mai	FJ153261
A05	♂	Chiang-Mai	FJ153262
A06	♀	Buri-Ram	FJ153263
A07	♀	Buri-Ram	FJ153264
A08	♀	Phitsanulok	FJ153265
A09	♂	Phitsanulok	FJ153266
A10	♂	Chumphon	FJ153267
A11	♂	Chumphon	FJ153268
A12	♀	Bangkok	FJ153269
<i>Chrysomya rufifacies</i>			
B01	♀	Bangkok	FJ153270
B02	♂	Bangkok	FJ153271
B03	♀	Phitsanulok	FJ153272
B04	♀	Chiang-Mai	FJ153273
B05	♂	Chiang-Mai	FJ153274
<i>Lucilia cuprina</i>			
C01	♀	Chiang-Mai	FJ153275
C02	♀	Chiang-Mai	FJ153276
C03	♂	Chiang-Mai	FJ153277
<i>Musca domestica</i> (outgroup)			
D01	♂	Bangkok	FJ153278

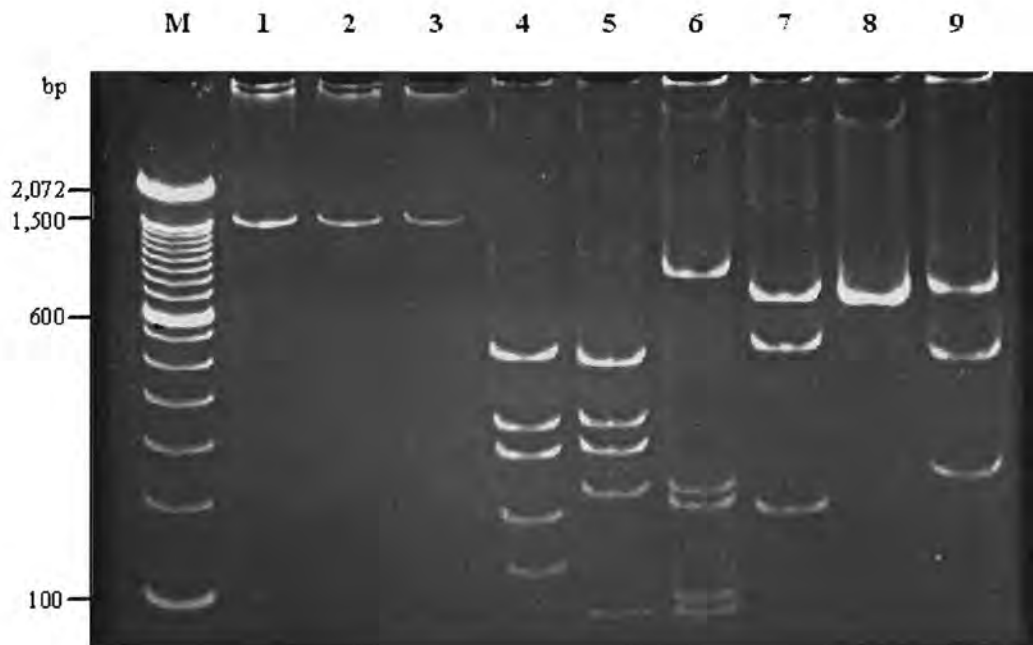
ตารางที่ 1 หมายเลข Code, เพศ, ตำแหน่งที่ทำการจับ และ accession number ของแมลงวันหัวเขียว

## การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการทำนายตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทำการสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค PCR ให้บริสุทธิ์จาก agarose gel โดยใช้ชุดสกัด Perfectprep<sup>®</sup> Gel Cleanup kit (Eppendorf, Germany) โดยทำตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตได้ชี้แจง และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct DNA sequencing จากดีเอ็นเอที่สกัดแยกบริสุทธิ์นี้ ด้วยชุด ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA) โดยใช้ไพรเมอร์เดียวกับเทคนิค PCR จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่อง automated ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Foster City, CA) และทำการหาลำดับตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้โปรแกรม NEBcutter V2.0 web-based programme (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) ซึ่งการวิเคราะห์พบว่า *Taq*<sup>α</sup>I และ *Vsp*I เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของแมลงวันหัวเขียวได้

## การแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทำการตัดดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*<sup>α</sup>I และ *Vsp*I (New England Biolabs, Ipswich, USA) โดยทำการตัดแยกหลอด ปฏิบัติการตัดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม, 10X บัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ยูนิตและทำการปรับปริมาตรให้ครบ 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่น (DNase-free water) และทำการตัดภายใต้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสสำหรับเอนไซม์ *Taq*<sup>α</sup>I และ 37 องศาเซลเซียสสำหรับเอนไซม์ *Vsp*I เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกดีเอ็นเอที่ได้หลังการตัดด้วยวิธี 6% native polyacrylamide gel electrophoresis (6% gel concentration (T), 3.3% crosslinking (C), 1X TBE buffer (89 mM Tris-base, 89 mM Boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3) (Maniatis et al, 2001) ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการย้อมดีเอ็นเอด้วยเอทิลเบรไมด์ (Ethidium bromide) และตรวจดูภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel Doc EQ system (Bio-Rad, CA, USA) ได้ผลแสดงดังรูปที่ 4 และตารางที่ 2



รูปที่ 4 6% native polyacrylamide gel แสดงรูปแบบของ PCR-RFLP ที่แตกต่างกันระหว่างสปีชีส์ของแมลงวันหัวเขียวเมื่อทำการตัด COI-COII PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ  $Taq^{\alpha}I$  และ  $VspI$  จากซ้ายไปขวาดังนี้: undigested PCR products from *C. megacephala*, *C. rufifacies* and *L. cuprina* respectively (lane 1-3); *C. megacephala/Taq^{\alpha}I* (lane 4); *C. rufifacies/Taq^{\alpha}I* (lane 5); *L. cuprina/Taq^{\alpha}I* (lane 6); *C. megacephala/VspI* (lane 7) ; *C. rufifacies/VspI* (lane 8); *L. cuprina/VspI* (lane 9). Lane M is 100 bp DNA standard marker.

Blowfly species	<i>Taq</i> <sup>®</sup> I digestion	<i>Vsp</i> I digestion
<i>Chrysomya megacephala</i>	30, 111, 156, 264, 307 and 456 bp	4, 12, 160, 495 and 653 bp
<i>Chrysomya rufifacies</i>	30, 81, 186, 264, 307 and 456 bp	12, 653 and 659 bp
<i>Lucilia cuprina</i>	30, 81, 86, 177, 188 and 762 bp	210, 450 and 664 bp

ตารางที่ 2 รูปแบบของ PCR-RFLP ที่แตกต่างกันระหว่างสปีชีส์แมลงวันหัวเขียว

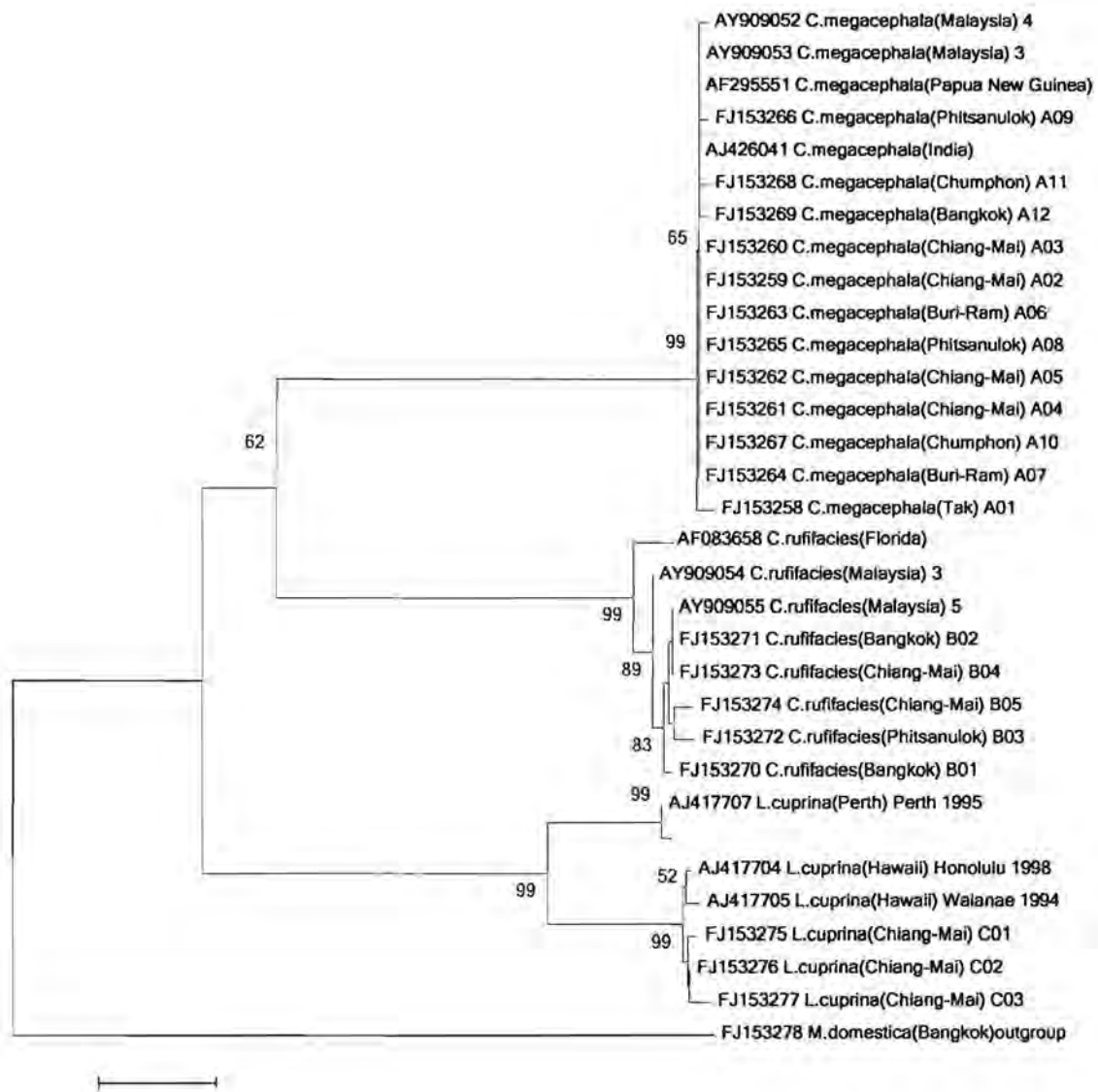
#### การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม Chromas Lite version 2.01 (<http://www.technelysium.com.au>) และ โปรแกรม BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) เพื่อการจำแนกสปีชีส์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษาครั้งนี้ ทั้งหมดจะถูกส่งเพื่อเก็บเป็นฐานข้อมูลของ GenBank database (accession number FJ153258-FJ153278) และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม Clustal W algorithm (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) นอกจากนี้ยังวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ G+C และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสองตัวอย่าง (รูปที่ 5) ด้วยโปรแกรม Bioedit จากนั้นทำการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (รูปที่ 6) ด้วยวิธี neighbor-joining (Kimura's 2-parameter model) โดยใช้โปรแกรม MEGA<sup>®</sup> version 3.1 และทดสอบความถูกต้องด้วย 1000 bootstrap replicates (Kumar et al, 2004)

