จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๓๒

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

โรคบาบีเซียในโค

การเตรียม การเพาะเลี้ยง การถนอมและเก็บแช่แข็งเชื้อบาบีเซีย โบวิส

(Bovine babesiosis: Preparation, cultivation and cryopreservation of *Babesia bovis*)

โดย

สุวรรณี นิธิอุทัย

มานพ ม่วงใหญ่

599.64
ส4855

กันยายน ๒๕๔๑

ภาควิชาอายุรศาสตร์ และ ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โรคบาบีเซียในโค

การเตรียม การเพาะเลี้ยง การถนอมและเก็บแช่แข็งเชื้อ*บาบีเซีย โบวิส*

สุวรรณี นิธิอุทัย
มานพ ม่วงใหญ่

บทคัดย่อ

การเตรียมเชื้อบาบีเซียเพื่อใช้ในงานทดลองหลายๆด้านเป็นสิ่งจำเป็น การเตรียมเชื้อในการศึกษานี้ใช้ *บาบีเซีย โบวิส* ฉีดให้แก่โคที่ตัดม้าม เชื้อที่ได้นำไปเก็บถนอมในภาวะที่เหมาะสม และนำไปใช้เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง น้ำยาที่ใช้ถนอมเชื้อเพื่อการแช่แข็งมี 3 ชนิด คือ Glycerolyte (Electrolyte-based balanced), Sorbitol-based และ Glycerol-PBS โดยผสมกับเชื้อที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C ในถังไนโตรเจนเหลว นาน 6 สัปดาห์ ประเมินความอยู่รอดของเม็ดเลือดแดงและเชื้อ จากลักษณะของเม็ดเลือดแดงและเชื้อที่ย้อมสียิมซ่าบนแผ่นเลือดบาง ผลปรากฏว่า Glycerol-PBS เป็นน้ำยาที่ใช้ถนอมเชื้อเพื่อการเก็บแช่แข็งที่ไม่เหมาะสม ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเป็นจำนวนมากและเชื้อมีสภาพผิดปกติ ส่วนน้ำยา Glycerolyte และน้ำยาที่มีส่วนผสมของ Sorbitol นั้นมีคุณสมบัติการถนอมเชื้อและเม็ดเลือดได้ดี เม็ดเลือดแดงแตกน้อยมาก และพบว่าน้ำยา Glycerolyte ถนอมเชื้อที่อยู่นอกเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่าน้ำยาที่มีส่วนผสมของ Sorbitol สำหรับผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *บาบีเซีย โบวิส* ในครั้งนี้ได้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจทั้งในบรรยากาศที่อุณหภูมิ 37°C ความชื้น 85-90% และ 5%CO_2 หรือ 2%O_2, 5%CO_2, 93%N_2 ก็ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงเป็นระยะนานได้ จำเป็นต้องพัฒนางานต่อไปอีก

คำสำคัญ: *บาบีเซีย โบวิส* น้ำยาถนอมเชื้อ การถนอมและเก็บแช่แข็ง การเพาะเลี้ยง

หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
กรุงเทพ 10330 ประเทศไทย

บทนำ

โรคบาบีเซียในโคที่เป็นปัญหาและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจและพบได้ในประเทศไทยมีสาเหตุเกิดจากเชื้อโปรโตซัว *บาบีเซีย ไบเจมมินา* (*Babesia bigemina*) และ *บาบีเซีย โบวิส* (*B. bovis*) ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจปีละหลายๆล้านบาท (วิจิตร 2530) เชื้อบาบีเซียทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นปรสิตที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงเท่านั้น การติดต่อเกิดขึ้นจากเห็บแข็ง *Boophilus microplus* ที่เป็นพาหะนำและเชื้อสามารถถ่ายทอดโดยผ่านทางไข่เห็บได้หลายรุ่น(generation) (Friedhoff,1988) ในแต่ละปีมีโคที่ป่วยและตายด้วยโรคนี้จำนวนมาก ส่วนใหญ่เป็นโคนำเข้าจากต่างประเทศ ความรุนแรงของโรคขึ้นกับสเตรนของเชื้อและชนิดของโค โดยโคที่เป็นโรคชนิดเฉียบพลันและรุนแรง มักพบได้ในโคที่โตแล้วและมีอายุมากกว่า 6 เดือน อาการทางคลีนิคที่เด่นชัด ได้แก่ ไข้สูง เลือดจางเนื่องจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลาย อาจมีเฮโมโกลบินในปัสสาวะ และโคอาจตายโดยเฉียบพลันภายใน 24 ชั่วโมง ลูกโคอายุต่ำกว่า 6 เดือน มักไม่แสดงอาการป่วยให้ปรากฏ เนื่องจากมีความต้านทานต่อโรคที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่ในระดับสูง แต่ถ้าภูมิคุ้มลดต่ำลงก็จะป่วยเป็นโรคนี้ได้ (มานพ 2540)

ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำโคเนื้อและโคนมพันธุ์แท้เลือด 100 เปอร์เซนต์ เข้ามาเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ให้มีคุณภาพและผลผลิตสูงขึ้นทั้งเนื้อและนม โคเหล่านี้มีความต้านทานต่อโรคบาบีซิโอซีสต่ำ เมื่อนำเข้ามาในแหล่งเลี้ยงสัตว์ที่มีเห็บโคและมีสัตว์เคี้ยวเอื้องอื่นๆ เช่น โคพันธุ์ไทยพื้นเมือง กระบือ และ กวาง เป็นต้น เป็นตัวกักและเก็บเชื้อ (carrier and reservoir) ที่มีความต้านทานต่อเชื้อสูงและเป็นจุดกำเนิดของการแพร่กระจายและการระบาด ทำให้สัตว์ที่นำเข้ามาใหม่ที่มีความไวสูงติดโรคง่ายเกิดการติดเชื้อแล้วล้มป่วยและตายลงเนื่องจากไม่สามารถทนทานต่อโรคนี้ได้ ในการพัฒนาปศุสัตว์จึงจำเป็นต้องคำนึงถึงศักยภาพและความเป็นไปได้ในการตรวจวินิจฉัยสภาวะการเป็นตัวกักและเก็บเชื้อของสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีความต้านทานสูงที่เป็นบ่อเกิดเชื้อบาบีเซียโดยเฉพาะโคพันธุ์ไทยพื้นเมืองและกระบือที่เลี้ยงกันอยู่ทั่วทั้งประเทศ