Code	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12	B01	B02	B03	B04	B05	C01	C02	C03	
A01																					
A02	99.8																				
A03	99.8	100																			
A04	99.8	100	100																		
A05	99.8	100	100	100																	
A06	99.8	100	100	100	100																
A07	99.8	100	100	100	100	100															
A08	99.8	100	100	100	100	100	100														
A09	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9													
A10	99.8	100	100	100	100	100	100	100	99.9												
A11	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9											
A12	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9	99.8										
B01	93.1	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.2	93.3	93.2	93.2									
B02	93.1	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.2	93.3	93.2	93.2	99.8								
B03	93	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93	93.1	93	93	99.6	99.6							
B04	93.1	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.2	93.3	93.2	93.2	99.8	100	99.6						
B05	93	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93	93.1	93	93	99.6	99.8	99.6	99.8					
C01	60.1	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60.1	60	60	60.1	60.2	60.1	60.1				
C02	60.2	60.1	60.1	60.1	60.1	60.1	60.1	60.1	60	60.1	60.2	60	60.1	60.2	60.3	60.2	60.2	99.9			
C03	60.1	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60.1	60	60	60.1	60.2	60.1	60.1	99.7	99.8		
D01	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	58.4	58.4	58.3	58.4	58.3	53.3	53.2	53.4	

A01–A12, *Chrysomya megacephala*; B01–B05, *Chrysomya nufifacies*; C01–C03, *Lucilia cuprina*; D01, *Musca domestica*.

รูปที่ 5 Identity matrix แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสองตัวอย่าง



รูปที่ 6 แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างแมลงวันของทั้ง 3 สปีชีส์โดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COI-COII

การเลี้ยงหนอนแมลงวันและเทคนิควิธีปราศจากเชื้อ

การก่อตั้งสายพันธุ์แมลงวันหัวเขียว (เนื่องจากการสำรวจไม่พบ *L. sericata* จึงใช้ *C. megacephala* แทน)

-วางพลาสติกหนึ่งชั้นไว้ในกรงของแมลงวันแล้วรอเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง เพื่อรอให้แมลงวันวางไข่



รูปที่ 7 การล่อให้แมลงวันหัวเขียววางไข่

-ใส่จี๊เลี้ยงหรือขุยจากไม้/ขุยมะพร้าว ในกรงให้ได้ปริมาตร 1/3 ของพื้นที่กรงที่มีความยาว 15 เซนติเมตร ฝาปิดกรงตาข่ายเหล็ก (metal netting) ควรมีความกว้างพอสมควร

-นำดับที่มีไข่แมลงวันมาวางไว้ด้วยกันกับดับสดน้ำหนัก 50 กรัม อีกชั้นหนึ่ง แล้วห่อด้วยกระดาษฟอยล์ จากนั้นนำไปวางไว้ด้านบนของกรงที่บรรจุจี๊เลี้ยงหรือขุยมะพร้าว

-บ่ม (Incubate) เอาไว้ที่อุณหภูมิ 25-26°C เป็นเวลา 5-6 วันเพื่อรอให้หนอนแมลงวันเข้าสู่ระยะดักแด้ หลังจากพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงระยะแล้ว ให้เอาชั้นดับที่ยังเหลืออยู่ออกจากกรง

-เก็บดักแด้ของแมลงวันและขุยมะพร้าวอันเดิมใส่ลงในแก้วพลาสติกหรือภาชนะบรรจุพลาสติกที่มีความสูง 5 เซนติเมตร กว้าง 9 เซนติเมตร แล้วนำไปวางไว้ในกรงเพื่อรอการ



ออกจากคักแต่เป็นแมลงวัน ครงควรมีขนาด 30×30×30 เซ็นติเมตร เพื่อที่ให้องรับแมลงวัน  
จำนวน 1,000-1,500 ตัวได้

-การเลี้ยงแมลงวันตัวเต็มวัย ใช้น้ำหวานวางในครงตลอดเวลาและดับสัปดาห์ละสองครั้ง

-แมลงวันตัวเมียพร้อมเริ่มวางไข่หลังจากเป็นตัวเต็มวัยแล้วประมาณ 1 สัปดาห์ และ  
แมลงวันสามารถวางไข่ได้ปริมาณมาก เมื่อแมลงมีอายุ 1 เดือนแรก ดังนั้นถ้าหากต้องการ  
เลี้ยงแมลงวันรุ่นต่อไปควรจะต้องทราบว่าแมลงวันสามารถวางไข่ได้ถึง 1 เดือนครึ่ง

-ควรทำความสะอาดครงแมลงวันเพื่อใช้เลี้ยงรุ่นต่อไปทุก 1 เดือนครึ่งถึงสองเดือน

**การเก็บไข่แมลงวันและการทำการปราศจากเชื้อ (Collection and Sterilization of the eggs)**



**รูปที่ 8 ไข่แมลงวันหัวเขียว (ลูกศร)**

-วาง Petri dish ที่มีพลาสติก ในครงแมลงวัน

-จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ให้เอาดับที่มีไข่ของแมลงวันออกจากครง



A



B

รูปที่ 9 ไข่แมลงวันหัวเขียวเมื่อแยกไว้ในจานปลอดเชื้อ (A) และในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 0.05% โซเดียมไฮโปคลอไรด์

-เก็บไข่ออกจากปลาใส่ลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 0.05% โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ปริมาตร 35 มิลลิลิตร เพื่อแยกไข่ที่ติดกันเป็นกลุ่มออกจากกัน แล้วเขย่าประมาณ 15 นาที ด้วยมือ และวางไว้ 1 นาที กระทั่งไข่ตกลงไปนอนที่ก้นหลอดทดลอง จากนั้นค่อยๆ เทสารละลายออกอย่างระมัดระวัง แล้วเติมสารละลาย 5%

ฟอร์มาลดีไฮด์ ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเดิม แล้วเขย่าสารละลายด้วยมือ ประมาณ 5 นาที

-ล้างไข่ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 3-4 ครั้ง ในตู้ปราศจากเชื้อ (Hood)

-เก็บไข่จากหลอดทดลองประมาณ 500 ฟอง มาวางใน อาหารเลี้ยงหมอนแมลงวันทีเตรียมจากตับ

-ใช้คีบ (Forceps) กรีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลายๆทาง เพื่อให้หมอนแมลงวันหลังฟักจากรยะไข่สามารถที่จะไข่เข้าไปในอาหารได้

-ปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Petri dish ให้แน่นด้วยแผ่นพาราฟิล์ม

การทำหมอนแมลงวันให้ปราศจากเชื้อ

-อบไข่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30°C ตลอดทั้งคืน

-หมอนแมลงวันจะเริ่มฟักตัวหลังจากนั้นประมาณ 10-12 ชั่วโมง

-แล้วนำหนอนแมลงวันมาอบที่ 25-30°C เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Blood agar, Chocolate agar และ Thioglycollate broth เพื่อทดสอบว่าการล้างที่ผ่านมามีปราศจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นหรือไม่