การวินิจฉัยการติดเชื้อบาบีเซียโดยทั่วไปในปัจจุบันขึ้นกับการตรวจพบเชื้อโดยตรงจากแผ่นเลือดย้อมสี ซึ่งวิธีนี้ได้ผลไม่ดีนัก ตรวจหาเชื้อได้ยาก เนื่องจากมักมีเชื้อในกระแสเลือดต่ำและเชื้อจะปรากฏอยู่ในกระแสเลือดเพียงบางระยะเวลา จึงทำให้ผลการวินิจฉัยคาดเคลื่อนได้ง่าย โดยเฉพาะเชื้อจากสัตว์ที่เป็นตัวกักและเก็บเชื้อ วิธีตรวจที่ให้ผลค่อนข้างแน่นอน คือ การตรวจทางซีรั่มวิทยา ด้วย เทคนิคทาง ELISA และ Indirect fluorescence antibody test (IFA)(Araujo *et al*, 1998) การตรวจหาเชื้อในระดับโมเลกุล (Figueroa *et al*,1992) และ วิธีที่ดีที่สุดและให้ผลแน่นอน คือ การเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง จากเลือดของสัตว์ที่สงสัยว่าเป็นตัวกักและเก็บหรือสัตว์จากแหล่งที่สงสัยว่ามีโรคนี้ระบาดอยู่

การเพาะเลี้ยงเชื้อบาบีเซียในระยะแรกเริ่มได้มีการพัฒนาตามแบบอย่างและอาศัยหลักการเดียวกันกับการเพาะเชื้อมาลาเรียในคน (Ponnudurai,1987) การเพาะเชื้อในหลอดทดลองในระยะแรกเป็นการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาสั้นๆ แต่ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องนานหลายปี จากหลายรายงาน(Levy and Ristic, 1980, Rodriguez *et al*, ,1983, Kellerman *et al* , 1988, Holman , 1996) ได้มีการนำระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่อง ประยุกต์ใช้และศึกษาในแง่มุมต่างๆเกี่ยวกับเชื้อบาบีเซีย เช่น ลักษณะรูปร่างและลักษณะทางชีวภาพอื่นๆ ชีววิทยาระดับโมเลกุล อิมมูโนวิทยาเกี่ยวกับการผลิตวัคซีน การตรวจวินิจฉัย และการศึกษาประสิทธิภาพของยา นอกจากนี้เชื้อที่เพาะเลี้ยงได้เป็นปริมาณมากๆโดยไม่ต้องมีการทำลายสัตว์ยังสามารถนำไปเก็บถนอมได้เป็นเวลานานปีและนำกลับมาใช้ใหม่เมื่อต้องการศึกษาวิจัยด้านอื่นๆต่อไปโดยเชื้อไม่สูญเสียสภาพเดิม และยังเป็นการประหยัดงบประมาณ เวลา และสัตว์ที่ใช้เพื่อการเริ่มต้นใหม่อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อต้องการเตรียมเชื้อบาบีเซียในโคและในหลอดทดลองเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโคพันธุ์พื้นเมืองที่อยู่ในสภาวะของ carrier และเพื่อหาวิธีเก็บถนอมเชื้อบาบีเซียสำหรับงานชันสูตรและวิจัยต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. การสุ่มตรวจเลือดโคเนื้อและโคนม

ตั้งแต่ปี 2532-2541 สุ่มเจาะและเก็บเลือดโคเนื้อจากจังหวัดอยุธยา และกาญจนบุรี และโคนมจากจังหวัดอยุธยาและราชบุรี เตรียมแผ่นเลือดบางเลือดครบและแผ่นเลือดบางจากเม็ดเลือดขาวแยกชั้น (buffy coat smear) ย้อมสีไรท์ยิมซ่า และตรวจหาเชื้อบาบีเซีย ตามวิธีของสุวรรณี (2540)

2. การเตรียมโคทดลองและการฉีดเชื้อ

2.1 การตัดม้ามและการพักสัตว์

ลูกโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน เพศผู้ อายุ 3-7 วัน ไม่เคยมีประวัติถูกเห็บกัด จำนวน 6 ตัวนำมาเลี้ยงไว้ในคอกสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จนกระทั่งลูกโคอายุได้ 3.5-4 เดือน ทำการตัดม้าม ตามวิธีของปิยะ (2514) พักสัตว์นาน 1-4 เดือน ก่อนนำมาใช้เพื่อการทดลอง

2.2 เชื้อบาบีเซียที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อที่นำมาใช้ตลอดการศึกษา เป็นชนิด *Babesia bovis* สายพันธุ์ไทย จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เคยฉีดผ่านโคที่ตัดม้ามแล้ว จำนวน 4 ครั้ง

2.3 การทดลองฉีดเชื้อ และเจาะเลือดตรวจหาเชื้อบาบีเซีย

โคที่มีสภาพสมบูรณ์ดี ตัดม้ามและฟันจากสภาพพักฟื้นแล้ว จำนวน 4 ตัว นำมาทำการทดลองดังนี้

ตัวที่ 1 ฉีดเชื้อ *B. bovis* เข้าเส้นเลือดดำ จำนวน $5x10^6$ infected red blood cells

ตัวที่ 2 ฉีดเชื้อ *B. bovis* เข้าเส้นเลือดดำ จำนวน $5x10^6$ infected red blood cells

ตัวที่ 3 โคไม่ได้รับเชื้อ ใช้เป็นโคสำรองเตรียมไว้สำหรับฉีดเชื้อจากสัตว์ป่วยตามธรรมชาติกรณีที่ตรวจพบเชื้อจากภาคสนาม

ตัวที่ 4 ใช้เป็นตัวให้เลือดปลอดเชื้อ

การตรวจเลือด โคตัวที่ 1 และ ตัวที่ 2 ที่ตัดม้ามแล้ว ก่อนการฉีดเชื้อ เจาะเลือดจากใบหู ทำแผ่นเลือดบางทันทีและย้อมด้วยสีไรท์ยิมซ่า สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ทุกสัปดาห์ ภายหลังการฉีดเชื้อ *B. bovis* เจาะเลือดจากใบหู ทำแผ่นเลือดบางและย้อมด้วยสีไรท์ยิมซ่าเช่นเดิม ทำทุกวันจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง หาอัตราการพบเชื้อบาบีเซียในเม็ดเลือดแดงจากแผ่นเลือดบาง โดยนับจากสัดส่วนของเม็ดเลือดแดงจำนวน 1,000 เม็ด ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายวัตถุ 100x

3. การเก็บถนอมและแช่แข็งเชื้อบาบีเซีย (Cryopreservation)