#### รูปที่ 10 หนอนแมลงวันหัวเขียวที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเทียม

-หนอนแมลงวันในจานอาหารเลี้ยงที่ยังไม่นำมาใช้ ให้เก็บไว้ที่ตู้เย็น 5-6°C ทันที ซึ่งทำให้แมลงวันยังมีชีวิตรอดอยู่ได้ 5-6 วัน

-หนอนแมลงวันที่ต้องการนำมาใช้ควรอบต่อประมาณ 2-3 วัน ที่อุณหภูมิ 30-35°C กระทั่งหนอนมีขนาดโตพอกระทั่งสามารถนำหนอนออกจากจานอาหารเลี้ยงเพื่อนำไปใส่กล่องพลาสติกที่บรรจุขุยมะพร้าวต่อไป สำหรับอาหารและหนอนสามารถจะถ่ายไปยังจาน Petri dish ใหม่ได้เพื่อให้หนอนได้รับอาหารและออกซิเจนที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต ก่อนที่จะนำหนอนดังกล่าวไปวางในกล่องขุยมะพร้าว วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่ป้องกันการเกิดกลิ่นจากการเน่าของอาหารที่มีดักเป็นส่วนประกอบ

#### การเก็บตัวหนอนแมลงวันจากอาหารเลี้ยง (Harvesting of maggots from the medium)

-เทน้ำกลั่นลงบนจานอาหารที่มีหนอนแมลงวัน

- ตัดวุ้นอาหารออกเป็น 4 ชิ้น และออกจากจานแล้วแกะเอาหนอนลงในน้ำจนหมด
- ถ่ายหนอนทั้งหมดลงในภาชนะที่ปราศจากเชื้อใบใหม่โดยที่ส่วนฐานภาชนะถูกแบ่งออกเป็น 8 ช่อง เพื่อให้ง่ายต่อการแบ่งจำนวนของหนอน
- รินน้ำออกแล้วเติมน้ำสะอาดลงใหม่ ขั้นตอนการล้างดังกล่าวให้ทำซ้ำกระทั่งเศษวุ้นอาหารและเปลือกไข่ถูกชะล้างออกจากตัวหนอนจนหมด
- ใช้คีมคีบและใช้ Pasteur pipette คูด เศษวุ้นอาหาร เปลือกไข่ และตัวหนอนที่ตายออก
- นับจำนวนหนอนแมลงวัน
- กรองตัวหนอนที่อยู่ได้ภาชนะด้วยตาข่ายไนลอน
- รินน้ำกลับลงไปอีกแล้วกรองอีกครั้ง
- ซับน้ำส่วนเกินด้วยกระดาษที่ปราศจากเชื้อ
- เก็บหนอนที่ล้างสะอาดแล้วด้วยคีมปราศจากเชื้อ ใส่หลอดทดลองปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- หากยังไม่ใช้หนอนควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5-10°C ประมาณ 1-2 ชั่วโมงทันที

สารละลายและอาหารเลี้ยงหนอนแมลงวันและแมลงวัน

#### 1. น้ำหวาน

- เติมสารละลายน้ำหวาน 20% Sugar water ใน 100 Erlenmeyer flask และปิดจุกขวดด้วยไม้ตะเกียบขด

#### 2. โซเดียมไฮโปคลอไรด์

0.05% โซเดียมไฮโปคลอไรด์

- เติม 10% โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร

#### 3. สารละลาย 5% ฟอรั่มัลดีไฮด์

- เติม 35% ฟอรั่มัลดีไฮด์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงใน น้ำกลั่น ปริมาตร 600 มิลลิลิตร

#### 4. สารละลาย กานามัยซินซัลเฟต

-ละลาย Kanamycin monosulfate (Sigma, Kanamycin A, K-1377) 2 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

-ทำการปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน ฟิลเตอร์ (millipore filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร) แล้วแบ่งใส่หลอดละ 4.2 มิลลิลิตรและเก็บด้วยการแช่แข็ง

#### 5. โพลีมัยซินบีซัลเฟต (Polymycin B sulfate)

-ละลาย โพลีมัยซินบีซัลเฟต (Sigma, Polymycin B sulfate, P-1004) 500 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

-ทำการปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน ฟิลเตอร์ (millipore filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร) แล้วแบ่งใส่หลอดละ 4.2 มิลลิลิตรและเก็บด้วยการแช่แข็ง

#### 6. ฐานอาหารเลี้ยงหมอนเตรียมจากตับ (Liver Agar Medium)

##### -อุปกรณ์

-ตับ เครื่องปั่น แท่งคน งานพลาสติกใช้ครั้งเดียว กระจกตวงใช้สำหรับตวง สารละลายปริมาตรไม่เกิน 2 ลิตร ตาชั่ง ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไม้ตะเกียบ เข็มผูก ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และ 1 ลิตร แถบกาบ (autoclave tape) กรวยพลาสติกขนาดเล็กและขนาดใหญ่ปากกว้าง ปากกาเขียนฉลาก

##### -วิธีเตรียม

-ล้างตับหมู น้ำหนัก 2000 กรัม ด้วยน้ำเพื่อเอาไขมันและเส้นเลือดออก

-ปั่นบดตับน้ำหนัก 2000 กรัม เติมน้ำในขวดชมพู่ขนาด 3000 หรือ 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำลงไป 2526 มิลลิลิตร

-เติมผงวุ้น (3.5%) สำหรับกรณีดังกล่าวเติม 88.4 กรัม ลงในน้ำ จากนั้นนำไปตั้งบน Hot plate ใช้แท่งแก้วคนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) คนกระทั่งวุ้นละลายหมด (ข้อสังเกต: เติมผงวุ้นลงน้ำเสมอและ not vice versa) แล้วเติมน้ำวุ้นลงในบีกเกอร์ขนาดปริมาตร 5000

มิลลิลิตร ที่มีดับบคละเอียด ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งเทลงขวดชมพู่ขนาด 1 ลิตร ด้วย ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ต่อขวด และแบ่งเทลงขวดชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยปริมาตร 200 มิลลิลิตร ต่อขวด จากนั้นปิดจุกขวดแต่ละขวดด้วยขดผ้าซึ่งหุ้มด้วยผ้าก๊อซอีกชั้น คลุม ด้วยกระดาษและมัดด้วยเชือก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยตู้อบความร้อนสูงด้วยไอน้ำ (Autoclave) หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นลงแล้วนำไปเก็บแช่เย็นที่ตู้เย็น เมื่อต้องการจะนำไปใช้ ให้นำมาอบฆ่าเชื้อประมาณ 15 นาที แล้วผสมให้เข้ากันเพื่อให้ดับส่วนที่ติดอยู่ด้านข้างขวด ผสมกับส่วนอื่นๆ ได้ ปล่อยให้เย็นกระทั่งสามารถเทลงในจาน Petri dish ได้ ก่อนนำไปเลี้ยง หนองให้เติมยา Kanamycin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และยา Polymycin B sulfate ต่ออาหาร เลี้ยงหนอง 100 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

-เทอาหารวุ้นลงในจาน Petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ด้วยปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้เย็นลงแล้วนำไปเก็บด้วยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C อาหารวุ้นที่เตรียมใน Petri dish แต่ละครั้งเมื่อแช่เย็นสามารถเก็บได้ 2-3 สัปดาห์

-อาหารวุ้นในขวดชมพู่ที่ยังไม่ต้องการใช้สามารถเก็บแช่เย็นไว้ได้หลายเดือน

## อภิปรายและวิจารณ์ผล

การสำรวจแมลงวันหัวเขียวจากการใช้กับดักล่อจากภูมิภาคต่างๆของประเทศพบแมลงวันหัวเขียวสำคัญ 3 ชนิดคือ *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies* และ *Lucilia cuprina* แต่ไม่สามารถพบชนิด *Lucillia sericata* เหมือนที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Tumrasvin et al, 1976) ทั้งนี้การตรวจสอบชนิดของแมลงวันหัวเขียวได้ทำทั้งโดยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางอณูชีววิทยาช่วยยืนยันการจำแนกชนิด โดยปกติแล้วแมลงวันหัวเขียว *Lucillia sericata* เป็นแมลงวันหัวเขียวที่พบได้บ่อยในทางยุโรปและอเมริกาและมักพบบนเนื้อที่เน่าและบนศพ แต่จากการตรวจสอบรายงานวิจัยถึงแมลงวันบนศพทั้งในกรุงเทพมหานคร (เป็นการศึกษาของคณะผู้วิจัย) และจังหวัดเชียงใหม่ (Sukontasorn et al, 2001, 2005) ยังไม่เคยพบแมลงวันหัวเขียวชนิดนี้มาก่อน แต่พบ 3 ชนิดที่รายงานไว้ในงานวิจัยนี้ อาจสามารถตั้งสมมุติฐานได้ว่ารายงานที่มีมาก่อนอาจเกิดความผิดพลาดในการจำแนกชนิดซึ่งอาศัยเพียงการจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาท่านั้น หรือเป็นไปได้ว่าแมลงวันหัวเขียว *Lucillia sericata* ถูกประชากรแมลงวันชนิดอื่นซึ่งเจริญเติบโตได้ดีกว่าทดแทนจนหมดจากธรรมชาติไป

การศึกษาทางอณูชีววิทยาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน cytochrome oxidase ได้ในทั้ง 3 ชนิดของแมลงวันหัวเขียวโดยใช้ primers ที่จำเพาะ (Wells and Sperling, 2001; Schroeder et al, 2003) และสามารถจำแนกชนิดของแมลงวันหัวเขียวทั้ง 3 ชนิดนี้ได้โดยดูจากรูปแบบของ DNA ที่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ *Taq*<sup>α</sup> I หรือ *VspI* (รูปที่ 4) ด้วยวิธีการนี้ทำให้เกิดความสะดวกในการจำแนกชนิดของแมลงวันโดยไม่ต้องหาลำดับเบส ผลการการสำรวจและจากการทดลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับศาสตร์ทางนิติวิทยาศาสตร์ได้ กล่าวคือแมลงวันหัวเขียวทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นแมลงวันหัวเขียวที่พบบ่อยบนศพ การบ่งบอกชนิดของหนอนแมลงวันหัวเขียวบนศพสามารถใช้เป็นหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ เช่นการเคลื่อนย้ายศพจากแหล่งที่มีแมลงวันหัวเขียวบางพื้นที่ไปสู่พื้นที่ที่ไม่มีแมลงวันหัวเขียวชนิดนั้นอยู่ก็สามารถบ่งบอกว่าการย้ายศพจากแหล่งหนึ่งไปสู่อีกแหล่งหนึ่ง

รวมทั้งสามารถนำมาประมาณเวลาตายของศพซึ่งแมลงวันหัวเขียวแต่ละชนิดจะมีเวลาในการเจริญที่แตกต่างกัน ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้รายงานการศึกษานี้ไว้ในวารสาร Forensic Science International ซึ่งได้รับการตอบรับเพื่อตีพิมพ์แล้ว (Appendix) (Preativatanyou et al, 2010)

สำหรับการเลี้ยงหนอนแมลงวันหัวเขียวเพื่อทำให้ปลอดเชื้อ เนื่องจากจากการศึกษาไม่สามารถพบแมลงวันหัวเขียวชนิด *Lucillia sericata* คณะผู้วิจัยจึงได้ใช้แมลงวันหัวเขียวชนิด *Chrysomya megacephala* แทน การวิจารณ์ผลในเชิงอนุชีววิทยาและการไม่สามารถตรวจพบ *Lucillia sericata* สามารถอ่านเพิ่มเติมได้จาก Preativatanyou et al, 2010



## สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จุดประสงค์ที่สำคัญของงานวิจัยนี้เพื่อทำการสำรวจชนิดของแมลงวันหัวเขียวชนิด *Lucillia sericata* เพื่อก่อตั้งสายพันธุ์สำหรับการรักษาบาดแผลผู้ป่วย ถึงแม้ว่าจะไม่บรรลุวัตถุประสงค์ตามที่ตั้งไว้ เนื่องจากการสำรวจไม่พบแมลงวันหัวเขียว *Lucillia sericata* ซึ่งเคยเชื่อกันมาก่อนว่าสามารถพบแมลงวันหัวเขียวชนิดนี้ในประเทศไทยมาก่อน อย่างไรก็ตามผลจากการวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญ โดยเฉพาะการกระจายตัวและชนิดของแมลงวันหัวเขียวในประเทศไทยซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นชนิด *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies* และ *Lucilia cuprina* โดยการศึกษาทางอนุชีววิทยาของแมลงวันหัวเขียวครั้งนี้ นับเป็นรายงานข้อมูลนี้ครั้งแรกในประเทศไทย ประโยชน์อันเกิดจากการวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นข้อมูลที่สำคัญทางนิติเวชศาสตร์ เนื่องจากแมลงวันหัวเขียวเหล่านี้มาเกี่ยวข้องกับศพทำให้สามารถนำมาประมาณเวลาตายของศพ และในกรณีที่มีการเคลื่อนย้ายศพจากแหล่งที่มาของศพ โดยอาศัยข้อมูลพันธุกรรมของแมลงวันหัวเขียวในแต่ละภูมิภาคของประเทศ

ในส่วนของการเลี้ยงหนอนแมลงวันที่ปราศจากเชื้อ คณะผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์อาหารเลี้ยงเชื้อเทียมซึ่งสามารถเลี้ยงหนอนแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* ได้โดยไม่พบว่ามีอาการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงและในหนอน โดยกระบวนการทำให้หนอนแมลงวันปราศจากเชื้อไม่ทำให้อัตราการฟักของไข่แมลงวันลดลง หนอนแมลงวันสามารถเจริญในอาหารเทียมจนเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ อาหารเทียมที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญจึงไม่มีกลิ่นเหม็นสามารถเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ ระบบที่ทำการเลี้ยงนี้จึงนับได้ว่าพร้อมสำหรับการเลี้ยงแมลงวันหัวเขียวที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรียได้ และต้นทุนการเลี้ยงนับว่าถูกมากเมื่อเทียบกับการนำเข้าหนอนจากต่างประเทศ คณะผู้วิจัยยังคงทำการสำรวจเพื่อหาแมลงวันหัวเขียว *Lucillia sericata* ซึ่งอาจมีอยู่ในบางภูมิภาคของประเทศ ขณะเดียวกันได้ติดต่อกับผู้วิจัยต่างประเทศซึ่งเลี้ยงแมลงวันหัวเขียวชนิดนี้เพื่อขอสายพันธุ์มาเลี้ยงในประเทศไทยต่อไป

## บรรณานุกรม

Ames C, Turner B, Daniel B, The use of mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) to differentiate two UK blowfly species: *Calliphora vicina* and *Calliphora vomitoria*, Forensic Sci. Int. 164 (2006) 179-182.

Benecke M, Wells JD, DNA techniques for forensic entomology analysis, in: J. H. Byrd, J.L. Castner (Eds.), Forensic Entomology: Utility of Arthropods in Legal Investigations, CRC Press, Boca Raton. (2001) 341-352.

Boonchu N, Piangjai S, Sukontason KL, Sukontason K, Comparison of the effectiveness of baits used in traps for adult fly collection, Southeast Asian J Trop Med Public Health. 34 (3) (2003) 630-633.

Brin YS, Mumcuoglu KY, Massarwe S, Wigelman M, Gross E, Nyska M. Chronic foot ulcer management using maggot debridement and topical negative pressure therapy. J Wound Care. 2007 Mar;16(3):111-3.

Chan DC, Fong DH, Leung JY, Patil NG, Leung GK. Maggot debridement therapy in chronic wound care. Hong Kong Med J. 2007 Oct;13(5):382-6.

Catts EP, Analyzing entomological data, in: E.P. Catts, N.H. Haskell (Eds.), Entomology and Death: A Procedural Guide, Joyce's Print Shop, Clemson, SC. (1990) 124-137.

Crosskey RW, Lane RP, House-flies, blow-flies and their allies (calypterate Diptera), in: Lane RP and Crosskey RW (Eds.), Medical Insects and Arachnids, Chapman and Hall, London (1993) 403-428.

Collier M. The use of advanced biological and tissue-engineered wound products. *Nurs Stand.* 2006 Oct 25-31;21(7):68, 70, 72 passim. Review.

Kumar S, Tamura K, Nei M, MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment, *Brief. Bioinform.* 5 (2004) 150-163.

James C. Use of sterile maggots in an unusual trauma injury. *Br J Nurs.* 2007 Mar 22-Apr 11;16(6):S30-1.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3 rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001, 5.40.

Nigam Y, Bexfield A, Thomas S, Ratcliffe NA. Maggot Therapy: The Science and Implication for CAM Part II-Maggots Combat Infection. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006 Sep;3(3):303-8.

Richardson M. The benefits of larval therapy in wound care. *Nurs Stand.* 2004 Oct 27-Nov 2;19(7):70, 72, 74 passim. Review.

Raynor P, Dumville J, Cullum N. A new clinical trial of the effect of larval therapy. *J Tissue Viability.* 2004 Jul;14(3):104-5.

Schroeder H, Klotzbach H, Elias S, Augustin C, Pueschel K, Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses, *Forensic Sci. Int.* 132 (2003) 76-81.

Sherman RA. Age-old therapy gets new approval. *Adv Skin Wound Care*. 2005 Jan-Feb;18(1):12-5.

Sherman RA. Maggot therapy for foot and leg wounds. *Int J Low Extrem Wounds*. 2002 Jun;1(2):135-42.

Smith AG, Powis RA, Pritchard DI, Britland ST. Greenbottle (*Lucilia sericata*) larval secretions delivered from a prototype hydrogel wound dressing accelerate the closure of model wounds. *Biotechnol Prog*. 2006 Nov-Dec;22(6):1690-6.