3.1 การเตรียมเชื้อ

จากการฉีด เชื้อ *B. bovis* เข้าโคทดลองตามข้อ 2.3 และตรวจหาเชื้อจากกระแสเลือดทุกวัน จนกระทั่งตรวจพบเชื้อที่อยู่ในกระแสเลือดทั่วไปได้สูง 10% เจาะเลือดประมาณ 40 มล. นำมาใส่ในขวดปลอดเชื้อที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) เขย่าเบาๆให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มล. ปั่นที่ความเร็ว 700g นาน 10 นาที เทส่วนบนทิ้ง เก็บตะกอนแต่ละหลอดมาใช้เพื่อการทดลองในข้อ 3.2

3.2 น้ำยาที่ใช้ถนอมเชื้อเพื่อการแช่แข็ง (cryoprotectants)

น้ำยาที่เลือกใช้เพื่อการถนอมเชื้อในการทดลองนี้มี 3 ชนิด คือ Glycerolyte® (Baxter, USA), Sorbitol-based cryoprotectant (สดศรี 2540) และ Glycerol-based cryoprotectant (Glycerol:PBS 1:1, pH 7.2) ทำให้ปลอดเชื้อโดยวิธีกรองผ่าน 0.45 μm cellulose acetate membrane filter

3.2.1 วิธีเก็บถนอมเชื้อเพื่อแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ (Cryopreservation)

การใช้น้ำยา Glycerolyte เก็บถนอมเชื้อ ประยุกต์มาจากสูตรที่ใช้ถนอมเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ตามวิธีของ Ho (1998)

วิธีการ จากที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 นำตะกอนเม็ดเลือดที่มีเชื้อบาบีเซีย จากหลอดที่ 1 ปริมาตร 3 ส่วน เติมน้ำยา Glycerolyte ลงไปช้าๆ 1 ส่วน เขย่าเบาๆให้ผสมเข้ากันกับตะกอนเลือด ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติมน้ำยา Glycerolyte ลงไปอีก 4 ส่วน เขย่าให้เข้ากันแล้วแบ่งลงใน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลอดพลาสติกชนิดที่ทนต่อสภาพแช่แข็งได้สูง หลอดละ 0.5 มล. นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 °C ในถังไนโตรเจนเหลวทันที

การเก็บถนอมเชื้อโดยใช้ Sorbitol-based cryoprotectant ประยุกต์มาจากสูตรที่ใช้ถนอมเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ตามวิธีของ สดศรี (2540)

วิธีการ จากที่เตรียมไว้ในในข้อ 3.1 นำตะกอนเม็ดเลือดที่มีเชื้อจากหลอดที่ 2 ปริมาตร 1 ส่วน เติมน้ำยาถนอมเชื้อที่มี Sorbitol-based ลงไป 1 ส่วน เขย่าเบาๆให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดพลาสติกที่ทนความเย็นสูงหลอดละ 0.5 มล. นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 °C ในถังไนโตรเจนเหลวทันที

การเก็บถนอมเชื้อโดยใช้ Glycerol-PBS (1:1)

จากที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 นำตะกอนเม็ดเลือดที่มีเชื้อจากหลอดที่ 3 ปริมาตร 1 ส่วน เติม Glycerol-PBS (1:1) ลงไป 1 ส่วน แกว่งให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดพลาสติกทนความเย็นสูง หลอดละ 0.5 มล. นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 °C ในถังไนโตรเจนเหลวทันที

3.3 การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของเชื้อ

หลังจากถนอมเชื้อด้วยน้ำยาทั้ง 3 ชนิด และเก็บเชื้อไว้ที่ -70 °C นานประมาณ 6 สัปดาห์ เชื้อที่บรรจุอยู่ในหลอดและเก็บในถังไนโตรเจนเหลว นำออกมา อย่างละ 1 หลอด แช่ลงใน Water bath 37 °C ทันที ปั่นที่ความเร็ว 500g 3-5 นาที เทส่วนบนทิ้ง นำตะกอนมาทำแผ่นเลือดบางย้อมสียิมซ่า ศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อและเม็ดเลือดแดงด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

4. การเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. bovis* ในหลอดทดลอง

4.1 การเตรียมเชื้อ

4.1.1 เชื้อ *B. bovis* ที่อยู่ในน้ำยาถนอมเชื้อและเก็บแช่แข็งไว้ที่ -70 °C ในถังไนโตรเจนเหลว นำออกมาแช่ใน Water bath ที่ 37 °C ล้างเม็ดเลือดแดงและเชื้อให้ปลอดจากน้ำยาที่ใช้ถนอมเชื้อเพื่อการแช่แข็ง ตามวิธีของ Holman (1996) ด้วยการเทใส่หลอดปั่นขนาด 10-20 มล. แล้วหยด 12% NaCl solution จำนวน 0.1 มล. ลงไปช้าๆ ทิ้งไว้ 5 นาที เติม 1.6% NaCl solution ลงไป 5 มล. ปั่นด้วยความเร็วต่ำ 700g 10 นาที เทส่วนบน(supernatant)ทิ้ง เติม 0.9% NaCl/dextrose solution ปั่นและเทส่วนบนทิ้งเช่นเดิม ล้างซ้ำด้วย M-199® (Gibco, USA) ที่มี Earle's balanced salts และ 2mM L-glutamine นำตะกอนที่ได้ไปใช้เพาะเลี้ยงตามข้อ 4.3

4.1.1 เชื้อ *B. bovis* จากสัตว์โดยตรง ทำเช่นเดียวกับการเตรียมเม็ดเลือดแดงที่ปลอดเชื้อในข้อ 4.2

4.2 การเตรียมเม็ดเลือดแดงที่ปลอดเชื้อ

เจาะเลือดโคที่ปลอดเชื้อใส่ลงในหลอดขนาด 20-50 มล. ที่มีสารป้องกันการแข็งตัว (EDTA) ปั่นด้วยความเร็ว 500g นาน 10 นาที ดูดชั้นพลาสมาและเม็ดเลือดขาวทิ้ง ล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย PBS-EDTA 2 ครั้ง ดูดชั้นเม็ดเลือดขาวออกจนหมด ล้างซ้ำด้วย PBS+Glucose 1 ครั้ง และดูด 1/3 ของเม็ดเลือดแดงจากก้นหลอด ใส่ในหลอดใหม่ที่มี PBS+Glucose 5-10 มล. เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C ได้นาน 2-4 สัปดาห์