Steenvoorde P, Budding T, Oskam J. Determining pain levels in patients treated with maggot debridement therapy. *J Wound Care*. 2005 Nov;14(10):485-8. Erratum in: *J Wound Care*. 2006 Feb;15(2):71.

Steenvoorde P, Jukema GN. The antimicrobial activity of maggots: in-vivo results. *J Tissue Viability*. 2004 Jul;14(3):97-101.

Steenvoorde P, Oskam J. Use of larval therapy to combat infection after breast-conserving surgery. *J Wound Care*. 2005 May;14(5):212-3.

Steenvoorde P, van Doorn LP, Jacobi CE, Oskam J. Maggot debridement therapy in the palliative setting. *Am J Hosp Palliat Care*. 2007 Aug-Sep;24(4):308-10.

Sukontason K, Narongchai P, Kanchai C, Vichairat K, Sribanditmongkol P, Bhoopat T, Kurahashi H, Chockjamsai M, Piangjai S, Bunchu N, Vongvivach S, Samai W, Chaiwong T, Methanitikorn R, Ngern-Klun R, Sripakdee D, Boonsriwong W, Siri wattanarungsee S,

Srimuangwong C, Hanterdsith B, Chaiwan K, Srisuwan C, Upakut S, Moopayak K, Vogtsberger RC, Olson JK, Sukontason KL, Forensic entomology cases in Thailand: a review of cases from 2000 to 2006, *Parasitol Res.* 101 (5) (2007) 1417-1423.

Sukontason KL, Narongchai P, Sripakdee D, Boonchu N, Chaiwong T, Ngern-Klun R, Piangjai S, Sukontason K, First report of human myiasis caused by *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) in Thailand, and its implication in forensic entomology, *J. Med. Entomol.* 42 (2005) 702-704.

Sukontason KL, Sukontason K, Narongchai P, Lertthamnongtham S, Piangjai S, Olson JK, *Chrysomya rufifacies* (Macquart) as a forensically-important fly species in Thailand: a case report, *J. Vector. Ecol.* 26 (2001) 162-164.

Sukontason KL, Vogtsberger RC, Boonchu N, Chaiwong T, Sripakdee D, Ngern-Klun R, Piangjai S, Sukontason K, Larval morphology of *Chrysomya nigripes* (Diptera: Calliphoridae), a fly species of forensic importance, *J. Med. Entomol.* 42 (2005) 233-240.

Tanyuksel M, Araz E, Dundar K, Uzun G, Gumus T, Alten B, Saylam F, Taylan-Ozkan A, Mumcuoglu KY. Maggot debridement therapy in the treatment of chronic wounds in a military hospital setup in Turkey. *Dermatology.* 2005;210(2):115-8.

Thomas S. Cost of managing chronic wounds in the U.K., with particular emphasis on maggot debridement therapy. *J Wound Care.* 2006 Nov;15(10):465-9. Review.

Tumrasvin W, Kurahashi H, Kano R, Studies on medically important flies in Thailand. I. Discovery of *Calliphora* species first in Thailand (Diptera: Calliphoridae). Bull. Tokyo. Med. Dent. Univ. 23(4) (1976) 211-6.

Wells JD, Sperling FAH, DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae), Forensic Sci. Int. 120 (2001) 110-115.

Whitaker IS, Twine C, Whitaker MJ, Welck M, Brown CS, Shandall A. Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential. Postgrad Med J. 2007 Jun;83(980):409-13. Review.

Whitaker IS, Welck M, Whitaker MJ, Conroy FJ. From the Bible to biosurgery: *Lucilia sericata* plastic surgeon's assistant in the 21st century. Plast Reconstr Surg. 2006 Apr 15;117(5):1670-1.

Wolff H, Hansson C. Rearing larvae of *Lucilia sericata* for chronic ulcer treatment--an improved method. Acta Derm Venereol. 2005;85(2):126-31.

## Appendix



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/forsciint](http://www.elsevier.com/locate/forsciint)



## Mitochondrial DNA-based identification of some forensically important blowflies in Thailand

Kanok Preativatanyou<sup>a</sup>, Nantana Sirisup<sup>b</sup>, Sunchai Payungporn<sup>c,d</sup>, Yong Poovorawan<sup>d</sup>, Usavadee Thavara<sup>e</sup>, Apiwat Tawatsin<sup>e</sup>, Sivapong Sungpradit<sup>f</sup>, Padet Siriyasatien<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama IV Road, Bangkok 10330, Thailand

<sup>b</sup> Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>c</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>d</sup> Center of Excellence in Clinical Virology Unit, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>e</sup> Department of Medical Science, National Institute of Health, Nonthaburi 11000, Thailand

<sup>f</sup> Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Nakhonpathom 73170, Thailand

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 January 2009

Received in revised form 10 March 2010

Accepted 26 April 2010

Available online xxx

#### Keywords:

Mitochondrial DNA

Cytochrome oxidase

PCR-RFLP

Blowflies

Phylogenetic analysis

### ABSTRACT

Accurate identification of insects collected from death scenes provides not only specific developmental data assisting forensic entomologists to determine the postmortem interval more precisely but also other kinds of forensic evidence. However, morphological identification can be complicated due to the similarity among species, especially in the early larval stages. To simplify and make the species identification more practical and reliable, DNA-based identification is preferentially considered. In this study, we demonstrate the application of partial mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) and cytochrome oxidase II (COII) sequences for differentiation of forensically important blowflies in Thailand; *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya rufifacies* and *Lucilia cuprina* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The PCR yields a single 1324 bp-sized amplicon in all blowfly specimens, followed by direct DNA sequencing. Taq<sup>91</sup> and VspI predicted from the sequencing data provide different RFLP profiles among these three species. Sequence analysis reveals no significant intraspecific divergence in blowfly specimens captured from different geographical regions in Thailand. Accordingly, neighbor-joining tree using Kimura's 2-parameter model illustrates reciprocal monophyly between species. Thus, these approaches serve as promising tools for molecular identification of these three common forensically important blowfly species in Thailand.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Estimation of postmortem interval (PMI) is crucial for time of death determination. Some physiological changes such as body cooling, lividity, and mechanical excitability of skeletal muscle have been used to calculate the early postmortem period. However, such postmortem changes may not be a reliable parameter for approximation of PMI after 48–72 h. After decomposition is initiated, developmental period from hatching to larval stage of insects collected from corpses is the best evidence for PMI estimation [1].

Blowflies play a role in the early decomposition process because of their great abundance and behaviours including feeding and egg laying on corpses. Unsurprisingly, blowfly larvae are usually collected from death scenes and also determined as the best

entomological indicator for PMI estimation. The challenging step for forensic entomologists is larval species identification because many morphological similarities among closely related species make difficulties in definite differentiation. A taxonomic key covering all immature stages of common forensically important insect species in all geographical regions is yet unavailable. Although electron microscopy-based identification of some chrysomyine larval stages has been proposed [2], it is not practical and requires many special skills for sample preparation. Alternatively, rearing larvae to the adult stage followed by traditional identification based on the adult morphological characteristics can be performed, but rearing is a time-consuming procedure. Moreover, specimens may be killed or damaged before arrival at the laboratory.

Several studies using DNA-based identification of some forensically important blowfly specimens have been reported [3–7]. These molecular tools can overcome many difficulties associated with morphological problems as previously described. At present, mitochondrial DNA (mtDNA) is preferably applied for

\* Corresponding author. Tel.: +66 2 256 4387; fax: +66 2 252 5944.  
E-mail address: [Padet.S@Chula.ac.th](mailto:Padet.S@Chula.ac.th) (P. Siriyasatien).



forensic investigations because greater abundance in tissues, when compared with nuclear DNA (nuDNA), makes it easier for extraction even from small amount of sample [6]. In addition, because of its strictly maternal inheritance and no genetic recombination, mtDNA haplotype is a good candidate for evolutionary and population genetics study. Especially, mitochondrial cytochrome oxidase I and II (COI–COII) genes are suitable as molecular markers because relatively a high degree of genetic variation in this region has been reported [6,7].

*Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* are the most common blowfly species in all locations of Thailand and have been extensively documented from forensic cases in both urban and forested areas [8]. *Lucilia cuprina* is another species of forensic interest since it can be found in both urban and forested locations, although less frequently than *Chrysomya* species. Interestingly, it has also been reported that this blowfly species can be found with *C. megacephala* and *C. rufifacies* in the same cadavers [8]. It should be mentioned, however, that molecular identification and genetic relationships of these three blowfly species of forensic importance have not been reported before. Therefore, our approach is to demonstrate the utility of mitochondrial cytochrome oxidase genes for identification purpose and phylogenetic analysis of these three common forensically important blowflies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Specimens collection

Adult blowfly specimens were collected from various regions of Thailand including Bangkok, Phitsanulok, Chiang-Mai, Tak, Chumphon and Buri-Ram (Fig. 1) using fly-trap method as previously described [9]. Briefly, pork viscera were used as baits for trapping blowflies in a large plastic bag for 24 h. Flies were anesthetized in a freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 1 h and then identified morphologically under a stereomicroscope (SZX9, Olympus, Tokyo, Japan), by reference to the taxonomic key of Crosskey and Lane [10]. The identified flies were stored in 70% ethanol and kept at  $4^{\circ}\text{C}$  until use.

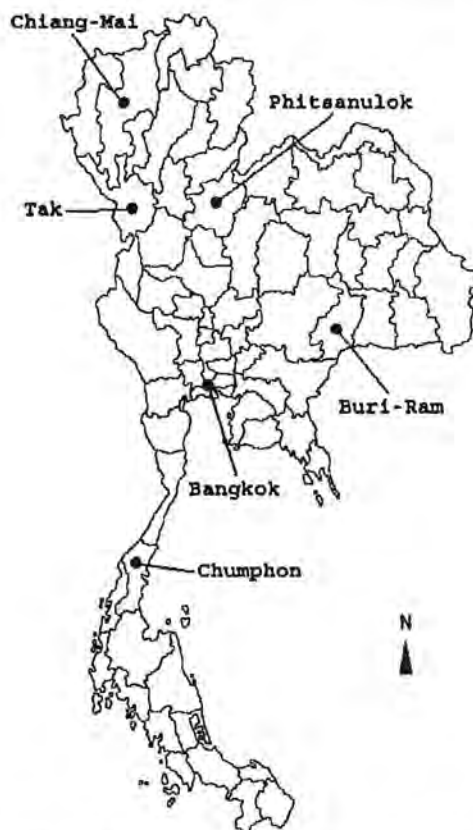


Fig. 1. Map of Thailand, showing the locations for collection of blowfly specimens.

### 2.2. DNA extraction

Total DNA was prepared from thorax and legs of the fly specimens using QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) following the manufacturer's instructions. The extracted fly DNA was eluted in  $200\ \mu\text{l}$  of elution buffer and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  for long term storage. The fraction of extracted DNA was spectrophotometrically quantitated and diluted to  $50\ \text{ng}/\mu\text{l}$  prior to PCR amplification step.

### 2.3. PCR amplification

Using the total DNA as a template, partial COI–COII region was amplified. Two oligonucleotide primers including forward primer (5'-CAGTACTTTATGAGCTT-TAGG-3') and reverse primer (5'-GAGACCATTACTTGCITTCAGTCATCT-3') were designed following previous studies [3,7]. The amplification reaction was set up in a final volume of  $25\ \mu\text{l}$ , containing  $150\ \text{ng}$  of extracted DNA,  $0.4\ \mu\text{M}$  of each primer,  $2.5\ \text{mM}$  of  $\text{MgCl}_2$ ,  $200\ \mu\text{M}$  of dNTPs and 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). The PCR reactions were performed in a GeneAmp PCR System 2400 thermal cycler (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA) using the condition as follows: the initial denaturation ( $94^{\circ}\text{C}$  for 3 min); the subsequent 5 cycles consisted of  $94^{\circ}\text{C}$  for 45 s,  $56^{\circ}\text{C}$  for 45 s and  $72^{\circ}\text{C}$  for 1.5 min; followed by 25 cycles of  $94^{\circ}\text{C}$  for 45 s,  $60^{\circ}\text{C}$  for 45 s and  $72^{\circ}\text{C}$  for 1.5 min; and the final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Aliquots of the amplicons were detected on 1% agarose gel electrophoresis.

### 2.4. DNA sequencing and restriction patterns prediction

In order to verify unique restriction sites for PCR-RFLP, the PCR products were purified from agarose gel by using a Perfectprep<sup>®</sup> Gel Cleanup kit (Eppendorf, Germany) following the manufacturer's instructions. Direct DNA sequencing was performed by using ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PerkinElmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA). Determination of the nucleotide sequences was performed and analyzed in both directions using the same forward and reverse primers used in PCR step to ensure that variations of nucleotide sequences were not due to sequencing errors. The reaction products were analyzed with an automated ABI PRISM<sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer (PerkinElmer, Foster City, CA). The resulting sequences were used for prediction of species-specific restriction sites by using the NEBcutter V2.0 web-based program (available at <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). From restriction prediction data, two restriction endonucleases (*Taq*<sup>I</sup> and *Vsp*I) were chosen for restriction fragment length polymorphism (RFLP).

### 2.5. RFLP

The PCR products were digested in separate reaction with *Taq*<sup>I</sup> and *Vsp*I (New England Biolabs, Ipswich, USA). Reaction mixture was composed of approximate  $500\ \text{ng}$  of PCR product,  $1\ \mu\text{l}$  of  $10\times$  appropriate buffer, 2 units of restriction enzyme and DNase-free water to final volume of  $10\ \mu\text{l}$ . The mixture was incubated overnight at  $65^{\circ}\text{C}$  and  $37^{\circ}\text{C}$  for *Taq*<sup>I</sup> and *Vsp*I, respectively. The restriction products were electrophoresed through 6% native polyacrylamide gel electrophoresis 6% gel concentration (T), 3.3% crosslinking (C),  $1\times$  TBE buffer ( $89\ \text{mM}$  Tris-base,  $89\ \text{mM}$  Boric acid,  $2\ \text{mM}$  EDTA, pH 8.3), run at  $100\ \text{V}$  for 60 min [11], followed by ethidium bromide staining and visualized on a Gel Doc EQ system (Bio-Rad, CA, USA).

### 2.6. Sequence analysis and phylogenetic tree construction

Nucleotide sequences were prepared and analyzed using Chromas Lite version 2.01 (<http://www.technelysium.com.au>) and BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) for species identification. All partial nucleotide sequences of COI–COII genes obtained from this study were submitted to the GenBank database and assigned accession numbers as FJ153258–FJ153278. Sequences were aligned by using the Clustal W algorithm implemented in the BioEdit Sequence Alignment Editor v. 6.0.7 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Percentage of G+C contents and sequence identity matrix were also calculated using the BioEdit program. Phylogenetic tree based on the COI–COII sequences was constructed by neighbor-joining method using the Kimura's 2-parameter model implemented in the MEGA<sup>®</sup> version 3.1 [12] and the tree was tested by 1000 bootstrap replicates. Bootstrapping values indicate percentage support for grouping by random resampling of the data.

## 3. Results

### 3.1. Amplification of mitochondrial COI–COII genes

Result obtained from PCR amplification and agarose gel electrophoresis revealed that total DNA extracted from thorax and legs of an adult fly was appropriate enough to serve as a template for amplification of mitochondrial COI–COII genes. The specific primers used in this study yielded the PCR-amplified

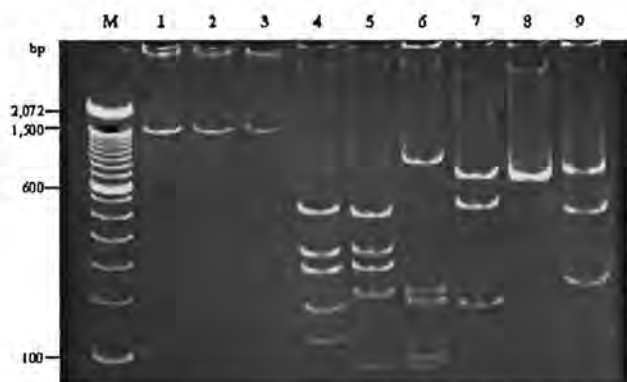


Fig. 2. The 6% native polyacrylamide gel shows different PCR-RFLP patterns of COI–COII amplicons digested with two restriction endonucleases. From left to right as follows: undigested PCR products from *C. megacephala*, *C. rufifacies* and *L. cuprina*, respectively (lanes 1–3); *C. megacephala*/Taq<sup>I</sup> (lane 4); *C. rufifacies*/Taq<sup>I</sup> (lane 5); *L. cuprina*/Taq<sup>I</sup> (lane 6); *C. megacephala*/VspI (lane 7); *C. rufifacies*/VspI (lane 8); *L. cuprina*/VspI (lane 9). Lane M is 100 bp DNA standard marker.

product of 1.3 kbp in length for all blowfly species tested as shown in Fig. 2.

### 3.2. Identification and distribution of blowfly species in Thailand

In this study, 20 blowflies were collected from 6 different regions of Thailand (Fig. 1) including Bangkok (Center), Chiang-Mai, Tak, Phitsanulok (Northern), Buri-Ram (Eastern) and Chumphon (Southern). Based on the sequence analysis and BLAST search of partial COI–COII sequences (1200 bp in length), the blowflies could be classified into 3 species: *C. megacephala*, *C. rufifacies* and *L. cuprina*. These bioinformatics results were consistent with the taxonomic key-based identification (data not shown). From the 20 blowflies collected, 12 specimens (from all 6 regions of Thailand) were identified as *C. megacephala*; 5 specimens were of *C. rufifacies* (isolated from Bangkok, Chiang-Mai and Phitsanulok), whereas the remaining 3 specimens (collected only in Chiang-Mai) were classified as *L. cuprina* (Table 1).

Table 1  
 Isolate code, sex, location and accession number of each blowfly used in this study.