4.3 การเพาะเลี้ยง

น้ำยาเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วย 58% M-199 ที่มี Earle's balanced salts และ 1M TES buffer ทำให้ปลอดเชื้อโดยวิธีกรองผ่าน 0.45 μm cellulose acetate membrane filter เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C ได้นาน 4 สัปดาห์

วิธีเพาะเลี้ยง ใช้ถาดเลี้ยงเชื้อชนิด 24 หลุม หยอดน้ำยาเลี้ยงเชื้อลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 1.1 มล. ดูดเลือด 0.1 มล. ที่เตรียมจากข้อ 4.1.1 ลงไปในหลุมแถวที่ 1 และ 2 ทุกหลุม และ ดูดเลือด 0.1 มล ที่เตรียมจากข้อ 4.1.2 ลงไปในหลุมแถวที่ 3 และ 4 ปิดฝาถาด ทำเช่นนี้ 2 ถาด ถาดที่ 1 นำไปใส่ในตู้สำหรับเพาะเลี้ยงที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 85-90% ในบรรยากาศของ 2% O_2, 5%CO_2 และ93%N_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C ถาดที่ 2 นำไปใส่ในตู้สำหรับเพาะเลี้ยงที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 85-90% ในบรรยากาศของ 5%CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C ทำซ้ำ 5 ครั้ง

การเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเชื้อ การตรวจเชื้อ และการแบ่งเชื้อ ดูดน้ำยาเลี้ยงเชื้อออกจากหลุมเพาะเลี้ยงประมาณ 1.0 มล. แล้วดูดตะกอนเลือด 1.0 ไมโครลิตร ป้ายลงบนสไลด์ ทำแผ่นเลือดบาง ย้อมสียิมซ่า และตรวจนับจำนวนเชื้อ ใส่น้ำยาเลี้ยงเชื้อลงไปใหม่ 1.0 มล. ทำเช่นนี้ทุกวัน จนกระทั่งตรวจพบเชื้ออยู่ในเม็ดเลือดแดงจำนวน 7 เม็ดต่อ 1 high power field จึงแบ่งเชื้อใส่ลงในหลุมใหม่ 5 หลุม หลุมละ 0.25 มล. เติมน้ำยาเลี้ยงเชื้อ 0.9 มล. และตะกอนเม็ดเลือดแดงปลอดเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2 ปริมาตร 0.1 มล.

ผลการทดลอง

จากการสุ่มเจาะเลือดโคเนื้อและโคนม จำนวนรวมทั้งสิ้น 1,321 ตัว มีรายละเอียด ดังนี้

การตรวจเลือดโคเนื้อ

ปี 2535-2538 ตัวอย่างเลือดจากโคเนื้อเขตจังหวัดอยุธยา จำนวนรวม 568 ตัวอย่าง

ปี 2541 ตัวอย่างเลือดจากโคเนื้อเขตจังหวัดกาญจนบุรี จำนวนรวม 33 ตัวอย่าง

การตรวจเลือดโคนม

ปี 2532 ตัวอย่างเลือดจากโคนมเขตจังหวัดราชบุรี จำนวนรวม 314 ตัวอย่าง

ปี 2537 ตัวอย่างเลือดจากโคนมเขตจังหวัดอยุธยา จำนวนรวม 71 ตัวอย่าง

ปี 2539 ตัวอย่างเลือดจากโคนมเขตจังหวัดราชบุรี จำนวนรวม 268 ตัวอย่าง(สิทธิคุณ และ คณะ, 2539)

ปี2541 ตัวอย่างเลือดจากโคนมเขตจังหวัดราชบุรี จำนวนรวม 67 ตัวอย่าง

ผลการตรวจเลือดไม่พบเชื้อบาบีเซียเลย ยกเว้นในปี 2534 ตรวจพบเชื้อ *B. bigemina* จากการผ่าซากโคนมพันธุ์แท้ที่เจ้าของนำไปคัดเลี้ยงชั่วคราวในเขตจังหวัดกาญจนบุรี และ ในเดือนสิงหาคม 2541 การผ่าซากโคนมที่เลี้ยงในฟาร์มเขตจังหวัดราชบุรีตรวจพบเชื้อ *B. bovis* ใน impression smear จากม้าม

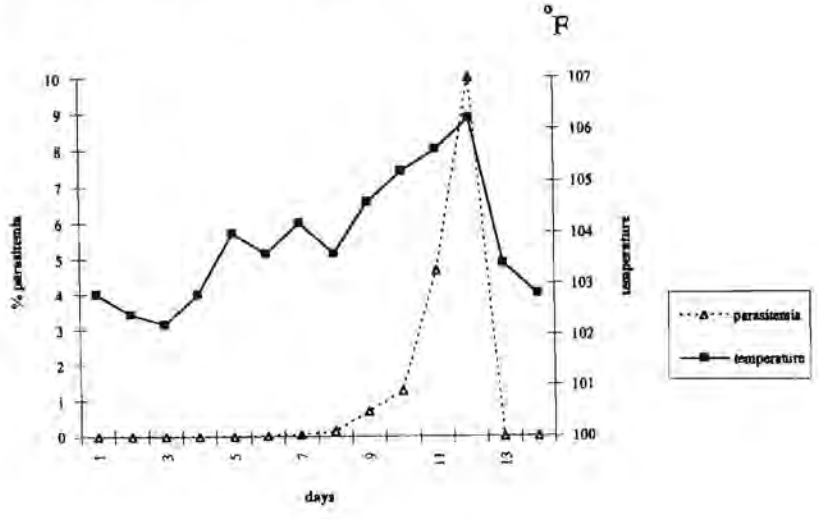
การฉีดเชื้อ *B. bovis* เข้าในโคที่ตัดม้าม

โคตัวที่ 1 หลังจากฉีดเชื้อเข้าไป ไม่ปรากฏเชื้อในกระแสเลือดตลอดการทดลอง อุณหภูมิไม่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติก่อนฉีดเชื้อ อยู่ระหว่าง 102.4-102.9 °F

โคตัวที่ 2 หลังจากฉีดเชื้อเข้าไป เชื้อเริ่มปรากฏในวันที่ 6 และขึ้นสูงสุด 10%ในวันที่ 12 อุณหภูมิในระยะ 3 วันแรกหลังฉีดเชื้ออยู่ในเกณฑ์ปกติ และเริ่มสูงขึ้น (104 °F) ในวันที่ 4 และขึ้นสูงสุดในวันที่ 12 ระดับเชื้อบาบีเซียที่พบในเลือดและอุณหภูมิร่างกายที่วัดได้จากโคหลังจากฉีดเชื้อจนกระทั่งสิ้นสุดตลอดการทดลองแสดงในรูปที่ 1

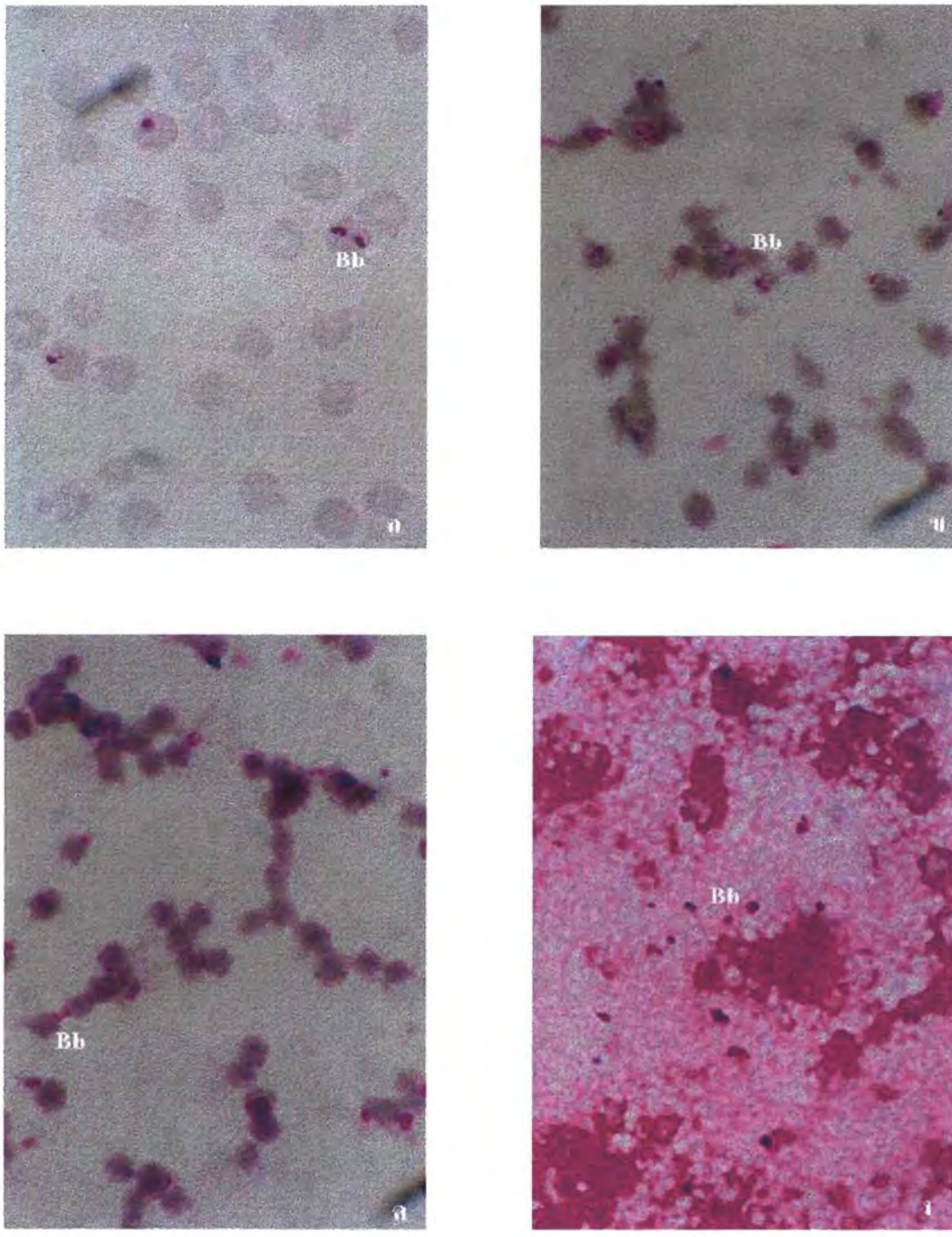
อาการทางคลินิกของโคตัวที่ 2 เริ่มสังเกตเห็นว่าโคเริ่มกินอาหารน้อยหลังจากได้รับเชื้อไป 6 วัน วันที่ 9 และ 10 มีอาการซึมเล็กน้อย ซึมมากและแทบไม่กินอาหารเลยในวันที่ 12 และมีอาการอื่นที่ผิดปกติเด่นชัด คือ หายใจถี่ หอบ ทรุดนอนตะแคงข้าง ปัสสาวะมีสีเข้ม จึงทำการรักษาด้วย Diminazene aceturate (Berenil ®, เฮิกซ์ไทย) ในขนาด 7 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.

โคตัวที่ 3 และ 4 ยังคงอยู่ในสภาพปกติ



รูปที่ 1 ระดับเชื้อ*บาบีเซีย โบวิส* ในกระแสเลือดทั่วไปและอุณหภูมิร่างกายของโคทดลองตัวที่ 2

การถนอมเชื้อ *B. bovis* ในน้ำยาทั้ง 3 ชนิด คือ Glycerolyte, Sorbitol-based cryoprotectant และ Glycerol-PBS เมื่อเก็บไว้ที่ -70°C นาน 6 สัปดาห์ แล้วนำเชื้อและเม็ดเลือดแดงที่ถนอมไว้มาประเมินลักษณะทางกายภาพ ผลปรากฏดังรูปที่ 2 และ ตารางที่ 1



รูปที่ 2 ลักษณะของเชื้อ *บาบีเซีย โบวิส* (Bb) ที่พบในกระแสเลือดทั่วไป (2ก) และหลังจากที่เก็บถนอมไว้ที่ -70°C นาน 6 สัปดาห์ ในน้ำยา Glycerolyte (2ข) น้ำยาที่มีส่วนผสมของ Sorbitol และ น้ำยา Glycerol-PBS (2ง)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ*บาบีเซีย โบวิส* หลังจากที่เก็บถนอมไว้นาน 6 สัปดาห์ ที่ -70°C ในน้ำยา Glycerolyte น้ำยาที่มีส่วนผสมของ Sorbitol และน้ำยา Glycerol-PBS

เชื้อและเม็ดเลือด	ลักษณะทางกายภาพหลังจากเก็บในน้ำยาถนอมเชื้อ		
	Glycerolyte	Sorbitol-based	Glycerol-PBS
Babesia bovis			
ในเม็ดเลือดแดง	ปกติ	ปกติ	ผิดปกติ
อิสระนอกเม็ดเลือดแดง	ปกติ	ผิดปกติ	ผิดปกติ สลายตัว
เม็ดเลือดแดง			
ลักษณะรูปร่าง	ปกติ	ปกติ	ผิดปกติ
การกระจายตัว	น้อย มักอยู่เป็นกลุ่ม	ดี	สังเกตยาก
แตก(haemolysis)	น้อย	น้อย	มาก

สำหรับผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Babesia bovis* ใน 2 บรรยากาศ คือ บรรยากาศที่มี 2%O_2, 5%CO_2 และ 93%N_2 และบรรยากาศที่มีเฉพาะ 5%CO_2 พบว่าสามารถเลี้ยงเชื้อได้ต่อเนื่องสูงสุดเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในบรรยากาศของ 2%O_2, 5%CO_2 และ 93%N_2 ความชื้นสัมพัทธ์ 85-90% ที่อุณหภูมิ 37 °C ส่วนในบรรยากาศที่มี 5%CO_2 นั้นเชื้อมีชีวิตรอดเพียง 4 วัน

วิจารณ์

บาบีเซียเป็นโปรโตซัวในเม็ดเลือดแดงที่ทำให้เกิดโรคบาบีซิโอซิส พบได้ทั้งในสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า ในโคมี *B. bigemina* และ *B. bovis* เป็นสาเหตุที่สำคัญของโรค เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ และมักเป็นปัญหามากต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคในประเทศที่อยู่ในเขตร้อนและชิดร้อนทั่วโลก ในการวินิจฉัยโรคโดยทั่วไปอาจสังเกตุจากอาการทางคลินิกร่วมกับการตรวจพบเชื้อโดยตรงจากกระแสเลือดทั่วไป ซึ่งเป็นวิธีตรวจที่เป็นมาตรฐาน แต่มักจะตรวจพบเชื้อได้ยากมาก ต้องใช้ความพยายามในการตรวจค่อนข้างสูง (Kakoma and Melhorn, 1994) ในการศึกษาครั้งนี้ได้พยายามสุ่มตรวจหาเชื้อจากเลือดโคเนื้อและโคนมจากพลายๆแหล่งแต่ยังไม่สามารถตรวจพบแม้แต่รายเดียว คงตรวจพบเฉพาะจากซากสัตว์ที่มาจากฟาร์มเดียวกับที่เคยสำรวจเลือด 1 แหล่ง ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อมีปริมาณต่ำมากและจะกระจายอยู่ในกระแสเลือดเพียงบางเวลาเท่านั้น (Araujo *et al*, 1998) เมื่อทำการตรวจวินิจฉัยเชื้อจากแผ่นเลือดบางย้อมสีผลจึงอาจคลาดเคลื่อนได้ง่าย ดังนั้นสัตว์ที่มีเชื้ออ่อนแอจะแสดงอาการป่วยอย่างเฉียบพลันและเชื้อมักปรากฏอยู่เพียงช่วงสั้นๆ จึงเป็นเหตุผลที่ทำให้ตรวจพบเชื้อจากซากสัตว์ได้ง่ายกว่าจากกระแสเลือดทั่วไป การสำรวจปรสิตในเลือดของโคนมในเขตจังหวัดราชบุรีจากบางรายงาน (ปิยะนุช และคณะ 2537 และ สิทธิ [illegible] และคณะ 2539) ไม่สามารถตรวจพบเชื้อบาบีเซียในแหล่งที่เคยมีการระบาดของโรคที่ตรวจ

พบเชื้อจากซากโค เช่นกันกับ Saratapun *et al* (1989) รายงานการระบาดของโรคบาบีเซียในโคนมว่าระหว่างปี 2531-2532 ตรวจพบถึง 5 ครั้งเมื่อตรวจด้วยวิธี IFA แต่ผลผ่าซากตรวจพบเชื้อ *B. bigemina* และ *B. bovis* ได้เพียง 2 ครั้ง อัมพวัน และคณะ(2533) ติดตามอาการโคนมพันธุ์แท้ที่สุขภาพไม่สมบูรณ์ โลหิตจาง และหอบ ตรวจพบเชื้อบาบีเซียได้ในขณะที่มีไข้ขึ้นสูง

วิจิตร (2530) ได้ศึกษาโรคบาบีเซียในโคที่ตัดม้าม พบว่าสัตว์เริ่มมีไข้ตั้งแต่วันที่ 2 หลังจากได้รับเชื้อ *B.bovis* และไข้ขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 สัมพันธ์กับระดับเชื้อที่พบสูงสุดในวันที่ 7-10 นอกเนือจากไข้ขึ้นสูงแล้วอาการอื่นได้แก่ ซึม เบืออาหาร เลือดจาง มีเฮโมโกลบินในปัสสาวะ และโค 3 ใน 5 ตัวตายในวันที่ 8 และ 9 สำหรับการทดลองของการศึกษาครั้งนี้ได้ฉีดเชื้อให้โคที่ตัดม้ามเพียง 2 ตัว และ 1 ตัวเท่านั้นที่ติดเชื้อและปรากฏอาการทางคลินิก เริ่มมีไข้ในวันที่ 6 และมีไข้และเชื้อขึ้นสูงสุดในวันที่ 12 ของการฉีดเชื้อ *B. bovis* อาการอื่นๆได้แก่ กินอาหารน้อยลงในวันที่ 4 และกินอาหารน้อยลงเรื่อยๆจนเกือบไม่กินเลยในวันที่ 12 โคเริ่มมีอาการอ่อนแรงลงในวันที่ 10 และทรุดลงเรื่อยๆจนลุกไม่ขึ้นในวันที่ 12 ซึ่งคาดว่าถ้าให้ยาไม่ทันในวันเดียวกันนั้นโคป่วยอาจตาย ส่วนโคฉีดเชื้ออีกตัวหนึ่งที่ตรวจไม่พบนั้น อาจเนื่องจากเชื้อที่ฉีดเข้าไปอ่อนแรง มีจำนวนน้อยเกินไป หรืออาจเนื่องจากโคมีอายุค่อนข้างน้อย เมื่อพักฟื้นหลังจากตัดม้ามเพียงระยะสั้นๆ ภูมิคุ้มกันที่ถ่ายทอดมาจากแม่อาจจะยังคงอยู่ในระดับสูงก็เป็นได้