Blowfly species	Sex	Location	Accession no.
<i>Chrysomya megacephala</i>			
A01	♂	Tak	FJ153258
A02	♀	Chiang-Mai	FJ153259
A03	♂	Chiang-Mai	FJ153260
A04	♂	Chiang-Mai	FJ153261
A05	♂	Chiang-Mai	FJ153262
A06	♀	Buri-Ram	FJ153263
A07	♀	Buri-Ram	FJ153264
A08	♀	Phitsanulok	FJ153265
A09	♂	Phitsanulok	FJ153266
A10	♂	Chumphon	FJ153267
A11	♂	Chumphon	FJ153268
A12	♀	Bangkok	FJ153269
<i>Chrysomya rufifacies</i>			
B01	♀	Bangkok	FJ153270
B02	♂	Bangkok	FJ153271
B03	♀	Phitsanulok	FJ153272
B04	♀	Chiang-Mai	FJ153273
B05	♂	Chiang-Mai	FJ153274
<i>Lucilia cuprina</i>			
C01	♀	Chiang-Mai	FJ153275
C02	♀	Chiang-Mai	FJ153276
C03	♂	Chiang-Mai	FJ153277
<i>Musca domestica</i> (Outgroup)			
D01	♂	Bangkok	FJ153278

### 3.3. Discrimination of blowfly species in Thailand based on PCR-RFLP

According to the sequence analysis of partial COI–COII genes, the restriction sites and suitable restriction enzymes were selected by using web-based bioinformatics program (NEBcutter V2.0). Two restriction enzymes (Taq<sup>I</sup> and VspI) were used in separate reactions in order to generate distinct RFLP patterns and thus be applied for discrimination among different blowfly species. Digestion with Taq<sup>I</sup> and VspI yielded different RFLP patterns in each species as summarized in Table 2. The representative of restriction patterns for each species is shown in Fig. 2.

### 3.4. Sequences analysis and comparison

Multiple-alignments of 20 partial mitochondrial COI–COII sequences were performed by using Clustal W implemented in the BioEdit Sequence Alignment Editor version 6.0.7. Analysis of the mean G+C contents revealed slight differences between species, ranging from 28.95% (*C. megacephala*), 28.26% (*L. cuprina*) and 27.37% (*C. rufifacies*). Sequence comparisons between the same species showed that percentage of sequence similarity ranged from 99.7 to 100 (mean 99.91%), 99.6 to 100 (mean 99.72%) and 99.7 to 99.9 (mean 99.80%) for *C. megacephala*, *C. rufifacies* and *L. cuprina*, respectively. The result indicated that there was no significant divergence of partial mitochondrial COI–COII sequences within the same species isolated from different geographical regions in Thailand. On the other hand, sequence comparisons among different blowfly species revealed that percentage of sequence identity between *C. megacephala* and *C. rufifacies* ranged from 93.0 to 93.3 (mean 93.18%), whereas similarity between *C. megacephala* and *L. cuprina* ranged from 60.0 to 60.2 (mean 60.04%) and that between *C. rufifacies* and *L. cuprina* ranged from 60.0 to 60.3 (mean 60.13%). The interspecific sequence comparison indicated that the partial mitochondrial COI–COII sequence provided effective data for discrimination among these three blowfly species in Thailand. Table 3 shows the identity matrix representing the similarity between each individual sequences.

### 3.5. Phylogenetic analysis

Phylogenetic tree based on COI–COII nucleotide sequences of blowflies from several worldwide geographical areas including available data from GenBank was constructed by neighbor-joining (NJ) method with the Kimura's 2-parameter model implemented in the MEGA<sup>®</sup> version 3.1 and the tree were tested by 1000 bootstrap replicates (Fig. 3). *Musca domestica* was used as the outgroup of the phylogenetic tree. According to the tree, all of the *C. megacephala* isolates clustered together showing no significant differentiation between different regions. *C. megacephala* and *C. rufifacies* could be well separated although they belonged to the same genus, implying that the COI–COII sequence was useful for identification of these congeneric species. All of the *C. rufifacies* isolates formed a single cluster with branches indicating minor nucleotide variations between the same species. *L. cuprina* was clearly separated from *C. megacephala* and *C. rufifacies* and all 3 isolates were clustered together.

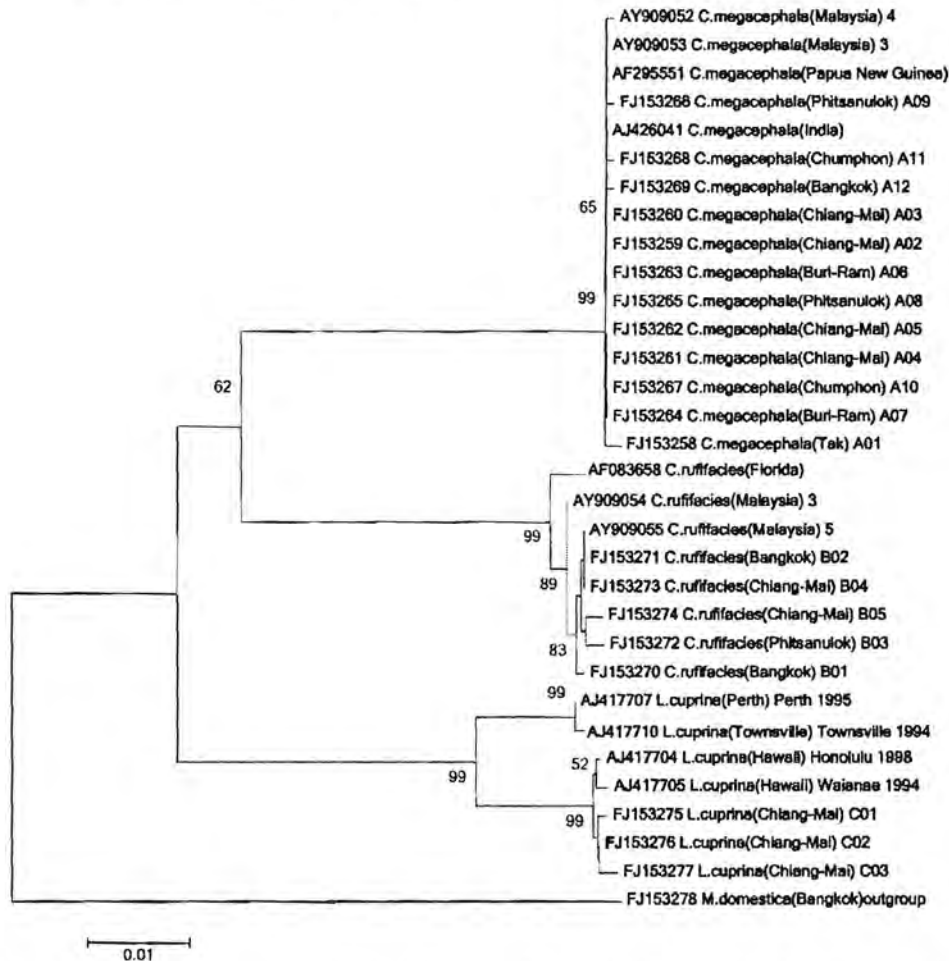
Table 2  
 Comparative RFLP patterns among three blowfly species.

Blowfly species	Taq <sup>I</sup> digestion	VspI digestion
<i>Chrysomya megacephala</i>	30, 111, 156, 264, 307 and 456 bp	4, 12, 160, 495 and 653 bp
<i>Chrysomya rufifacies</i>	30, 81, 186, 264, 307 and 456 bp	12, 653 and 659 bp
<i>Lucilia cuprina</i>	30, 81, 86, 177, 188 and 762 bp	210, 450 and 664 bp

**Table 3**  
Identity matrix reveals the percentage of partial COI-COII sequence similarity between each isolate.

Code	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12	B01	B02	B03	B04	B05	C01	C02	C03	
A01																					
A02	99.8																				
A03	99.8	100																			
A04	99.8	100	100																		
A05	99.8	100	100	100																	
A06	99.8	100	100	100	100																
A07	99.8	100	100	100	100	100															
A08	99.8	100	100	100	100	100	100														
A09	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9													
A10	99.8	100	100	100	100	100	100	100	99.9												
A11	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9											
A12	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9	99.8										
B01	93.1	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.2	93.3	93.2	93.2									
B02	93.1	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.2	93.3	93.2	93.2	99.8								
B03	93	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93	93.1	93	93	99.6	99.6							
B04	93.1	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.2	93.3	93.2	93.2	99.8	100	99.6						
B05	93	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93	93.1	93	93	99.6	99.8	99.6	99.8					
C01	60.1	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60.1	60	60	60.1	60.2	60.1	60.1				
C02	60.2	60.1	60.1	60.1	60.1	60.1	60.1	60.1	60	60.1	60.2	60	60.1	60.2	60.3	60.2	60.2	99.9			
C03	60.1	60	60	60	60	60	60	60	60	60.1	60.2	60	60.1	60.2	60.1	60.1	60.1	99.7	99.8		
D01	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	58.4	58.4	58.3	58.4	58.3	53.3	53.2	53.4	

A01-A12, *Chrysomya megacephala*; B01-B05, *Chrysomya ruffifacies*; C01-C03, *Lucilia cuprina*; D01, *Musca domestica*.



**Fig. 3.** The neighbor-joining tree using Kimura's 2-parameter model illustrating phylogenetic relationships among three blowfly species and one housefly outgroup, based on the COI-COII nucleotide sequences data.

**4. Discussion**

In accordance with previous reports [13–15], *C. megacephala* is the most common blowfly species and more easily captured than other species, throughout Thailand. Boonchu et al. [9] found that *C.*

*megacephala* (96.3%) represented the majority of all species whereas *C. ruffifacies* (0.2%) was rarely captured by this trapping method. A possible explanation for their abundance is their capacity to utilize a wide range of ecological niches throughout Thailand. Additionally, each blowfly species may be differentially

Please cite this article in press as: K. Preativatanyou, et al., Mitochondrial DNA-based identification of some forensically important blowflies in Thailand, *Forensic Sci. Int.* (2010), doi:10.1016/j.forsciint.2010.04.043

attracted by the baits used. Sukontason et al. [8] reported that only *L. cuprina*, not *L. sericata*, was found in forensic cases in Thailand and, to our knowledge, *L. sericata*, the sister species of *L. cuprina*, has never yet been reported in forensic entomology cases in Thailand.

Although PCR-RFLP used to be a preferred method for polymorphism demonstration, this method has some problems since restriction sites can mutate or get lost despite no morphological change. In addition, some authors state that identification by this strategy will be accurate when enough samples of overall flies in the taxa are done as reference profiles [16,17]. However, RFLP serves some advantages for forensic personnel, by partly assisting in the exclusion of some fly species and for screening purposes.

In this study, we demonstrated the value of PCR-RFLP in differentiating three blowfly species, *C. megacephala*, *C. rufifacies* and *L. cuprina*. The 6% native polyacrylamide gel showed good resolution for discriminating two small fragments (81 and 86 bp) for *L. cuprina* by Taq<sup>α</sup>I digestion. On the other hand, VspI digestion provided two larger fragments (653 and 659 bp) overlapping like a single band on the gel, for *C. rufifacies*. VspI also demonstrated different profiles between *C. megacephala* and *L. cuprina*. Very small fragments (<50 bp) often disappear in Fig. 2 due to low ethidium bromide fluorescence intensity and possible diffusion during electrophoresis. All samples after digestion by Taq<sup>α</sup>I and VspI showed similar restriction profiles within same species (data not shown). This result showed that intraspecific polymorphism was not observed here by RFLP. Ethidium bromide-stained polyacrylamide gel techniques demonstrate that the different species-specific restriction profiles are suitable to apply in routine forensic laboratory tests. Although the PCR-RFLP can differentiate these three blowfly species, fly specimens collected from the death scene could be of other closely related species [16–18], a situation which could potentially lead to misidentification errors.

To distinguish sister species more effectively, phylogenetic analysis has been widely employed [16–19]. From Fig. 3, maximum parsimony phylogeny constructed from global data (available in GenBank) reveals reciprocal monophyly between species. Table 3 also shows that intraspecific variation was just detected  $\leq 0.3\%$  for *C. megacephala*,  $\leq 0.4\%$  for *C. rufifacies* and  $\leq 0.3\%$  for *L. cuprina*, supporting monophyletic pattern. However, Wells et al. [16–18] have emphasized the importance of using a broad enough genetic database of all relevant species as an essential key for accurate species identification by phylogenetic analysis of COI sequence. In addition, phylogenies based on different test loci may be discordant. Stevens et al. [19] found that phylogenies constructed from worldwide *L. cuprina* and *L. sericata* were paraphyletic using COI but each monophyletic for 28S ribosomal RNA gene. Therefore, the pitfalls of this study are small sample size and lack of genetic database of close relatives at different test loci for validating the methods. However, the current study successfully demonstrates not only the application of mitochondrial cytochrome oxidase genes for species identification, but also provides phylogenetic information for these common forensically important blowflies from several geographical areas of Thailand.

## Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Associate Professor Dr. Siriporn Sittithiraneed (Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University) and Associate Professor Dr. Chanpen Chanchao (Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University) for excellent advice in molecular biology techniques. This work was supported by the government research budget (Thailand).

## References

- [1] E.P. Catts, Analyzing entomological data, in: E.P. Catts, N.H. Haskell (Eds.), *Entomology and Death: A Procedural Guide*, Joyce's Print Shop, Clemson, SC, 1990, pp. 124–137.
- [2] K.L. Sukontason, R.C. Vogtsberger, N. Boonchu, T. Chaiwong, D. Sripakdee, R. Ngern-Klun, S. Piangjai, K. Sukontason, Larval morphology of *Chrysomya nigripes* (Diptera: Calliphoridae), a fly species of forensic importance, *J. Med. Entomol.* 42 (2005) 233–240.
- [3] H. Schroeder, H. Klotzbach, S. Elias, C. Augustin, K. Poeschel, Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses, *Forensic Sci. Int.* 132 (2003) 76–81.
- [4] J.D. Wells, F.A.H. Sperling, DNA-based identification of forensically important *Chrysomyinae* (Diptera: Calliphoridae), *Forensic Sci. Int.* 120 (2001) 110–115.
- [5] C. Ames, B. Turner, B. Daniel, The use of mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) to differentiate two UK blowfly species: *Calliphora vicina* and *Calliphora vomitoria*, *Forensic Sci. Int.* 164 (2006) 179–182.
- [6] M. Benecke, J.D. Wells, DNA techniques for forensic entomology analysis, in: J.H. Byrd, J.L. Castner (Eds.), *Forensic Entomology: Utility of Arthropods in Legal Investigations*, CRC Press, Boca Raton, 2001, pp. 341–352.
- [7] F.A.H. Sperling, G.S. Anderson, D.A. Hickey, A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation, *J. Forensic Sci.* 39 (2) (1994) 418–427.
- [8] K. Sukontason, P. Narongchai, C. Kanchai, K. Vichairat, P. Sribanditmongkol, T. Bhoopat, H. Kurahashi, M. Chockjamsai, S. Piangjai, N. Bunchu, S. Vongvivach, W. Samai, T. Chaiwong, R. Methanitikorn, R. Ngern-Klun, D. Sripakdee, W. Boonsriwong, S. Siriwattananarungsee, C. Srimuangwong, B. Hanterdsith, K. Chaiwan, C. Srisuwan, S. Upakut, K. Moopayak, R.C. Vogtsberger, J.K. Olson, K.L. Sukontason, Forensic entomology cases in Thailand: a review of cases from 2000 to 2006, *Parasitol. Res.* 101 (5) (2007) 1417–1423.
- [9] N. Boonchu, S. Piangjai, K.L. Sukontason, K. Sukontason, Comparison of the effectiveness of baits used in traps for adult fly collection, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 34 (3) (2003) 630–633.
- [10] R.W. Crosskey, R.P. Lane, House-flies, blow-flies and their allies (Calypterata Diptera), in: R.P. Lane, R.W. Crosskey (Eds.), *Medical Insects and Arachnids*, Chapman and Hall, London, 1993, pp. 403–428.
- [11] T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001, 5.40.
- [12] S. Kumar, K. Tamura, M. Nei, MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment, *Brief. Bioinform.* 5 (2004) 150–163.
- [13] K.L. Sukontason, P. Narongchai, D. Sripakdee, N. Boonchu, T. Chaiwong, R. Ngern-Klun, S. Piangjai, K. Sukontason, First report of human myiasis caused by *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) in Thailand, and its implication in forensic entomology, *J. Med. Entomol.* 42 (2005) 702–704.
- [14] K.L. Sukontason, K. Sukontason, P. Narongchai, S. Lertthamngtham, S. Piangjai, J.K. Olson, *Chrysomya rufifacies* (Macquart) as a forensically-important fly species in Thailand: a case report, *J. Vector. Ecol.* 26 (2001) 162–164.
- [15] W. Tumrasvin, H. Kurahashi, R. Kano, Studies on medically important flies in Thailand. I. Discovery of *Calliphora* species first in Thailand (Diptera: Calliphoridae), *Bull. Tokyo. Med. Dent. Univ.* 23 (4) (1976) 211–216.
- [16] J.D. Wells, J.R. Stevens, Application of DNA-based methods in forensic entomology, *Annu. Rev. Entomol.* 53 (2008) 103–120.
- [17] J.D. Wells, D.W. Williams, Validation of a DNA-based method for identifying *Chrysomyinae* (Diptera: Calliphoridae) used in a death investigation, *Int. J. Leg. Med.* 121 (2007) 1–8.
- [18] J.D. Wells, R. Wall, J.R. Stevens, Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I: a cautionary tale for forensic species determination, *Int. J. Leg. Med.* 121 (2007) 229–233.
- [19] J.R. Stevens, R. Wall, J.D. Wells, Paraphyly in Hawaiian hybrid blowfly populations and the evolutionary history of anthrophophilic species, *Insect Mol. Biol.* 11 (2002) 141–148.