เนื่องจากเชื้อ *B. bovis* สามารถทำให้โคป่วยเป็นโรครุนแรงและตายอย่างเฉียบพลัน เพื่อความคล่องตัว หลีกเลี่ยงการทำลายสัตว์โดยไม่จำเป็น ประหยัดเวลาและแรงงาน และต้องการให้เชื้อมีสภาพเช่นเดิมทั้งความรุนแรงและลักษณะทางชีวภาพ ที่จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาทดลองค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับเชื้อและโรคในหลายๆด้าน การถนอมและเก็บเชื้อได้โดยไม่ต้องผ่านเข้าตัวสัตว์จึงเป็นสิ่งที่จำเป็น (Rowe *et al*, 1980) น้ำยาที่นิยมใช้เป็น cryoprotectants เช่น Polyvinylpyrrolidone (PVP), Glycerol, Dimethyl sulphoxide (DMSO) และ Hydroxyl starch เป็นต้น (Palmer,1982, Sputtek and Kober, 1991) ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำน้ำยาที่มี Glycerol เป็นส่วนประกอบจำนวน 3 สูตรมาใช้ ปรากฏว่าน้ำยาสูตรที่ 3 (Glycerol:PBS) ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเป็นจำนวนมากและเชื้อที่พบมีลักษณะผิดปกติไม่เหมาะต่อการเก็บถนอมเชื้อ สำหรับน้ำยาสูตรที่ 1 (Electrolyte-based balanced) และสูตรที่ 2 (Sorbitol-based) ให้ผลดีใกล้เคียงกันเว้นแต่น้ำยาสูตรที่ 1 ถนอมเชื้ออิสระที่อยู่นอกเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่าสูตรที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับที่ Ho (1998) ได้ศึกษาไว้ มีบางรายงานพบว่า PVP , มีคุณสมบัติในการถนอมเชื้อบาบีเซียได้ดีกว่า Glycerol (Palmer, *et al* 1982, Holman,1996) Holman (1996) ใช้ 20% PVP-40 ใน Puck's saline glucose ถนอมเชื้อบาบีเซียทุกชนิดได้ผลดี Palmer *et al* (1982) กล่าวว่า 10% PVP-40 เป็นน้ำยาที่เหมาะสมต่อการถนอมเชื้อบาบีเซียที่อยู่นอกเม็ดเลือด เนื่องจาก PVP ไม่สามารถซึมผ่าน plasma membrane แต่ DMSO และ Glycerol ก็มีคุณสมบัติเป็นน้ำยาถนอมเชื้อเพื่อการแช่แข็งได้เช่นกัน มีข้อเสียตรงที่อาจทำให้เกิด osmotic shock และ lysis ได้ง่าย วิธีแก้ไขทำได้โดยการเติม Sorbitol

(Phillips and Wilson, 1978) จึงคาดว่า Sorbitol ที่เป็นส่วนผสมในน้ำยาสูตรที่ 2 และ Electrolyte ต่างๆที่เป็นส่วนผสมในน้ำยาสูตรที่ 1 อาจเป็นตัวช่วยทำให้เม็ดเลือดแดงแตกน้อยลงก็ได้

การเพาะเลี้ยงเชื้อบาบีเซียที่ทำให้เกิดการพัฒนางานวิจัยหลายด้านอย่างต่อเนื่องเริ่มจาก Erp *et al* (1978, 1980) ได้ใช้ Spinner flask culture system ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. bovis* เป็นผลสำเร็จ ต่อมา Levy และ Ristic (1980) ได้พัฒนาวิธีเลี้ยงโดยใช้ Microaerophilus stationary phase ที่นำเอา microtiter plate มาประยุกต์และยังคงนิยมใช้กันจนกระทั่งทุกวันนี้ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและแบ่งตัวได้แก่ ความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7 ความลึกของสิ่งเพาะเลี้ยงไม่เกิน 0.6 ซม. ตู้เพาะเลี้ยงที่มีความชื้น 85-90% อุณหภูมิที่ 37-38 °C ในบรรยากาศที่มี %5CO_2 หรือ 2% O_2, 5%CO_2 และ 93%N_2 (Kakoma and Melhorn, 1994, Holman,1966) น้ำยาที่ใช้เลี้ยงต้องเปลี่ยนใหม่ทุกวัน และแยกถ่ายเชื้อแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในหลุมใหม่ที่มีเม็ดเลือดแดงใหม่ๆทุก 2-3 วัน เนื่องจากในภาวะที่เหมาะสมนั้นอัตราการขยายของเชื้อในหลอดทดลองจะเจริญได้เต็มที่ภายในเวลาไม่เกิน 4 วัน การแยกถ่ายเชื้อเป็นประจำจะทำให้เชื้อแข็งแรงดี สามารถเลี้ยงต่อเนื่องได้นานหลายปี (Rodriguez *et al*, 1983) ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการปรับบรรยากาศของตู้เพาะเลี้ยง คุณภาพของน้ำ สารเคมี ส่วนประกอบของน้ำยาเคมีต่างๆ และน้ำยาเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ยังไม่เหมาะสม

สรุป โรคและเชื้อบาบีเซียในโคตรวจวินิจฉัยได้ยากจากสัตว์ที่มีชีวิต วิธีเก็บถนอมเชื้อ *B. bovis* โดยใช้ Glycolyte และ Sorbitol-based cryoprotectants ได้ผลดีเหมาะสำหรับนำมาใช้ในการเก็บสำรองเชื้อเตรียมไว้ใช้เพื่อการทดลองอื่น ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อครั้งนี้ยังควรพัฒนาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2532 นอกจากนี้ยังได้รับการสนับสนุนด้านการเพาะเลี้ยงเชื้อจาก Dr. Alvin Gajadhar, Director, Centre for Animal Parasitology, Food Inspection Agency, Agriculture Canada, Saskatoon, Saskatchewan, Canada น.สพ. สุทธิศักดิ์ บุญชิต ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อบาบีเซีย และ อาจารย์นายสัตวแพทย์ ถิรายุทธ์ โฆสิตะมงคล ที่ช่วยเหลืองานทางปรสิตวิทยา ผู้วิจัยขอขอบหน่วยงานและบุคคลที่กล่าวมาที่ทำให้งานนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

ปิยะ อรัณยกานนท์ 2514. การตัดม้ามเพื่อศึกษาพยาธิในเม็ดเลือด สัตวแพทยสาร ปีที่ 22 เล่มที่ 2 หน้า 39-47.

ปิยะนุช ประสิทธิรัตน์ ทัศนีย์ ชมภูจันทร์ คิ่งคาว หมอแก้ว ทิพยวรรณ พันธุ์มะม่วง และ สมบัติ รู้แผน 2537. ความชุกของปรสิตในทางเดินอาหารและเลือดของโคนมในภาคกลาง รายงานผลการสำรวจสภาวะโรคโคนมปี 2537 สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 35-38.

มานพ ม่วงใหญ่ 2540. วิทยาสัตว์เซลล์เดียวทางสัตวแพทย์ โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 192-211.

วิจิตร สุขเพสน์ 2530. การศึกษาโรคไพโรพลาสโมซิสในโค สัตวแพทยสาร ปีที่ 38 ฉบับที่ 2 หน้า 21-26.

สิทธิคุณ วิสฤตานนท์ สยาม พาใจสงค์ มานพ ม่วงใหญ่ ถิรายุทธ์ โฆสิตะมงคล และ สมรัก เจสตาคม 2539. รายงาน Case conference นิสิตชั้นปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2539. 19 หน้า.

สดศรี ไทยทอง 2540. การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย. คู่มือปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยมาลาเรีย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย). 5 หน้า.

สุวรรณี นิธิอุทัย 2540. เทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคปรสิตทางสัตวแพทย์ หน้า 30-35.

อัมพวัน ตฤษณารมย์ นุชา สิมะสาธิตกุล อรวรรณ สุวภาพ ธวัชชัย อินทรตุล และ ชาญ เพชรอักษร 2533. รายงานปัญหาสุขภาพโคนมพันธุ์แท้ที่เชียงใหม่ สัตวแพทยสาร ปีที่ 41 ฉบับที่ 1 หน้า 25-30

Araujo,F.R., Madruga,C.R., Leal, C.R.B., Schenk,M.A.M., Kessler,R.H., Marques,A.P.C. and Lemaire, D.C. 1998. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid conglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. Veterinary Parasitology. **74**:102-108.

Erp,E.E., Gravely,S.M., Smith,R.D., Ristic,M., Osorno,B.M. and Carson, C.A. 1978. Growth of *Babesia bovis* in bovine erythrocyte cultures. Am.J.Trop.Med.Hyg. **27**(5):1061-1064.

Erp,E.E., Smith,R.D., Ristic,M. and Osorno,B.M. 1980. Continuous *in vitro* cultivation of *Babesia bovis*. Am.J.Vet.Res.41(7):1141-1142.

Friedhoff,K.T. 1988. Transmission of *Babesia*. In Babesiosis of domestic animals and man. Ristic,M. (ed). CRC Press. p.23-52.

Figueroa,J.V., Chieves,L.P., Johnson,G.S. and Green,T.J. 1990. Detection of *Babesia bigemina*-infected carrier by polymerase chain reaction amplification. J.Clin.Microbiol. **30**:2576-2582.

Ho, M. 1998. Cryopreservation of *Plasmodium falciparum*. Laboratory manual. Malaria research center, Faculty of Medicine, University of Calgary. Canada. 2 pages

Holmam,P.J.1996. *In vitro* cultivation of *Babesia* species. Laboratory manual. Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, Texas, USA. 9 pages

Kakoma,I., and Melhorn,H. 1994. Babesia of domestic animals. In Parasitic protozoa 2nd.ed. p.141-216.

Kellerman, G. Tsang,K.R. and Kakoma,I. 1988. Advances in the *in vitro* cultivation of *Babesia* species. In Babesiosis of domestic animals and man. Ristic,M. (ed). CRC Press. p.71-79.

Levy,M.G. and Ristic,M. 1980. Babesia bovis: Continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. Science. **204**: 1218-1220.

Palmer,D.A., Buening,G.M. and Carson, C.A. 1982. Cryopreservation of Babesia bovis for *in vitro* cultivation. Parasitology. **84**: 567-572.

Phillips ,R.S., and Wilson, J.M. 1978. Cryopreservation of Plasmodiun falciparum in liquid nitrogen. Trans.Roy.Soc.Trop.Hyg.**72**:643.

Ponnudurai,T.1987. Plasmodiidae:Erythrocytic stages. In *In vitro* methods for parasite cultiva tion. Taylor A.E.R. and Baker, J.R. (ed). p. 153-198.

Rodriguez,S.D. Buening,G.M., Green,T.J. and Carson,C.A.1983. Cloning of Babesia bovis by *in vitro* cultivation. Infection and Immunity. **42**(1): 15-18.

Rowe,A.W., Lenny,L.L. and Mannoni,P. 1980. Cropreservation of red cells and platelets. In Low temperature preservation in medicine and biology. Ashwood-Smith,M.J. and Farrant,J.(ed)Pitman Medical, Kent. p.85.

Saratapan,N.,Nishikawa,H. and Tuntasuvan,D. 1989. Bovine babesiosis and theileriosis in Thailand. Abstract. Proceedings of 1st Symposium on Ruminant Reproduction and Parasitology. Chiangmai. 27-29 November 1989. p. 139.

Sputtek,A. and Korber,C. 1991. Cryopreservation of red blood cells, platelets, lymphocytes and stem cells. I. Clinical application of cryobiology. Fuller,B.J. and Grout,B.W.W. (ed). CRC Press. p.95-147.

Bovine babesiosis

Preparation, cultivation and cryopreservation of *Babesia bovis*

Suwannee Nithiuthai

Manop Muangyai

Abstract

Requirement of *Babesia spp* maintenance for experiments in various aspects is crucial. In this study, a thai strain of *Babesia bovis* was inoculated to splenectomized calves. During a high parasitaemia, they were bled for cryopreservation and *in vitro* cultivation. Parasitized erythrocytes have been cryopreserved for future use by mixing with 3 cryoprotectants and freezing at -70°C in liquid nitrogen . The cryoprotectants are glycerolyte (electrolyte-based balanced), sorbitol-based and glycerol in phosphate buffered solution (PBS). After cryopreservation for 6 weeks, viability of the parasites were assessed by morphologically observations of Giemsa stained smears. The results revealed that glycerol-PBS cryopreserved blood were recovered unsuccessfully in bovine erythrocytes and free exoerythrocytic babesial parasites. Glycerolyte and sorbitol-based cryoprotectants gave satisfactory results. Besides, glycerolyte provided a better cryopreserved property than sorbitol-based for exoerythrocytic *Babesia*. The babesial parasitized erythrocytes were also maintained and propagated in *in vitro* cultivation for a short term . However, unsatisfactory results has been shown in both under the conditions of 85-90% humidity, 37°C and 5% CO_2 or 2%O_2, 5%CO_2 and 93%N_2. Attempts to develop a propered culture technique should be considered.

Keywords: *Babesia bovis*, cryoprotectants, cryopreservation, cultivation

Veterinary Parasitology Unit, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand