



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจแยกหาโปรตีนจากต่อมน้ำลายและเนื้อเยื่ออื่นของเห็บโค
(*Boophilus microplus*) จากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยโดยวิธี PAGE

Determination and purification of proteins from salivary gland and other tissues of
different strains of cattle tick (*Boophilus microplus*) in Thailand by PAGE

โดย รศ.ดร.สภาพร จิตตपालพงศ์ และคณะ

30 มิถุนายน 2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจแยกหาโปรตีนจากต่อมน้ำลายและเนื้อเยื่ออื่นของเห็บโค
(*Boophilus microplus*) จากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยโดยวิธี PAGE

Determination and purification of proteins from salivary gland and other tissues of
different strains of cattle tick (*Boophilus microplus*) in Thailand by PAGE

คณะผู้วิจัย:

- | | |
|-----------------------------|--|
| 1. รศ.ดร. สถาพร จิตตपालพงศ์ | คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 2. อาจารย์ คัมภีร์ พัฒนะธำ | คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 3. นางนงนุช ภิญโญภาณุวัฒน์ | คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 4. นายวิษณุวัฒน์ นิมน้อย | คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |
| 5. ศ.ดร.โอมาร์ บาร์ริก้า | Instituto de Ciencias Biomedicas, Chile |



สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย หากไม่จำเป็นไม่ต้องเห็นด้วยเสมอไป)

ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ (ศวท.)
ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์
เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10400
โทร. 298-0455 โทรสาร 298-0476
Home page : <http://www.trf.or.th>
E-mail : trf-info@trf.or.th



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์ในจังหวัดต่าง ๆ ในการให้ความร่วมมือช่วยนำทางเก็บตัวอย่าง อีกทั้งอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงาน และขอขอบคุณภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนในการทำวิจัยทั้งทางด้านสถานที่และอุปกรณ์วิจัยต่าง ๆ ด้วยดีตลอดมา

Abstract

Project Code: PDF/40/2543

Project Title: Determination and purification of proteins from salivary gland and other tissues of different strains of cattle tick (*Boophilus microplus*) in Thailand by PAGE

Investigator: SATHAPORN JITTAPALAPONG
Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine,
Kasetsart University

E-mail Address: fvetspj@notri.ku.co.th

Project Period : 2 Years

Cattle ticks, *Boophilus microplus*, are important because not only they affect economic performances but they also have the ability to transmit biologically or mechanically serious pathogens to humans and animals. It is well known that members of a parasite population are not normally distributed within a host population, but rather skewed toward the majority residing on or within relatively few individuals. To determine that, this research was performed by collecting and being identified cattle ticks from all region of Thailand. Then, those ticks were isolated and kept as the original seed of starting colony. Fed females and males were dissected, separated and processed their salivary glands and other tissues. Extracts were prepared and determined the quantity of proteins. PAGE was performed to classify salivary proteins at different molecular weight. When examined by PAGE, protein profiles of fed male tick salivary glands were compared with those of female ticks over four different locations. The number of male salivary protein bands that were commonly found between different regions was less than those of female salivary glands. Fed females and males shared salivary proteins at 7.7, 14, 16, 18, 19.7, 27, 30, 32, 39.5, 70, 78, 90, 92, 100, 120, 130, 140, 204, 220, 300 and 400 kDa, observed among four regions of Thailand. Ticks from the South have some unique protein bands between 204-230 and 78-120 kDa. Many salivary proteins ranged from 19.7 to 360 kDa, as determined by SDS-PAGE, appeared in salivary proteins from most regions of Thailand indicated unlikely variations in different tick populations. Common proteins shared among these ticks of all parts indicated that they have their similarity among these tick populations. Western blot results also indicated that salivary proteins of different locations shared conserved immunogens and had the potential immunogenicity since they demonstrated protein band at 7.7, 19.7, 30.7, 50, 60, 78, and 204 kDa. The future use of the salivary-gland protein associated with tick immunity will facilitate the development of anti-tick vaccine.

Keywords: *Boophilus microplus*, Salivary gland, PAGE, Western blot, Thailand

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ PDF/40/2543

ชื่อโครงการ การตรวจแยกหาโปรตีนจากต่อมน้ำลาย และเนื้อเยื่ออื่นของเห็บโค
(*Boophilus microplus*) จากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย โดยวิธี
PAGE

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน สถาพร จิตตपालพงศ์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail Address: fvetspi@notri.ku.co.th

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

คำหลัก: *Boophilus microplus*, ต่อมน้ำลาย, PAGE, Western blot, ประเทศไทย

เห็บโค (*Boophilus microplus*) มีความสำคัญทั้งในด้านการพัฒนาปรสิต และมีผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชน โดยเห็บอาจนำโรคที่สำคัญและความเป็นพิษของสารที่ใช้ควบคุมเห็บมีผลกระทบต่อผู้บริโภค เห็บที่มาจากต่างพื้นที่แม้จะเป็นชนิดเดียวกันอาจมีความแตกต่างของลักษณะทั้งภายในและภายนอก ซึ่งมีส่วนสำคัญในการพัฒนาวัคซีนต่อต้านเห็บ จุดประสงค์ของการวิจัยเพื่อตรวจหาความแตกต่างที่อาจพบในเห็บชนิดเดียวกันแต่มาจากต่างพื้นที่ โดยได้ทำการเก็บตัวอย่างเห็บโคจากจังหวัดต่าง ๆ ที่เป็นตัวแทนของแต่ละภาค ภาคละ 4 จังหวัด โดยคัดเลือกจากจังหวัดที่มีการเลี้ยงปรสิตจำนวนมาก เห็บจะถูกนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ออกไข่และสร้างโคลินิ เห็บเพศผู้และเพศเมียดูดกินเลือดจะถูกนำมาผ่าแยกเอาต่อมน้ำลายทางเดินอาหารและเนื้อเยื่ออื่น ๆ ของเห็บออกมาทำ extract จากนั้นจะตรวจหาระดับความเข้มข้นของโปรตีน ก่อนที่จะนำไปแยกโดยขบวนการ electrophoresis จากผลของ PAGE พบเห็บเพศเมียและเพศผู้ที่มีโปรตีนจากต่อมน้ำลายที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันที่ 7.7, 14, 16, 18, 19.7, 27, 30, 32, 39.5, 70, 78, 90, 92, 100, 120, 130, 140, 204, 220, 300 และ 400 kDa เห็บที่มาจากภาคใต้มีโปรตีนที่แตกต่างจากภาคอื่น ๆ โดยพบ น้ำหนักอยู่ระหว่าง 204-230 kDa และ 78-120 kDa จากผลของ Western blot พบว่าโปรตีนของต่อมน้ำลายจากเห็บแต่ละภาคมีส่วนที่คล้ายกัน และมีความสามารถในการกระตุ้นแอนติบอดี โดยได้แสดงให้เห็นที่แถบโปรตีนน้ำหนัก 7.7, 19.7, 30.7, 50, 60, 78 และ 204 kDa นอกจากนี้ยังพบว่า เห็บเพศผู้มีจำนวนโปรตีนน้อยกว่าเห็บเพศเมีย จากความแตกต่างและความคล้ายกันของโปรตีน พบสรุปได้ว่า ความแตกต่างของเห็บโคในส่วนของโครงสร้างของต่อมน้ำลายมีเพียงเล็กน้อยและไม่แน่ว่าจะมีนัยสำคัญในการพัฒนาวัคซีนต่อต้านเห็บโค โดยใช้ตัวแทนเห็บจากภาคใดภาคหนึ่ง

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

เห็บเป็นพยาธิภายนอกที่เป็นอุปสรรคสำคัญในการพัฒนาปศุสัตว์ในประเทศไทย เป็นเวลาช้านาน และทำให้เกิดความสูญเสียในสัตว์เลี้ยง รวมทั้งอาจมีผลคุกคามต่อสุขภาพของเจ้าของสัตว์ เห็บสามารถเจริญและแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว ในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูงและอุณหภูมิตั้งแต่ 25 °C จึงทำให้เห็บสร้างปัญหาอย่างมากในประเทศแถบร้อนชื้น ซึ่งรวมทั้งประเทศไทยด้วย

ความสำคัญของเห็บที่มีผลต่อความสูญเสียมีอยู่ 2 ประการคือ ประการแรก ความสูญเสียโดยตรง คือ การดูดกินเลือดของเห็บ สัตว์ที่มีเห็บเกาะดูดเลือดจำนวนมาก จะสูญเสียเลือดเป็นจำนวนมาก เห็บตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถดูดกินเลือดโฮสต์ได้ ตั้งแต่ 0.5-2 มล. ขึ้นอยู่กับชนิดของเห็บ ความสูญเสียในสัตว์บางครั้งเจ้าของสัตว์อาจจะไม่ตระหนักถึงความเสียหายที่เกิดขึ้น เห็บที่ดูดกินเลือดโฮสต์จะทำให้ผลผลิตของสัตว์ ได้แก่ น้ำนม การแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ในกรณีที่สัตว์ก่อสภาพโลหิตจางและมีผลโดยตรงต่อสุขภาพของสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์มีเห็บจำนวนน้อย สัตว์อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงภายนอกเพียงเล็กน้อย และความเสียหายจะเกิดแบบช้าๆ ในกรณีที่เป็นลูกสัตว์หรือสัตว์อายุน้อยถ้ามีเห็บอยู่บนตัวสัตว์จำนวนมากจะเกิดสภาพแคระแกรน หรือเติบโตช้ากว่าปกติ ความสูญเสียที่เกิดขึ้นเมื่อเจ้าของให้อาหารสัตว์ แต่อาหารนั้นไม่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นผลผลิตที่ต้องการ หรือสามารถเจริญเติบโตได้ตามกำหนด ความสูญเสียที่เจ้าของสัตว์ไม่ได้คำนวณ หรือประมาณการได้ในแต่ละวัน นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายในการควบคุมเห็บก็เป็นส่วนหนึ่งของต้นทุนในการผลิตสัตว์ ซึ่งต้องนำมาคำนวณเป็นค่าใช้จ่ายที่ใช้เป็นตัวชี้ว่าเกษตรกรได้รับผลกำไรหรือขาดทุนจากการเลี้ยงสัตว์ในแต่ละครั้ง

ความสำคัญอีกประการหนึ่งของเห็บ คือ การนำโรคของเห็บ เห็บนำโรคได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ไวรัส ริกเก็ตเซีย และโปรโตซัว โรคที่สำคัญในปศุสัตว์ ได้แก่ โรค Babesiosis หรือโรคปัสสาวะแดง (Red Water fever) โรค Anaplasmosis และโรค Theileriosis โรคเหล่านี้สามารถทำอันตรายต่อสัตว์ได้มากกว่าตัวเห็บเอง เนื่องจากโรคสามารถฆ่าสัตว์ได้อย่างรวดเร็ว สัตว์อาจเกิดอาการอย่างเฉียบพลัน ค่าใช้จ่ายในการรักษาโรค ค่าใช้จ่ายในกรณีสัตว์ตาย ค่าใช้จ่ายในการฟื้นฟูตัวของสัตว์หลังจากหายจากโรค และค่าใช้จ่ายในการป้องกันโรค ความเสียหายทางเศรษฐกิจเหล่านี้ ควรจะนำมาพิจารณาประกอบการตัดสินใจของสัตว์ เพื่อสามารถใช้ประกอบการประเมิน และวางแผนการพัฒนาปศุสัตว์ระยะยาว

การควบคุมเห็บในอดีตและปัจจุบันใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์ฆ่าเห็บ (Acaricides) ซึ่งมีการพัฒนาอยู่ตลอดเวลา เนื่องจากเห็บเกิดความต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวได้เมื่อใช้ไประยะเวลาหนึ่ง สารเคมีเหล่านี้ได้แก่ กลุ่ม Organo chlorine, Organo phosphate, Carbamate ฯลฯ สารเคมีเป็นตัวยานำเข้าจากต่างประเทศ และมีราคาแพงขึ้นทุกครั้งที่มีการคิดค้นยาตัวใหม่ เนื่อง

จากผู้ผลิตต้องคิดราคาค่าวิจัยและผลกำไรรวมไปด้วย สารเคมีดังกล่าวสามารถเกิดการตกค้างในสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ รวมทั้งตกค้างและเพิ่มความเป็นพิษในสภาพแวดล้อม ผลอันไม่พึงประสงค์เหล่านี้เป็นสาเหตุที่ผลักดันให้เกิดแนวคิดใหม่ๆ เกี่ยวกับการควบคุมเห็บ ได้แก่ การใช้พยาธิตัวกลม(nematode) ที่เป็นปรสิตของเห็บหรือใช้เชื้อราทำลายเห็บ การคิดค้นหรือหาสายพันธุ์สัตว์ที่มีความต้านทานต่อเห็บ (Breed Resistance) การใช้สมุนไพรที่มีความเป็นพิษไม่ตกค้างและสะสม และมีราคาถูกในการควบคุมเห็บ และวิธีสุดท้ายคือการพัฒนาวัคซีนต่อต้านเห็บ (anti-tick vaccines)

แนวความคิดในการพัฒนาวัคซีนต่อต้านเห็บมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1939 ได้มีการสังเกตและวิจัยถึงความเป็นไปได้ของการที่สัตว์เกิดภูมิคุ้มกันจากการที่เห็บเกาะดูดเลือด และได้มีการทดสอบมาเป็นลำดับ ในเห็บแต่ละชนิดทั้งที่เป็นเห็บชนิด 3 host tick, 2-host tick และ 1-host tick ความก้าวหน้าของการพัฒนาวัคซีนต่อต้านเห็บในเชิงการค้ามีความเป็นไปได้สูงและมีศักยภาพที่น่าสนใจ แอนติเจนของวัคซีนเตรียมจากเนื้อเยื่อเห็บและสามารถนำไปพัฒนาต่อจนได้เป็น DNA วัคซีน หรือ recombinant วัคซีน แหล่งกำเนิดของโปรตีนที่ใช้เป็นวัคซีนมาจากอวัยวะหรือเนื้อเยื่อของเห็บ 2 ชนิด คือ ต่อมน้ำลาย(salivary glands)และทางเดินอาหาร(gut) ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันที่มีฤทธิ์แตกต่างกันเนื้อเยื่อทางเดินอาหารของเห็บสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันออกฤทธิ์ยับยั้งการแลกเปลี่ยนเลือดเป็นไขซึ่งจะมีผลทำให้เห็บตัวเมียวางไข่ลดลง และไขมีโอกาสดักเป็นตัวอ่อนลดลงรวมทั้งตัวอ่อนที่เกิดขึ้นจะอ่อนแอและมีโอกาสตายสูงกว่าปกติ เนื้อเยื่อทางเดินอาหารจัดเป็นแอนติเจนที่โฮสต์ไม่ได้สัมผัสในช่วงความสัมพันธ์ปกติตามธรรมชาติ (Natural Infestations) เนื่องจากเป็นโครงสร้างที่อยู่ภายใน ไม่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกาะดูดเลือด เมื่อนำมาใช้เป็นแอนติเจนจึงทำให้เกิดแอนติบอดีที่มีผลต่อการทำงานของทางเดินอาหารโดยแอนติบอดีจะเข้าไปจับและทำให้เกิดความเสียหาย ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ขัดขวางกลไกทางสรีรวิทยา โดยเห็บอาจจะตายก่อนวางไข่หรือวางไข่ลดลง

แอนติเจนที่มาจากต่อมน้ำลาย พบว่าภูมิคุ้มกันที่เกิดจากเนื้อเยื่อต่อมน้ำลายจะออกฤทธิ์ โดยตรงต่อการทำงานของต่อมน้ำลายซึ่งมีหน้าที่ช่วยในการดูดกินเลือด แอนติบอดีที่เกิดขึ้นจะเข้าไปจับและทำลายโครงสร้างตลอดจนโปรตีนที่มีความสัมพันธ์ โดยปกติต่อมน้ำลายของเห็บมีหน้าที่หลัก 2 อย่าง คือ ช่วยในการดูดกินเลือด โดยเห็บจะสร้างสารที่มีหน้าที่ป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoagulation) ช่วยให้เส้นเลือดขยายตัว ระบายสารที่โฮสต์สร้างเพื่อขัดขวางการดูดกินเลือด (Immunomodulation) และหน้าที่ที่เหลือ คือ การรักษาสมดุลของระดับน้ำในร่างกายของเห็บ เมื่อหน้าที่เหล่านี้ถูกขัดขวางจะทำให้เห็บสูญเสียความสามารถในการดูดกินเลือดโฮสต์ เห็บเพศเมียจะมีน้ำหนักเมื่อดูดกินเลือดเต็มที่ (engorged weight) ลดลงและอาจจะใช้เวลาดูดกินเลือดสัตว์นานขึ้น (feeding time) นอกจากนี้แอนติบอดียังก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมภายในต่อมน้ำลาย ซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อต่าง ๆ ที่อาศัยเห็บเป็นโฮสต์กึ่งกลางตามธรรมชาติ (intermediate host or vector) ซึ่งผลดังกล่าวมีความ

สำคัญมากในการควบคุมและป้องกันโรคที่นำโดยเห็บ และเป็นข้อดีประการหนึ่งในการนำ ต่อม้ำลายหรือโปรตีนเกี่ยวข้องกับต่อม้ำลายมาใช้เป็นวัคซีน สำหรับข้อเสียของการพัฒนา วัคซีนจากต่อม้ำลาย เกิดจากลักษณะของตัวต่อม้ำลายเป็นต่อมที่มีการสร้างโปรตีนจำนวนมาก ซึ่งทำให้มีความซับซ้อนในการคัดเลือกโปรตีนที่เหมาะสมมาใช้ผลิตวัคซีน ต่อม้ำลาย ประกอบด้วยโปรตีนจำนวนมากที่อาจจะมีทั้งที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หรือเพียงแค่กระตุ้น การสร้างแอนติบอดี

การแยกโปรตีนจากต่อม้ำลาย โดยวิธี PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis) อาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงการจับตัวของโมเลกุล จากเดิมที่เป็น conformational โปรตีนที่มี ลักษณะเป็น 3 มิติ มาเป็นเส้นสายที่มีเพียง 1-2 มิติ ทำให้โปรตีนถูกตัดหรือสลายแรงดึงดูด ระหว่างโมเลกุลทำให้มีขนาดเล็กลง หรือมีความซับซ้อนน้อยลง และสามารถตรวจสอบได้ โดย ใช้การย้อมสี Coomassie หรือ Silver Stain น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ถูกแยกโดยกระแสไฟ ฟา จากการทำให้เกิดประจุของ SDS (Sodium dodecyl sulfate) จะแยกออกจากกันตามขนาด ของโมเลกุล เห็บโค *B. microplus* ที่มาจากที่ต่าง ๆ อาจมีลักษณะของต่อม้ำลายที่แตกต่างกัน การพิสูจน์ยืนยันชนิดของโปรตีนในต่อม้ำลายจากเห็บโคที่มาจากต่างแหล่ง จึงเป็นสิ่งสำคัญ ก่อนที่จะนำมาพัฒนาในขั้นต่อไป ความแตกต่างของโปรตีนจากเห็บที่มาจากต่างภาคต่าง ๆ ของ ประเทศไทยจะใช้นำมาเปรียบเทียบกับวิธีการPAGEและนำมาหาความสัมพันธ์กับแอนติบอดี โดยวิธีการ Western Blot เพื่อที่จะค้นหาโปรตีนที่มีความเป็นไปได้ ในการพัฒนาขั้นต่อไป

การเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนจากต่อม้ำลายจากเห็บแต่ละภาคจะเป็นขั้นตอนแรกของการพิจารณาคัดเลือกแอนติเจนที่เหมาะสม ก่อนที่จะนำมาพัฒนาต่อโดยวิธีการ แยกหาสายโปรตีน (protein sequencing) และ cloning ของ DNA ที่เป็นลักษณะพันธุกรรมที่ ควบคุมการสร้างหรือผลิตโปรตีน การทดสอบโปรตีนที่เกิดจากเทคนิค recombinant protein และการทดสอบ adjuvant ที่เกี่ยวข้องในขบวนการพัฒนาวัคซีนต่อต้านเห็บ

Literature Review

Control of arthropod ectoparasites is an integral part of livestock management. Arthropod ectoparasites decrease economic performance of live stock and some species are capable of vectoring serious pathogens to both man and animals [1-3]. Chemical use was introduced in the 1950s as the control of arthropod pests [1]. Although chemical pesticides have been used successfully to control a number of ectoparasites, their continued use is threatened by many concerns [4-5]. Increasingly, consumers of food products are becoming aware of the potential long-term health effects of low level exposure to pesticides, particularly their effect upon the young [6]. Legal aspects of chemical-residue allowances affect international trade and the commercial marketability of meat products. Reduced product efficacy as a result of the development of resistance increases parasite control costs, reduces animal-production efficiency, depletes the stock of control tools, and increase the risk of environmental contamination as increasingly larger doses of a chemical are required for control. Substantial resistance to pesticides in Australia and Latin and South America raised serious concerns about the future of pesticides in these

regions of the world. It is not surprising that the pesticide industry is confronting a number of obstacles regarding the introduction of new compounds. The cost of product discovery and development, registration, and market introduction is expensive.

The low affect systemically applied chemicals, their efficacy, and cases of use are factors that fostered dependence upon them for ectoparasite control. Highly effective technologies have often obviated the need for research efforts toward the development of alternative technologies. This appears to be true for the control of livestock ectoparasites, as non-chemical alternative control measures are essentially non-existent. However, after Trager [12] demonstrated the acquired immunity were developed in host after immunizations and infestations in 1939; many investigations have been produced and resulted in the possibility of non-chemical tick population control. This result shown genetic host resistance is the ultimate in sustainable parasite control. Similarly, vaccines that elicit herd immunity would satisfy sustainable requirements in terms of target species specificity, absence of residue, and long lived immunity.

It appears that antigens that induce resistance reside in the salivary glands and midgut of ticks [7-9]. The sera of tick resistant rabbits contain antibodies which bind specifically to tick salivary gland tissue [10], and passive transfer of such sera confers on the recipients a degree of resistance to tick feeding [11-13] have shown that salivary gland extracts can artificially induce tick resistance in guinea pigs. In view of the complexity of the Ixodid salivary glands [14-15], it seems likely that one of secreted components could induce protective immune responses.

The immunogenicity of the salivary gland was demonstrated first by Allen & Humphreys (1979) [16] and according to Brown et al (1984) [17 -21] the antigens responsible for the induction of host resistance in natural infestations appear to be of salivary gland origin. Ixodid tick saliva has been the subject of considerable investigation. In all known life cycles of tick-borne pathogens, initial infection of tick tissues occurs in midgut epithelial cells and transmission is effected as ticks feed after parasites have developed and multiplied in salivary glands. Multiplication in salivary glands seems precisely co-ordinates with the tick feeding cycle; infective stages develop and are transmitted during feeding. Therefore, interruption of salivary gland function could prevent transmission of these tick-borne pathogens to the hosts [22].

The immune response elicited is due to many of the proteins detected in tick saliva or in salivary gland extract [23]. Salivary gland proteins of tick changed during feeding [24]. McSwain observed that numerous changes during attachment, feeding and copulation process were the primary stimulation for the synthesis of major kinds of salivary gland proteins. Many tick saliva proteins have been demonstrated to be immunogenic to the mammalian host [25], and anti-tick saliva antibodies have proved to be biological markers of tick exposure in humans [26].

Several attempts have been made to artificially immunize hosts with tick extracts. Trager [12] was the first to obtain partial immunity in guinea pigs with an infection of *D. variabilis* extracts. Kohler [27] reduced the number of *Hyalomma anatolicum excavatum* maturing on a rabbit by prior immunization with salivary gland extract. More convincingly, Garin and grabarev [28] reported success in immunizing with subcutaneous injections of *Rhipicephalus sanguineus* salivary glands Brossard [29] subcutaneously injected calves with partially engorged salivary glands of adult female *Boophilus microplus*. These calves were infested and gave a lower yield of engorged ticks than did the control.

Purified salivary gland antigens of *D. andersoni* infected into rabbits stimulated chemotactic activity, mediated either directly or indirectly through the activation of C5 [30]. These authors proposed that depletion of C5 may reduce the formation of complexes (C5-C9) that attack membranes in the tick gut and that decompensation of the blood meal would also decrease the protective effects of complement-fixing antibodies in the blood meal.

Allen and Humphreys [16] immunized guinea pigs with an extract of either midgut or reproductive tract derived from partially fed *Dermacentor andersoni* females. Resistance induced with midgut antigens was characterized by inhibition of egg laying and no larvae hatched from the eggs that were laid. The effects were more dramatic in the guinea pigs immunized with reproductive tract extract since ticks felled to engorged and produce eggs. Ackerman [31] used whole tick gut from 2-3 day fed *D. variabilis* immunized rats and challenged with the same specie. This had a significant level of resistance to challenge infestation. These cleared evidences have supported the possibilities of antigens derived from tick tissues other than salivary gland is capable of inducing resistance against ticks.

Series of studies involving immunization of cattle against *B. microplus* have been reported by using midgut antigen known as concealed antigens [9, 32-35]. Cattle were immunized with midgut antigen prepared from adult female *B. microplus*. Damaged ticks obtained from immunized animals had host erythrocytes in their hemolymph indicating a link between induced resistance and tick gut damaged. Histological examination of tick feeding on immunized animals showed extensive damaged to tick gut cells, and ruptured gut caecae were observed [33]. It is cleared this study that components of the tick gut surface could be most suitable targets for host-immune effector elements [36].

Sahibi [37] compared immunizing power of salivary or intestinal extract, and field infestation of *Hyalomma marginatum marginatum* in cattle. Their results indicated that salivary extract immunization protected from tick attachment and inhibited tick feeding and fertility whereas intestinal extract immunization affected mostly fertility.

Rearing and maintaining colony of *B. microplus* is a major concern of tick involved research, for examples, to test the efficacy of acaricides, to investigate the host resistance to tick [38-39], to test the possibility of tick vaccine [40-43], or to use vaccines and genetically resistant animals in tick control [44] or to use of vaccines and acaricides integrated control [45]. This tick specie is needed and demanded especially for a clean colony. The tick colony should be kept clean from most tick-borne diseases [46] including babesiosis, theileriosis and anaplasmosis. These diseases can be transmitted by transovarial and or transtadial transmission. Rearing and maintaining colony of ticks is necessary to understand in-and off-host biology of this tick since there are a number of factors influenced feeding, oviposition and engorgement. Such factor includes humidity, temperature, seasonal variation [47] and suitable hosts have an impact on a tick survival rate. The survival ratio of this tick in the nature and laboratory are differed since tropical cattle ticks are incapable of living outside of hosts for too long. This study was to maintain ticks in both animals and laboratory room to observe the tick parameters such as feeding, oviposition, and molting period.

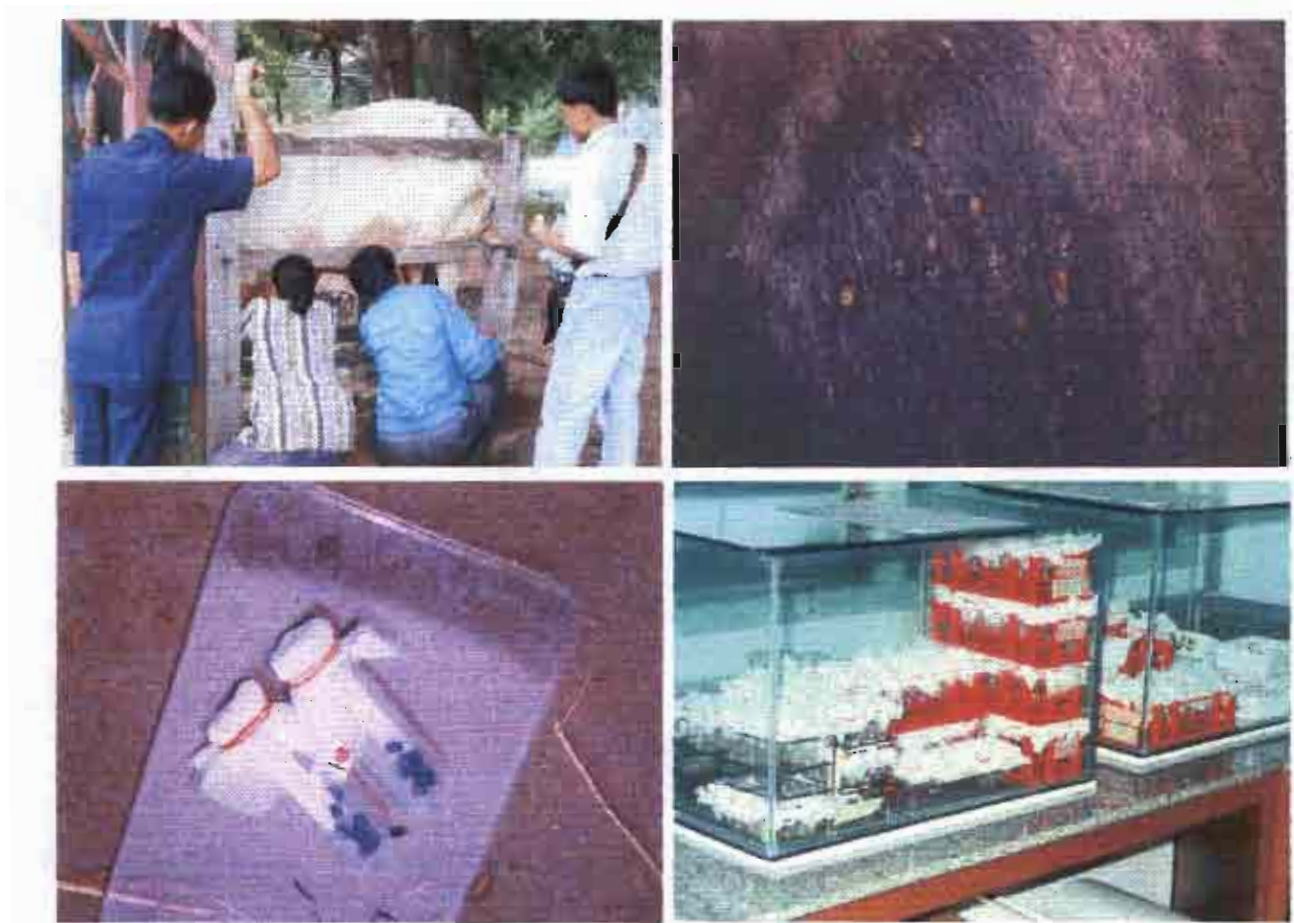
ระเบียบวิธีการวิจัย

1. ศึกษาเห็บโค ที่มาจากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

(Survey of cattle tick from different part of Thailand)

วิธีการทดลองวิจัย (ภาพที่ 1)

- เก็บตัวอย่างเห็บโคจากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย โดยเลือกจังหวัดตัวแทนภาคละ 4 จังหวัด โดยคัดเลือกจากจังหวัดที่มีสถิติจำนวนโค-กระบือ สูงสุด 4 อันดับแรกของแต่ละภาค โดยได้ทำการคัดเลือกดังนี้
ภาคเหนือ – จังหวัด ตาก, อุตรดิตถ์, ลำปาง และแพร่
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ – จังหวัดขอนแก่น, ร้อยเอ็ด, อุบลราชธานี และมุกดาหาร
ภาคกลาง – จังหวัดชลบุรี, อุดรธานี, ลพบุรี และนครสวรรค์
ภาคใต้ – สงขลา, สตูล, นครศรีธรรมราช และ พัทลุง
- ทำการเก็บตัวอย่างเห็บโค ระยะตัวเต็มวัยที่ดูดกินเลือดอิมตัว (engorged female) เพื่อนำมาเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการ โดยเห็บที่ได้จะทำการแยกลักษณะภายนอกด้วย key ของ Harry D. Pratt (Key to genera) และ Key to families, selected genera และ species โดยจะทำการแยกลักษณะภายนอกของเห็บแต่ละชนิด และเลี้ยงต่อไปในห้องปฏิบัติการ โดยจะทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเห็บ 2-4 อำเภอต่อจังหวัด โดยจะเก็บตัวอย่างประมาณ 100-200 ตัว/จังหวัด
- ทำความสะอาดเห็บแต่ละตัว ก่อนแยกใส่ขวดแต่ละตัว และเก็บไว้ในตู้พักเห็บ (tick chamber) เพื่อให้เห็บวางไข่ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C และความชื้นสัมพัทธ์ตั้งแต่ 70 % ขึ้นไป เมื่อเห็บวางไข่จนสมบูรณ์แยกเอาตัวแม่ออก เพื่อป้องกันการเกิดเชื้อราและเก็บไข่ไว้ในตู้เห็บต่อจนไข่ฟักเป็นตัวอ่อน
- ตัวอ่อนของเห็บบางส่วนจะถูกนำไปทดสอบหาเชื้อที่อาจจะผ่านไข่ (Transovarial Transmission) โดยวิธี PCR เพื่อที่จะให้ได้ตัวอ่อนที่สะอาดและไม่ปนเปื้อนต่อปรสิตในเลือด



ภาพที่ 1 การศึกษาเห็บโคที่มาจากภาคต่างๆของประเทศไทย โดยการออกไปเก็บตัวอย่างเห็บจากโคใน
จังหวัดต่าง ๆของประเทศไทย นำมาแยกชนิดของเห็บ ก่อนที่จะนำไปแยกเลี้ยงเพื่อสร้างโคโลนี
ของเห็บที่ได้จากแต่ละภาค

2. การเลี้ยงและรักษาโคโลนีของเห็บโค *B. microplus* ในสัตว์ทดลองและห้องปฏิบัติการ (Rearing and maintaining cattle Tick, *B. microplus* in animals and laboratory)

วิธีการทดลองวิจัย (ภาพที่ 2-5)

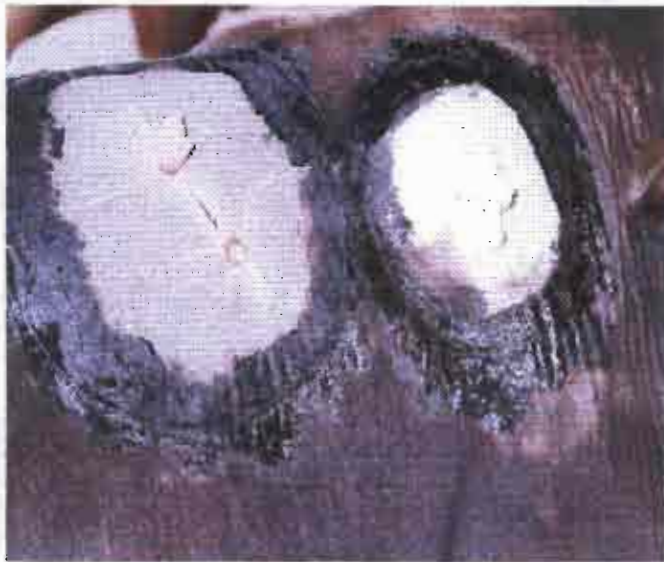
1. ตัวอ่อนของเห็บโคที่ได้จากแต่ละภาค บางส่วนจะถูกนำมาสะกัดทำ extract บางส่วนจะนำมาใส่ในโคนมที่ทำการตัดม้าม (splenectomized calves) เพื่อป้องกันการหลบซ่อนตัวของเชื้อโรคปรสิตในเลือด โคนมเพศเมีย อายุระหว่าง 6-12 เดือน จำนวน 4 ตัว ได้ทำการทดสอบเบื้องต้นหาค่าเลือดและตรวจหาพยาธิในเลือด ด้วยวิธีฟิล์มเลือดย้อมสี และ IFA (Indirect Fluorescence Antibody Test) เพื่อดูว่าสัตว์มีสภาวะการนำโรคที่อาจถ่ายทอดหรือนำโดยเห็บอยู่หรือไม่
2. นำระยะตัวอ่อนของเห็บโคที่ได้จากเห็บแต่ละภาคที่มีอายุ 45-60 วัน มาใส่ในถุงเห็บที่ติดกับตัวสัตว์ด้วยกาว โดยติดถุงเห็บในแนวขนานสันหลัง ตัวละ 4-5 ถุง โดยทำการติดถุงเห็บและทำความสะอาดผิวหนังรวมทั้งโกนขนบริเวณที่จะติดล่วงหน้า 24 ชั่วโมง นำตัวอ่อนจำนวน 1,000-2,000 ตัว ใส่ลงไปในถุงเห็บแต่ละถุง ตรวจถุงเห็บภายใน 24 ชั่วโมงแรก เพื่อดูอัตราการเกาะตัวของเห็บ เนื่องจากถุงเห็บเป็นถุงผ้า เห็บอาจเดินหาดำแหน่งเกาะและติดอยู่ ถ้าไม่ได้ออกอาจแห้งตายได้ หลังจากเห็บเกาะดูเลือดทำการตรวจถุงเห็บทุกวัน วันละ 1-2 ครั้ง เพื่อตรวจสอบสภาพของถุงเห็บ เนื่องจากกาวที่ติดอาจเกิดการหลุดตัว เพราะเหงื่อหรือของเหลวที่เกิดขึ้นมีผลต่อคุณภาพของกาว โคนมที่ใช้แยกเป็น 1 ตัวต่อภาค
3. ระยะตัวอ่อนจะกินเลือดจนอิ่มตัว และลอกคราบเป็นตัวกลางวัย (nymph) เห็บระยะตัวกลางวัยจะเกาะและกินเลือดต่อจนอิ่มตัว และลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งจะเกาะและกินเลือดต่อ เห็บเพศเมียที่กินเลือดอิ่มตัวจะปล่อยตัวหลุดจากตำแหน่งที่เกาะ นำมาแยกเก็บในห้องปฏิบัติการในตู้ฟักเห็บจนกระทั่งเห็บวางไข่
4. เก็บระยะตัวอ่อนของเห็บ เพื่อเลี้ยงต่อไปบนตัวโฮสต์ โดยตัวอ่อนจะทำการสุมมาตรวจหาพยาธิในเลือดที่อาจพบ เนื่องจากเห็บเป็นตัวนำโรคหลายชนิด การเลี้ยงและรักษาโคโลนีให้สะอาดปราศจากเชื้อจะต้องมีการตรวจสอบดังกล่าวทุกครั้งที่ได้ระยะตัวอ่อน
5. ในขณะที่เห็บระยะตัวเต็มวัยดูดกินเลือดทั้งเพศผู้ และเพศเมีย จะถูกแยกออกมาจากโฮสต์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 เพื่อทำการผ่าแยกเอาเนื้อเยื่อต่อมน้ำลายและทางเดินอาหารของเห็บเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาโปรตีนต่อไป



Maintaining clean colony of
B. microplus



ภาพที่ 2 การเลี้ยงและรักษาโคโลนีของเห็บ *B. microplus* ในสัตว์ทดลอง และในห้องปฏิบัติการ เห็บ *B. microplus* ที่แยกเลี้ยงจากแต่ละภาคของประเทศไทยใน
ระยะตัวอ่อนที่ได้จากห้องปฏิบัติการ จะถูกนำมาเลี้ยงต่อในโคโลนีที่ติดมาที่ไม่นำโรคใดๆ ที่อาจติดผ่านเห็บเพื่อให้ได้ระยะตัวเต็มวัย (adult) เพื่อดูและเพาะเมียบ



ภาพที่ 3 การเตรียมตัวสัตว์ก่อนและภายหลังติดถุงเห็บ (Tick bags) โดยก่อนติดถุงเห็บบริเวณที่จะติด

ต้อง ทำการโกนขนและ ทำความสะอาด เพื่อขจัดไขมันที่อาจรบกวนต่อการเนื้อเยื่อ (Tissue glue) ถุงเห็บเตรียมจาก stokinette ที่ติดปลายด้านหนึ่งบนผิวหนังของสัตว์ด้วยกาว ส่วนอีกข้างหนึ่งใช้หนี้อย่างรัด ปิดเอาไว้ ถุงจะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 6 นิ้ว และ จะติดอยู่บนานครบเท่าที่ไม่โดนหรือสัมผัสน้ำ ตำแหน่งที่ติดถุงเห็บอยู่ในแนวขนานสันหลัง โดยสามารถติดถุงเห็บได้ตั้งแต่ 2-4 ถุง ขึ้นอยู่กับขนาดและชนิดของถุงที่จะใช้ กาวที่ใช้เป็นกาวเนื้อเยื่อไม่ทำให้เกิดการระคายเคือง และละลายน้ำได้ดี จึงต้องระวังไม่ให้เกิดความชื้นหรือสัมผัสน้ำโดยตรง



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการติดถุงเก็บบนตัวสัตว์ เริ่มจากการทาการบนผิวหนังและบนตัวถุงก่อนที่จะประกบ บนตัวสัตว์ทำการติดแนวขอบของถุง ที่อาจรั้งหรืออาจแยกได้ด้วยถุงหรือกาว การติดถุงเก็บต้องระวังเรื่องผิวหนังของตัวสัตว์ เนื่องจากผิวหนังมีความยืดหยุ่นสูง และอาจทำให้ถุงเก็บหลุดได้เมื่อเวลาสัตว์เกร็งตัวที่บริเวณผิวหนัง ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจถุงเก็บเป็นประจำทุกวัน และ ถ้าพบช่องหรือรูเกิดขึ้นต้องทำการซ่อมทันที



ภาพที่ 5 ถูงเห็บที่ติดเสร็จแล้วและใส่ระยะตัวอ่อนของเห็บโค *B. microplus* ประมาณ 1,000-2,000 ตัวลงไปในถุง โดยใช้ โค 1 ตัว ต่อ 1 ภาค และภายใน 24 ชั่วโมงแรกต้องทำการตรวจถุงเห็บเพื่อดูจำนวนที่เกาะ ส่วนตัวอ่อนที่ไม่เกาะ ต้องนำออกจากถุง จากนั้นทำการเปิดตรวจถุงทุกวันจนได้ระยะตัวเต็มวัย

3. ความแตกต่างของโปรตีนจากต่อมน้ำลายที่มาจากเห็บโคแต่ละภาค

(Protein profiles of Salivary glands of *B. microplus* from each region of Thailand)

วิธีการทดลองวิจัย

1. เห็บเพศผู้และเพศเมียที่มาจากโคที่เลี้ยงแยกเห็บจากแต่ละภาคจะถูกเก็บและนำมาผ่าทันที เพื่อแยกเอาต่อมน้ำลายและทางเดินอาหาร เนื้อเยื่อของเห็บจะเก็บไว้ใน PBS (Phosphate buffer saline) pH 7.4 ที่ 4°C โดยจะเก็บแยกเป็นต่อม และบางส่วนนำมาทำ extract
2. เนื้อเยื่อต่อมน้ำลาย นำมาปั่นย่อยด้วย Homogenizer ที่ max speed 10 ครั้ง ๆ ละ 1 นาที เพื่อสลายโครงสร้างภายนอก เพื่อให้เซลล์หลุดออกมา โดยทำในถังน้ำแข็ง เพื่อป้องกันการสลายตัวของโปรตีน
3. จากนั้นนำมาย่อยสลายเซลล์ด้วยเครื่อง Sonicator เพื่อให้เซลล์แตก และปล่อยโปรตีนออกมา โดยใช้กำลังคลื่นที่ 30 out put 10 ครั้ง ๆ ละ 1 นาที โดยสารละลายเนื้อเยื่ออยู่ในถังน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อป้องกันการสลายตัวของโปรตีน
4. นำ extract ที่ผ่านการบดและทำลายเปลือกนอกของเซลล์ ไปทำการปั่นที่ 16,000 G เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนน้ำใสด้านบนแยกออกเป็น extract โปรตีนจากต่อมน้ำลายส่วนที่ตกตะกอนอยู่ก้นหลอดให้เก็บเอาไว้ที่ -70°C เพื่อสามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่ในครั้งต่อไป สำหรับส่วนสารละลาย extract จะเก็บเอาไว้ที่ -20°C เพื่อการตรวจหาความเข้มข้นโปรตีน
5. นำสารละลาย extract โปรตีนจากต่อมน้ำลาย มาทำการตรวจหาความเข้มข้นโปรตีนโดยวิธี Bradford โดยใช้ชุดตรวจของ Protein Assay (BioRad) โดยตรวจหาได้ ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน ประมาณ 150 µg/ml
6. เตรียมสารละลาย sample buffer ที่ประกอบไปด้วย

1. Tris (HCl)
2. Bromo-phenol blue
3. Glycerine
4. Deionized water

นำสารละลาย extract ที่คำนวณความเข้มข้นโปรตีนเพื่อใช้ load polyacrylamide gel โดย gel ที่ใช้เป็น ingradient gel ความเข้มข้น 4-20 % (BioRad) มีช่องสำหรับ load protein จำนวน 10 ช่อง โดยแต่ละช่องมีความจุไม่เกิน 30 µl ของปริมาตร ปริมาณโปรตีนอย่างน้อยที่จะ load ประมาณ 10 µg โดยการเจือจางหรือเตรียมสารเพื่อ load gel จะใช้ sample buffer เป็นตัวช่วย

7. เตรียมสารละลาย PAGE buffer ประกอบไปด้วย

1. Glycine
2. Tris (base)
3. SDS
4. Deionize H₂O

เตรียมให้ได้ pH 8.2 โดยไม่มีการปรับ pH

8. เริ่มขบวนการแยกโปรตีน โดยใช้เครื่อง Mini protein III (BioRad) โดยใช้ Kaleidoscope เป็น marker load สารละลาย extract ใน sample buffer ลงในช่องต่าง ๆ ของ ready gel โดยใช้ fine tip บน micropipette ตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 200 volt หรือ 60 Amp เป็นเวลา 30-45 นาที จากนั้น เมื่อ marker เดินมาจนถึงขอบ gel ให้หยุดปฏิกิริยา นำ gel แผ่นที่ 1 ไปแช่ใน Coomassie blue เพื่อย้อมสีแถบโปรตีนที่เกี่ยวข้อง ส่วน gel แผ่นที่ 2 นำไปแช่ใน Running buffer ของ Western blot buffer เพื่อรอแยกหาโปรตีนที่สัมพันธ์กับแอนติบอดี

4. โปรตีนจากต่อมน้ำลายของเห็บโคที่มีส่วนสัมพันธ์กับแอนติบอดี

(Salivary gland proteins associated with antibodies)

วิธีการทดลองวิจัย

1. Gel ที่ run ขบวนการ electrophoresis และแยกได้โปรตีนจากต่อมน้ำลายของเห็บแต่ละภาค แช่ใน Running buffer ที่ประกอบด้วย
 1. Glycine
 2. Tris (base)
 3. SDS
 4. Methanol alcohol
 5. Deionized water
2. นำ gel มาประกบกับ PVDF membrane กระดาษกรองและฟองน้ำใส่ใน cassette และใส่ใน Transbolt cell (BioRad) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 volts เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยพยายามให้ Running buffer เย็นตลอดเวลาเพื่อป้องกัน gel ไม่ร้อนเกินไป จนเสียรูปร่างและมีผลให้แถบโปรตีนที่ได้มีลักษณะบิดเบี้ยวไป
3. เมื่อทำการย้ายโปรตีนจนสมบูรณ์แล้ว นำ gel ที่ย้ายโปรตีนไปแล้วไปทดสอบว่ามีโปรตีนหลงเหลืออยู่ โดยแช่ใน Coomassie blue ส่วน PVDF membrane จะนำไปแช่ใน washing buffer ที่ประกอบไปด้วย
 1. TBS
 2. Tween-20
 3. Gelatin
4. นำ membrane ไปแช่ในสารละลายที่มีสาร blocking blocking buffer โดยจะแช่เพื่อทำการ block ส่วนที่ไม่จำเพาะที่แอนติบอดีอาจจับเกาะและเกิดปฏิกิริยาได้ โดยจะแช่เอาไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง อาจแช่ไว้นานข้ามคืน บนเครื่องเขย่า
5. นำ membrane ไปแช่ล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที บนเครื่องเขย่า
6. นำ membrane ไปแช่ใน primary antibody buffer ที่มีซีรัมของโคที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างน้อย 1-2 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า แล้วจึงนำไปล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
7. นำ membrane ไปแช่ใน secondary antibody buffer ที่มีความเข้มข้นของแอนติบอดี ที่ conjugate ด้วยเอนไซม์ peroxidase 1:1000 อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ก่อนล้าง membrane ด้วย washing buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

8. นำ membrane แช่ในสารละลาย substrate DAB (Diamino Benzidine) เร่งปฏิกิริยาด้วย H_2O_2 และสังเกตการเกิดปฏิกิริยา จะพบแถบโปรตีนที่จับกับ primary antibody ที่ทำปฏิกิริยากับ secondary and body และ substrate
9. หยุดปฏิกิริยาด้วย deionized water แล้วนำไปตรวจหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนที่พบ

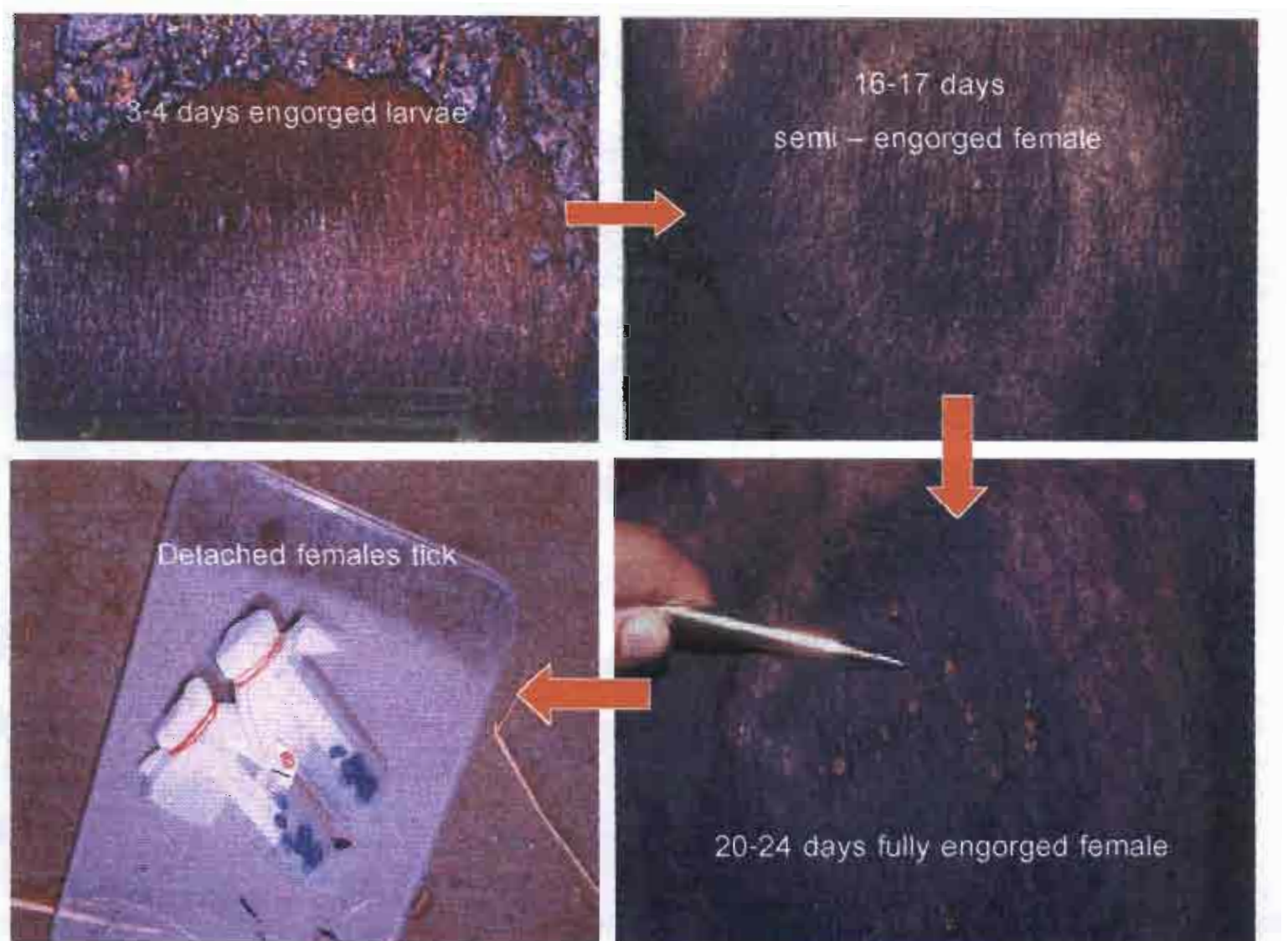
ผลการทดลอง

1. การศึกษาชนิดของเห็บโคที่มาจากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

- จากการแยกชนิดของเห็บ โดยอาศัย Key ของ Harry D. Pratt และ Krantz พบเห็บโคชนิดต่าง ๆ ดังนี้
ภาคเหนือ พบเห็บ *Boophilus microplus* (95%), *Rhipicephalus sanguineus* (4%) และ *Haemaphysalis* spp (1 %)
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบเห็บ *B. microplus* (99%) และ *Haemaphysalis* spp (1%)
ภาคกลาง พบเห็บ *B. microplus* (98%), *R. sanguineus* (2 %)
ภาคใต้ พบเห็บ *B. microplus* (100 %)

2. การเลี้ยงและรักษาโคโลนีของเห็บโค *B. microplus* ในสัตว์ทดลองและห้องปฏิบัติการ (ภาพที่ 6)

- จากการศึกษาวงจรชีวิตของเห็บ *B. microplus* ในสัตว์ทดลองและห้องปฏิบัติการ พบรายละเอียดของวงจรชีวิตปรากฏดังนี้
ระยะบนตัวโฮสต์
เห็บระยะบนตัวโฮสต์ จะดูดกินเลือดอิมตัว (Engorged larvae) ใช้เวลา 2-4 วัน
จะลอกคราบเป็นระยะตัวกลางวัย (Nymph) ใช้เวลา 3-5 วัน
เห็บระยะตัวกลางวัย จะดูดกินเลือดอิมตัว (Engorged nymph) ใช้เวลา 4-5 วัน
เห็บระยะตัวกลางวัย จะลอกคราบเป็นระยะ ตัวเต็มวัย (Adult) ใช้เวลา 1-5 วัน
เห็บระยะตัวเต็มวัย จะใช้เวลาดูดกินเลือดช่วงแรก (Slow feeding) ใช้เวลา 6-7 วัน
เห็บระยะตัวเต็มวัย จะใช้เวลาดูดกินเลือดหลังจากตัวผู้ผสมพันธุ์แล้ว (Fast feeding) ใช้เวลา 4-6 วัน
ระยะเวลาที่อยู่บนตัวโฮสต์ใช้เวลา 21-25 วัน
ระยะนอกตัวโฮสต์
เห็บเพศเมียที่ดูดกินเลือดอิมตัวจะเริ่มวางไข่ ภายใน 2-4 วัน หลังจากลงจากตัวโฮสต์
ระยะฟักตัวอ่อนจากไข่ใช้เวลา 14-21 วัน
รวมระยะเวลานอกตัวโฮสต์ จะใช้เวลาประมาณ 14-30 วัน
รวมวงจรชีวิตของเห็บ *B. microplus* ทั้งหมดจะใช้เวลาทั้งหมด 6-8 สัปดาห์
ความชื้นสัมพัทธ์ในตู้เห็บ 80-90 %
อุณหภูมิ ระหว่าง 20-30 C°



ภาพที่ 6 แสดงระยะต่าง ๆ ของเห็บโค *B. microplus* ที่เลี้ยงในถุงเห็บ และระยะวงจรชีวิตของเห็บซึ่งจะถูกนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการโดยจะเลี้ยงอยู่ในตู้ฟักเห็บ (Tick chamber) ที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น จากนั้นจะนำมาเลี้ยงในสัตว์ทดลองและเก็บเห็บเพศผู้เพศเมียตามระยะเวลาเพื่อเก็บต่อมน้ำลายและเนื้อเยื่อต่าง ๆ เพื่อใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของต่อมน้ำลายในเห็บที่มาจากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

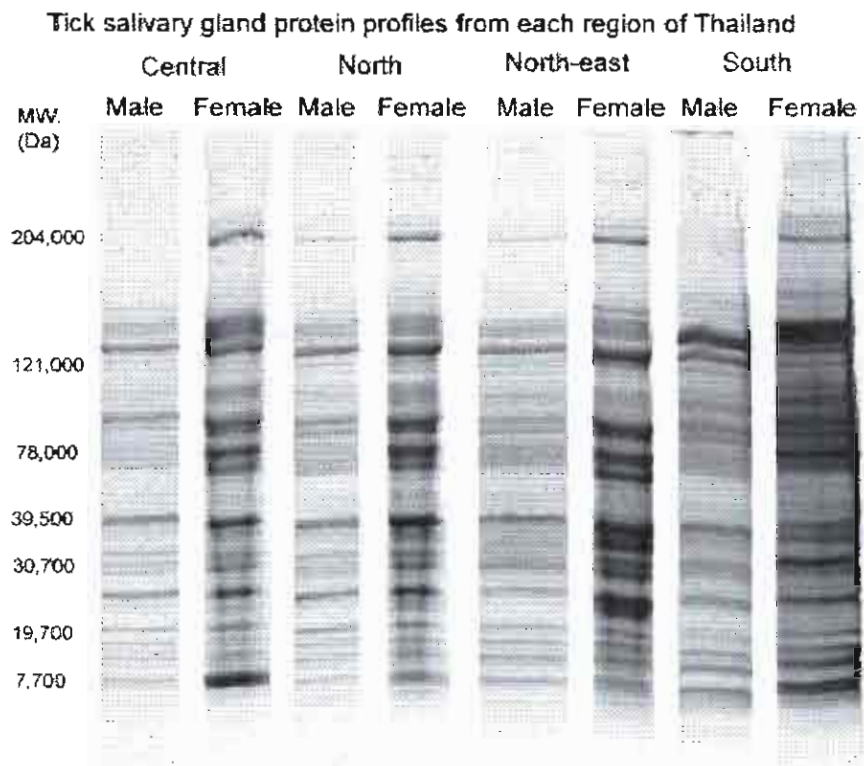
3. ความแตกต่างของโปรตีนจากต่อมน้ำลายที่มาจากเห็บโค (*B. microplus*) จากแต่ละภาคของประเทศไทย (ภาพที่ 7)

ความแตกต่างของเห็บโคเพศผู้และเพศเมีย ในส่วนของต่อมน้ำลายจะมีความแตกต่างที่ค่อนข้างเด่นชัด โปรตีนจากต่อมน้ำลายของเห็บเพศเมียมีปริมาณมากกว่าในเพศผู้ โดยพบโปรตีนในเห็บเพศผู้ ตั้งแต่ 7.7 จนถึง 204 kilodalton โดยพบโปรตีนอยู่ระหว่าง 17-21 ชนิด ขณะที่ในเห็บเพศเมียพบโปรตีน 19-28 ชนิด โดยในเห็บเพศผู้ พบโปรตีนจากต่อมน้ำลาย ดังนี้ 7.7, 8.5, 14, 16, 18, 19.7, 27, 29, 30, 31, 32, 39.5, 70, 78, 90, 92, 100, 110, 120, 130, 140, 204, 210, 220, 300 และ 400 kDa สำหรับในเห็บเพศเมียพบโปรตีนขนาด 7.7, 14, 16, 18, 19.7, 27, 30, 32, 38, 39.5, 45, 50, 70, 78, 82, 90, 92, 100, 115, 120, 130, 131, 134, 140, 150, 180, 204, 210, 220, 300 และ 400 kDa

เห็บโคจากแต่ละภาคของประเทศไทย มีต่อมน้ำลายที่มีโปรตีนทั้งที่เหมือนกันและต่างกัน ส่วนที่เหมือนกันในเห็บเพศเมียของแต่ละภาคได้แก่ 7.7, 14, 16, 18, 27, 30, 39.5, 78, 121 kDa ส่วนที่ต่างกันจะเห็นได้ชัดในภาคใต้ ซึ่งพบโปรตีนจำนวนมาก ในเห็บเพศผู้ โปรตีนที่เหมือนกันได้แก่ 7.7, 14, 16, 18, 27, 30, 39.5, 78, 121 และ 140 kDa และเช่นเดียวกันที่พบความแตกต่างในต่อมน้ำลายที่มาจากเห็บในภาคใต้ ซึ่งมีจำนวนโปรตีนมากกว่า

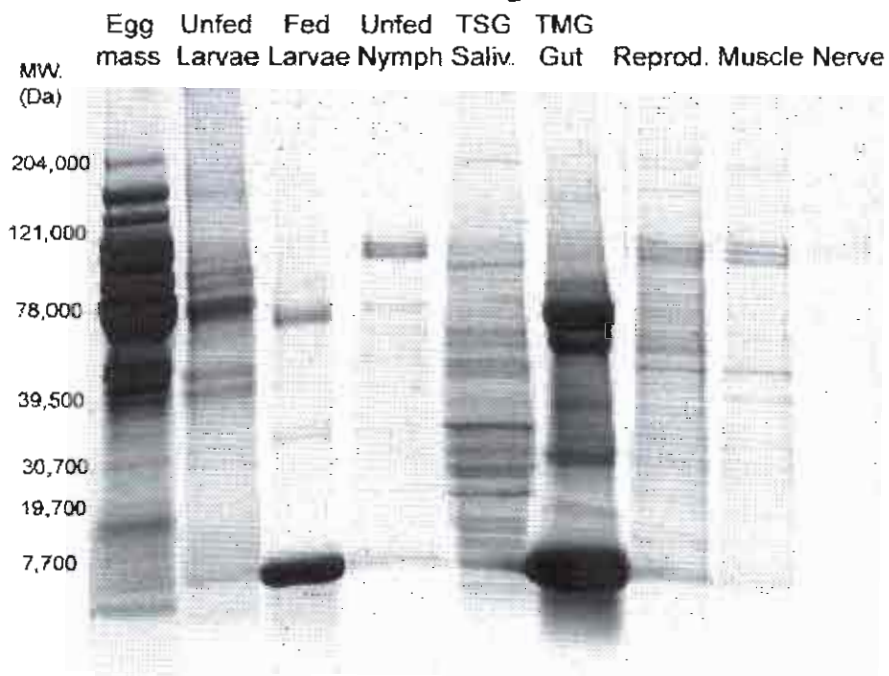
4. ความแตกต่างของโปรตีนที่มาจากเนื้อเยื่อเห็บแต่ละชนิด (ภาพที่ 8)

โปรตีนจากมวลไข่ (egg mass) มีความเข้มข้นของแถบโปรตีนเห็บโคชัดกว่าในเนื้อเยื่ออื่น ๆ โดยพบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 7.7, 10, 27, 39.5, 78, 80, 85, 90, 100, 121, 140, 150, 160, 170, 180 และ 204 kDa ในขณะที่โปรตีนจากระยะตัวอ่อนพบโปรตีนไม่กี่ชนิด ได้แก่ 10, 39.5, 78, 90, 121, 130, 140, 160 และ 180 สำหรับโปรตีนจากระยะตัวอ่อนที่ดูดกินเลือด (fed larvae) จะพบโปรตีนส่วนใหญ่ที่ 10 kDa และโปรตีนอื่น ๆ ที่พบคือ 39.5, 121 และ 140 kDa สำหรับระยะตัวกลางวัย (nymph) พบที่ระยะ 10, 78, 80, 100, 121, 150, 160 และ 170 kDa สำหรับต่อมน้ำลายของเห็บระยะตัวเต็มวัย พบเช่นเดียวกับที่รายงานที่รายงานในเรื่องของต่อมน้ำลายจากเห็บแต่ละภาค ส่วนทางเดินอาหารพบโปรตีนคล้ายในระยะตัวอ่อนที่ดูดกินเลือด โดยพบระยะ 10, 39.5, 50, 80, 90, 100, 120, 140, 150, 180 และ 204 kDa ในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ (Reproductive tissue) พบโปรตีนที่ 10, 19.7, 30.7, 39.5, 78, 85, 90, 121, 130, 180, 204, 210 และ 220 kDa ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อพบโปรตีน 10, 19.7, 27, 39.5, 45, 78, 90, 100, 110, 120, 150, 160, 170 และ 190 kDa สำหรับโปรตีนจากเนื้อเยื่อประสาท (Nerve ganglion) พบโปรตีนเพียง 2 ชนิด คือ 160 และ 170 kDa



ภาพที่ 7 รูปแบบของโปรตีนจากค่อมน้ำลายของเห็บที่มาจากแต่ละภาคของประเทศไทย
เปรียบเทียบทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยวิธี PAGE และย้อมสีด้วย Coomassie blue โดย
เปรียบเทียบกับน้ำหนักโปรตีนมาตรฐานทางด้านซ้ายมือ (7,700-204,000 .Da)

Protein of tick at different stages and other tissues



ภาพที่ 8 โปรตีนที่มาจากเนื้อเยื่อหีบแต่ละชนิดเปรียบเทียบกัน โดยวิธี PAGE

และย้อมสีด้วย Coomassie blue โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานทางด้าน

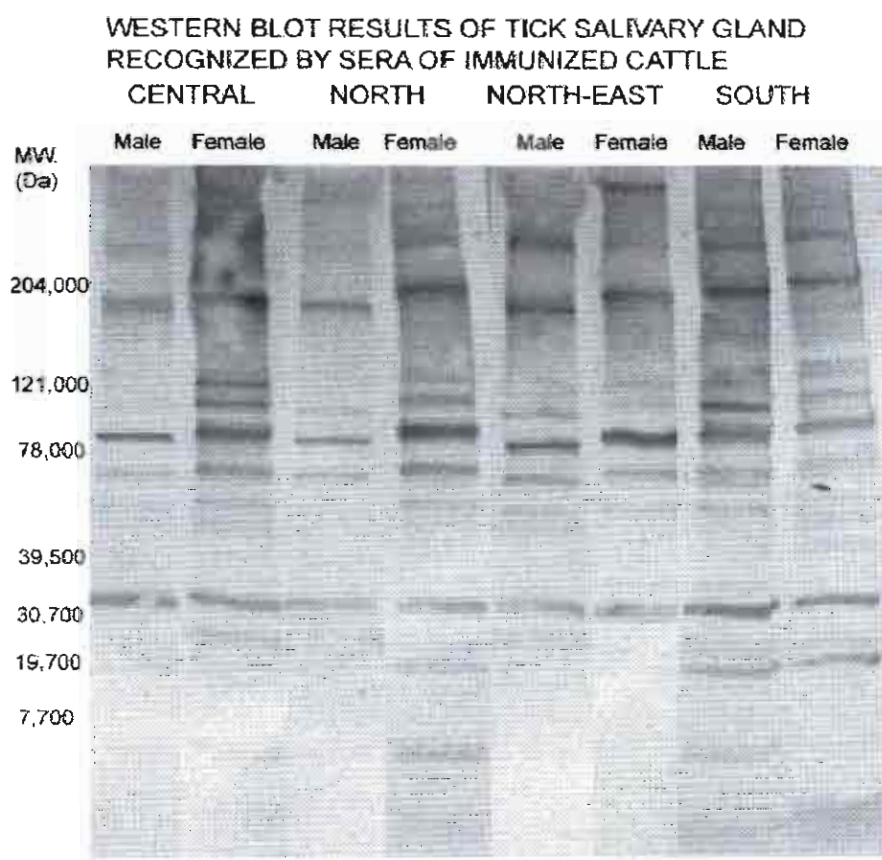
ซ้ายมือ (7,700-204,000 Da) TSG = Tick Salivary Gland

TMG = Tick Midgut

5. โปรตีนจากต่อมน้ำลายที่มีความสัมพันธ์กับแอนติบอดี (ภาพที่ 9)

โปรตีนที่พบจะมีจำนวนน้อยกว่าที่พบในวิธี PAGE เนื่องจากโปรตีนชนิดเท่านั้นที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีได้ โดยพบว่าเห็บเพศเมียจะมีโปรตีนที่มีการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี มากกว่าเห็บเพศผู้ โดยพบโปรตีนประมาณ 10-14 ชนิด ขณะที่ในเพศผู้จะพบประมาณ 6-12 ชนิด ในเห็บเพศเมียจะพบโปรตีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันดังนี้คือ 7.7, 27, 30.7, 50, 70, 78, 90, 121, 180, 204, 220, 300 และ 400 kDa ขณะที่ในเพศผู้จะพบโปรตีน 7.7, 19.7, 30.7, 50, 70, 78, 110, 121, 140, 204, 220 และ 300 kDa

โปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับแอนติบอดีจากแต่ละภาคมีความแตกต่างกันในภาพรวม โดยจะมีความแตกต่างประมาณ 20-30 % โดยพบโปรตีนหลักๆ ที่มาจากเห็บแต่ละภาคที่คล้ายกันได้แก่ 7.7, 19.7, 30.7, 50, 60, 78, และ 204 kDa



ภาพที่ 9 แสดงแถบโปรตีนของต่อมน้ำลายที่เกิดขึ้นจากเทคนิค Western Blot โดยใช้แอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยเนื้อเยื่อต่อมน้ำลายในสัตว์ทดลอง โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานทางซ้ายมือ (7,700-204,000 Da)

บทวิจารณ์

1. การศึกษาชนิดของเห็บโคที่มาจากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

ชนิดของเห็บโคที่มาจากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ส่วนใหญ่ร้อยละ 90 เป็นเห็บชนิด *B. microplus* ที่เป็นเห็บชนิด 1-host tick ที่มีความจำเพาะต่อโค กระบือมากกว่าเห็บชนิดอื่น ๆ เห็บที่พบรองลงมา ได้แก่ เห็บ *Rhipicephalus sanguineus* ซึ่งเป็นเห็บชนิด 3-host tick ที่ส่วนใหญ่จะพบในสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข มากกว่าสัตว์ชนิดอื่น ๆ การติดเห็บชนิดนี้อาจเกิดจากการเลี้ยงสัตว์เลี้ยงอยู่ใกล้กับสัตว์ใหญ่ เช่น โค กระบือ ทำให้มีการแพร่กระจายของเห็บชนิดนี้ ส่วนเห็บชนิดสุดท้ายที่พบในโค ได้แก่ *Haemaphysalis spp.* ซึ่งเป็นเห็บชนิด 2-host tick โดยมักจะพบในเขตภูเขาหรือชายป่ามากกว่าที่จะพบในเขตเมือง เห็บชนิดนี้มักจะพบในโคกระบือที่นำไปเลี้ยงในเขตชายป่า หรือ ภูเขา หรือที่มีสัตว์ป่าชุกชุม การเลี้ยงสัตว์ในบางพื้นที่ เช่น ในภาคเหนือ และภาคใต้ นิยมเลี้ยงสัตว์แบบปล่อยหากินเป็นอิสระอยู่ตามป่าเขา และทะเลสาบ ทำให้มีโอกาสติดเห็บชนิดนี้ได้ แต่เนื่องจากสัตว์ดังกล่าวไม่สามารถบังคับมาให้ง่ายได้ซึ่งเจ้าของสัตว์จะจับตัวสัตว์ต่อเมื่อจะทำการขาย ทำให้ไม่พบเห็บชนิดนี้จากการเก็บตัวอย่างครั้งนี้จากในภาคใต้ ถึงแม้จะพบว่าเห็บ 3 ชนิด ในโคกระบือ แต่ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นชนิด *B. microplus* ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าเป็นตัวแทนของเห็บโคที่พบในประเทศไทย ซึ่งการที่จะเลือกพัฒนาวัคซีนต่อต้านเห็บโค สมควรที่จะเลือกพัฒนาวัคซีนต่อต้านเห็บ *B. microplus*

2. การเลี้ยงและรักษาโคโลนีของเห็บโค *B. microplus* ในสัตว์ทดลองและห้องปฏิบัติการ

เห็บโค *B. microplus* ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เลี้ยงได้เพียงระยะที่เป็นไข่และตัวอ่อนระยะแรก การเลี้ยงเห็บชนิดนี้มีข้อจำกัดที่เป็นเห็บชนิด 1-host tick ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่บนตัวสัตว์ ถ้าหากดูจากจำนวนวันของระยะบนตัวโฮสต์กับระยะนอกตัวโฮสต์ จะมีจำนวนใกล้เคียงกัน แต่ในความเป็นจริงแล้วระยะที่อยู่นอกตัวสัตว์มีเพียงระยะที่เป็นไข่เท่านั้น ส่วนระยะอื่น ๆ จำเป็นต้องอาศัยอยู่บนตัวสัตว์ มิฉะนั้นจะตายไปในที่สุด

การเลี้ยงและรักษาโคโลนีของเห็บโค *B. microplus* จำเป็นต้องอาศัยสัตว์ที่เป็นโฮสต์ตามธรรมชาติ ซึ่งจะทำให้เห็บสามารถเกาะได้ดี การเลี้ยงเห็บในถุงเห็บมีข้อเสียบางประการ เช่น การจำกัดให้เห็บเกาะในตำแหน่งที่ติดถุงเห็บ เนื่องจากเพื่อป้องกันการเกาะ การดูแล เนื่องจากเกิดอาการคัน ทำให้ต้องติดถุงเห็บในตำแหน่งที่สัตว์ไม่อาจเอื้อมหรือเอี้ยวตัวได้ เห็บโคโดยธรรมชาติจะมีตำแหน่งที่เกาะในบริเวณที่ต่างออกไป เช่น คอ โคนหาง ขาพับด้านใน นอกจากนี้การเลี้ยงเห็บอยู่ในถุงเห็บ ทำได้ในจำนวนจำกัด เนื่องจากถุงเห็บมีพื้นที่จำกัด แม้จะสามารถติดตั้งได้หลายถุงก็อาจไม่เพียงพอถ้าต้องการเห็บเป็นจำนวนมาก ๆ

3. รูปแบบของโปรตีนของโปรตีนจากต่อมน้ำลายที่มาจากเห็บโคในแต่ละภาค

จากผลของ PAGE พบว่าโปรตีนของต่อมน้ำลายของเห็บเพศผู้และเพศเมีย มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากต่อมน้ำลายมีการทำงานอย่างมากในเห็บเพศเมีย เนื่องจากการดูดกินเลือดมากกว่าเห็บเพศผู้ โดยต่อมน้ำลายจะมีลักษณะภายนอกที่มีการเพิ่มขนาดของต่อมอย่างมากตามขนาดของตัวเห็บ ในขณะที่เห็บเพศผู้จะกินเลือดเพื่อประทังชีวิต แต่เมื่อพิจารณาถึงโปรตีนหลักของต่อมน้ำลาย พบว่ามีโปรตีนหลัก ๆ ที่คล้ายกัน ได้แก่ 7.7, 14, 16, 18, 27, 30.7, 39.5, 78, 90, 100, 121 และ 204 kDa โปรตีนเหล่านี้อาจจะเป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural proteins) หรือ โปรตีนหลัก (major proteins) ที่เห็บส่วนใหญ่จะสร้างขึ้นตามธรรมชาติ

ความแตกต่างที่เห็นได้จากเห็บในภาคใต้ เป็นส่วนสำคัญส่วนหนึ่งที่บ่งบอกถึงความเป็นไปได้ของการเกิดความผันแปร (variation) ในประชากรเห็บที่อาจเกิดขึ้นได้ เนื่องจากเห็บโคในภาคใต้ส่วนใหญ่โคพันธุ์พื้นเมือง เนื่องจากชาวบ้านนิยมเลี้ยงมากกว่าโคสายพันธุ์ต่างประเทศ โดยธรรมชาติของสัตว์พันธุ์พื้นเมือง พบว่าจะมีความต้านทานตามสายพันธุ์ (Breed resistance) ต่อการเกาะดูดเลือดของเห็บ และทำให้เห็บมีลักษณะผิดปกติไป เนื่องจากเกิดภูมิคุ้มกัน ซึ่งมีผลต่อลักษณะทางชีววิทยาของเห็บ ผลกระทบโดยตรงที่เกิดขึ้นจะส่งผลต่อการดูดกินเลือดของเห็บ ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลที่ว่าเห็บจะต้องมีการพัฒนาการ เพื่อหลบเลี่ยงผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ดังกล่าว ทำให้เห็บอาจเกิดความเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างหรือผลิตโปรตีนที่แตกต่างไปจากเห็บโดยทั่ว ๆ ไปได้

4. รูปแบบของโปรตีนจากเนื้อเยื่อเห็บชนิดต่าง ๆ และระยะต่างของเห็บ *B. microplus*

จากผลของ PAGE พบว่าเนื้อเยื่อที่มีโปรตีนอยู่เป็นจำนวนมาก ได้แก่ มวลไข่ (egg mass) ซึ่งให้แถบโปรตีนจำนวนมาก รองลงมาได้แก่ต่อมน้ำลาย และทางเดินอาหาร จากการศึกษารังนี้ ทำให้สามารถทราบได้ว่า ในเนื้อเยื่อของเห็บแต่ละชนิดมีโปรตีนร่วมที่พบมีน้ำหนักประมาณ 90-100 kDa ซึ่งอาจจะมีส่วนสำคัญในการพิจารณาเลือกเป็นแอนติเจนที่นำมาพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป ถ้าหากมีการพิสูจน์ได้ว่า โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน มีคุณสมบัติเหมือนกันหรือเป็นโปรตีนชนิดเดียวกัน โปรตีนจากทางเดินอาหารมีความเข้มข้นของแถบโปรตีนมากที่สุดที่ระดับ 7.7 kDa อาจมาจากส่วน ฮีโมโกลบิน ซึ่งเป็นเลือดที่ตกค้างอยู่ในทางเดินอาหาร สำหรับโปรตีนจากกล้ามเนื้อและระบบประสาทของเห็บ พบโปรตีนอยู่เป็นจำนวนน้อย เช่นเดียวกับในส่วนของโปรตีนจากตัวกลางวัยที่ยังไม่ดูดกินเลือด (nymph) พบโปรตีนที่ระดับ 90-100 kDa ที่สอดคล้องกับโปรตีนจากต่อมน้ำลายที่อาจมีความสัมพันธ์กัน

5. โปรตีนจากต่อมน้ำลายของเห็บโคที่มีส่วนสัมพันธ์กับแอนติบอดี

จากผลของเทคนิค Western blot พบว่า โปรตีนจากต่อมน้ำลายมีคุณสมบัติการเป็น immunogenicity สูง ซึ่งจะพบโปรตีนจำนวนมากเกี่ยวข้องกับแอนติบอดี โดยจะพบในเห็บเพศเมียมากกว่าเห็บเพศผู้ โดยจะพบในเห็บทุก ๆ ภาค ซึ่งแสดงถึงความใกล้เคียงกันหรือความคล้ายของโปรตีนจากต่อมน้ำลายของเห็บเพศเมียในแต่ละภาค โดยโปรตีนหลัก ๆ ที่พบร่วมกันในเห็บจากทุกภาค ได้แก่ 32, 60, 80, 204 และ 300 kDa ส่วนโปรตีนอื่น ๆ มีความแตกต่างกันไปในแต่ละภาค โปรตีนที่น่าสนใจน่าจะเป็นโปรตีนหลักที่พบในแต่ละภาคซึ่งในกรณีนี้ที่แอนติบอดีเป็นภูมิคุ้มกัน ก็สามารถนำไปใช้พิจารณาเป็นวัคซีนที่ใช้ป้องกันเห็บโคในทุก ๆ ภาคอย่างได้ผล

Literature Cited

1. **Drummond, R. O.** 1987. Economic aspects of ectoparasites of cattle in North America. In MSD AGVET Symposium.
2. **Drummond, R. O. G. J. E. K.S, E.,** 1988. Effects of arthropod pests on livestock production. In Control of arthropod pests of livestock; a review of technology. CRC Press: Boca Ration, FL, 1-27 pp
3. **Kunz, S. E. M., K. D, Lambert, G. James, L. F. Terrill, C. E.,** 1991. Estimated losses of livestock to pests, in CRC Handbook of pest management in agriculture. D. Pimental, Editor, CRC Press: Boca Raton, Fl. 69-98 pp
4. **World commission on environment and development,** in our common future. 1987. Oxford University Press: London. 400 pp
5. **Donald, A. D.** 1994. Parasite, animal production and sustainable development. Veterinary Parasitology. 54:27-47
6. **Willadsen, P., et al.,** 1995. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. Parasitology, 110 Suppl:S43-50
7. **Wikel, S. K.,** 1981. The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg, 30(1):284-8
8. **Wikel, S. K.,** 1988. Immunological control of hematophagous arthropod vectors: utilization of novel antigens. Vet. Parasitol, 29(2-3):235-64
9. **Willadsen, P., R. V. Mckenna, and G. A. Riding,** 1988. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. Int. J. Parasitol, 18(2): 183-9
10. **Bowessidjaou, J, M, Brossard, and A. Aeschlimann,** 1977. Effects and duration of resistance acquired by rabbits on feeding and egg laying in *Ixodes ricinus* L. Experientia, 33(4):528-30
11. **Brossard, M.,** 1977. Rabbits infested with the adults of *Ixodes ricinus* L : passive transfer of resistance with immune serum. Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales, 70(3) :289-94
12. **Trager, W.,** 1939. Acquired immunity to ticks. J. Parasitol., 25 :57-81
13. **Brown, S. J., R. W. Barker, and P.W. Askenase,** 1984. Bovine resistance to *Amblyomma americanum* ticks: an acquired immune response characterized by cutaneous basophil infiltrates. Vet. Parasitol, 16(1-2):147-65.
14. **Bington, K. C.,** 1978. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. Int J Parasitol, 8(2):97-115
15. **Fawcett, D. W., S. Doxsey, and G. Buscher,** 1981. Salivary gland of the tick vector (*R. appendiculatus*) of East Coast Fever. I. Ultrastructure of the type III acinus. Tissue Cell, 13(2):209-30
16. **Allen, S. J., S. Z. Shapiro, and P. W. Askenase,** 1979. Characterization of Guinea pigs and cattle against ticks. Nature, 280:491-493
17. **Brown, S. J., S. Z. Shapiro, and P. W. Askenase,** 1984. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. I. Immunization of Guinea pigs with *Amblyomma americanum*-derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein antigen with guinea pig anti-tick antibodies. J. Immunol, 133(6):3319-25
18. **Brown, S. V. J. and P. W. Askenase,** 1986. *Amblyomma americanum* Physiochemical isolation of a protein derived from the tick salivary gland that is capable of inducing immune resistance in guinea pigs. Exp. Parasitol, 62(1): 40-50.
19. **Shapiro, S. Z., W. P. Voigt, and J. A. Ellis,** 1989. Acquired resistance to *Ixodid* ticks induced by tick cement antigen. Exp. Appl. Acorol, 7(1):33-41

20. **Jaworski, D.C., et al., 1990.** *Amblyomma americanum* : identification of tick salivary gland antigens from unfed and early feeding females with comparison to *Ixodes dammini* and *Dermacentor variabilis*. *Exp Parasitol*, 70(2):217-26
21. **Sahibi, H., A. Rhalem, and O. O. Barriga, 1997.** Comparative immunizing power of infections, salivary extracts, and intestinal extracts of *Hyalomma marginatum* in cattle. *Vet. Parasitol*, 68(4):359-66
22. **Kocan, K. M., Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle.** *Vet Parasitol*, 57(1-3):121-51
23. **Kaufman, W. R. and P. A. 1996.** Nuttall, *Amblyomma variegatum* (Acari:Ixodidae): mechanism and control of arbovirus secretion in tick saliva. *Exp. Parasitol*, 82(3):316-23
24. **McSwain, J. L., R. C. Essenberg, and J. R. Sauer. 1982.** The female Protein changes in the salivary glands of lone star tick, *Amblyomma americanum*, during feeding. *J. Parasitol*, 68(1):100-6
25. **Barriga, O. O., et al., 1990.** Antigens of *Amblyomma americanum* ticks recognized by repeatedly infested sheep. *J. Parasitol*, 77(5):710-6
26. **Schwartz, B. S., J. M. Ribeiro, and M. D. Goldstein, 1990.** Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme diseases research. *Am. J. Epidemiol*, 132(1): 58-66
27. **Kohler, G., et al., 1967.** Immune biological research on rabbits with *Ixodidae* infestation *Berl Munch Tierarzti Wochenschr*, 80(20):396-400
28. **Garin, N.S. and P. A. Grabarev.** Immune reaction in rabbits and guinea pigs during repeated feeding on them of *Ixodid* ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Latr., 1806) *Med parasitol(Mosk)*, 1972. 42(3):274-9
29. **Brossard, M., 1976.** Immunologic relations between cattle and ticks, specifically between cattle and *Boophilus microplus*. *Acta Trop*, 33(1):15-36
30. **Gordon, J. R. and J. R. Allen, 1991.** Nonspecific activation of complement factor 5 by isolated *Dermacentor andersoni* salivary antigens. *J Parasitol*, 77(2):296-301
31. **Ackerman, S., et al., 1981.** Passage of host serum components, inducing antibodies, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis*(Say). *J Parasitol*, 67(5):737-40
32. **Johnston, L. A., D. H. Kemp, and R. D. Pearson, 1986.** Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on tick populations. *Int. J. Parasitol*, 16(1): 27-34.
33. **Agbede, R. I. S., and D. H. Kemp. 1986.** Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: histopathology of ticks feeding on vaccinated cattle. *International J. Pararitology*, 16: 35-41
34. **Willadsen, P. and R. V. McKenna, 1991.** Vaccination with 'concealed' antigens: myth or really? *Parasite Immunol*, 13(6):605-16
35. **Willadsen, P., et al., 1993.** The nucleotidase of *Boophilus microplus* and its relationships to enzymes from the rat and *Escherichia coli*. *Insect. Biochem Mol Biol*, 23(2):291-5
36. **Kemp, D. H., Agbede, R. I. S., Jonhston, L. A., and Gough, J. M. 1986.** Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. *International J. Parasitology*, 16:115-120
37. **Sahibi, H., et al., 1997.** *Hyalomma* ticks: bovine resistance under field condition related to host age and breed. *Parasite*, 4(2):159-65
38. **Frisch, J. E. 1994.** Identification of a major gene for resistance to cattle ticks. *Proc. 5th World Congress Appl. Livestock Prod.*, 20:293-295

39. **Kemp**, D. H., Koudstal, D, Roberts, J. A., Kerr, J. D. 1976. *Boophilus microplus*: the effect of host resistance on the attachments and growth. *Parasitology*, 73(1):123-36
40. **Knowles**, A. G. and Opdebeeck, J. P. 1996. Uniformity of protective antigens among isolates of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Med. Vet. Ent.*, 10:301-304
41. **Bowman**, A. S., Coons, L. B., Needham, G. R. and Sauer, J. R. 1997. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. *Med. Vet. Entomology*, 11:277-285
42. **de la Fuente** J, Rodriguez M, Montero C, Redondo M, Garci J. C, Mendez L, Serrano E, Valdes M, Enriquez A, Canales M, Boue O, Marchado H, Lleonart R. 1999. Vaccination against ticks (*Boophilus spp.*): the experiment the Bm86-based vaccine Gavac. *Gentet Anal.* 15(3-5):143-8
43. **Brossard**, M. 1976. Immunologic relations between cattle and ticks, special between cattle and *Boophilus microplus*. *Acta. Trop.* 1976; 33(1):15-36
44. **Brossard**, M. 1998. The use of vaccines and genetically resistant animals control. *Rev. Sci. Tech.* 17(1):188-99
45. **Redondo** M, Fragoso H, Ortiz M, Montero C, Lona J, Medel R, Hernandez V, Franco R, Machado H, Rodriguez, M. 1999. Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination of Gavac and amidine treatments. *Exp. Appl. Acarol.* 23(10):841-9
46. **Seddon**, H. R. and Albiston, H. E. 1968. Disease of Domestic Animals in Australia. Part3 : Arthropod Infestations (Ticks and Mites). Department of Health, Commonwealth of Australia.
47. **Quinlan**, J. F., Scarone, C. A., Laneri, J.L. 1980. Cattle tick identification and seasonal variation in infestation rates in Paraguay. *Trop. Anim. Health Prod.* 1980. 12(4):259-64.

Output จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- อยู่ระหว่างจัดเตรียมต้นฉบับ เพื่อส่งตีพิมพ์ คาดว่าจะส่งได้ภายในปี 2546 วารสารต่างประเทศที่จะส่งได้แก่ International Journal of Parasitology หรือ Veterinary Parasitology

2. การนำเสนอผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์ (ยังพัฒนาไปไม่ถึงจุดดังกล่าว)
- เชิงนโยบาย (เกิดมาตรการใหม่ในการควบคุมเห็บ ซึ่งเดิมใช้สารเคมีในการกำจัดเห็บ ผลของการวิจัย ทำให้เกิดแนวความคิดอื่น ๆ หรือ ทางเลือกใหม่สำหรับการควบคุมเห็บในประเทศไทย)
- เชิงสาธารณะ (เมื่อมีข่าวเกี่ยวกับการพัฒนาวัคซีนต่อต้านเห็บในสุนัขและวัวออกไปสู่สาธารณะชน มีการตอบรับอย่างดี มีวิทยุ โทรทัศน์ และหนังสือพิมพ์ออกมาขอข้อมูลเพื่อไปเผยแพร่ และมีประชาชนที่สนใจโทรมาติดต่อขอซื้อวัคซีนจำนวนมาก ซึ่งแสดงถึงความหวังของประชาชนที่อยากจะใช้วิธีการอื่น ๆ หรือ ทางเลือกใหม่ในการควบคุมเห็บ)
- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน ทั้งในระดับปริญญาตรี-โท โดยได้ใช้เป็นหัวข้อใหม่ในการเรียนการสอน เพื่อให้นักเรียนได้เรียนรู้วิทยาการใหม่ ๆ ที่อาจจะนำมาใช้ในอนาคต นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ใช้เป็นหัวข้อวิทยานิพนธ์ของนิสิตปริญญาโท-เอก โดยได้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และคาดว่านิสิตจะจบการศึกษาภายในปี 2546นี้)

3. อื่น ๆ

- บางส่วนของงานวิจัยได้เสนอในงานประชุมวิชาการ ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 ปี 2543 ระหว่างวันที่ 3-5 ก.พ. 2544

ภาคผนวก



การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ครั้งที่ 39

The 39th Kasetsart University Annual Conference

สาขาสัตว์ (Subject : Animals)

สาขาสัตวแพทยศาสตร์ (Subject : Veterinary Medicine)

5-7 กุมภาพันธ์ 2544

5-7 February 2001

จัดโดย

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ร่วมกับ

กระทรวงศึกษาธิการ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

KULINET

BVS



3 0013 00008135 3



การเพาะเลี้ยงเห็บโค (*Boophilus microplus*) ในสัตว์ทดลอง และห้องปฏิบัติการในประเทศไทย

Rearing and maintaining colony of cattle ticks (*Boophilus microplus*) on the experimental animals and in the laboratory in Thailand

กัมภีร์ พัฒนธนัง¹ นงนุช ปิณฑุพานุวัฒน์¹ บุรินทร์ นิมสุพรรณ¹ วิษณุวัฒน์ จิมน้อย¹ อาคม สังข์วารานนท์¹
สุพจน์ อawasกุลสุทธิ² ณัฐภูมิ รัตนนิชโรจน์² จตุรงค์ วงศ์สิน³ นิกอร์ ทองทิพย์³ และสถาพร จิตตपालพงศ์¹
Khampee Pattanatanang¹, Nongnuch Pinyopanuwat¹, Burin Nimsuphan¹, Wissanuwat Chimnoi¹, Arkom
Sangvaranond¹, Supote Awasakulsuddhi², Nattavut Ruttanavanichroj²,
Jaturong Wongsanit³, Nikorn Tongtip³, and Sathaporn Jittapalapong¹

บทคัดย่อ

เห็บโคเป็นพาหะสำคัญในการถ่ายทอดโรคต่างๆ ที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อปศุสัตว์และเศรษฐกิจของประเทศ แนวทางในการป้องกันและควบคุมเห็บชนิดนี้จำเป็นต้องอาศัยงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเห็บจึงมีความต้องการใช้เห็บจำนวนมากในการทดลอง การทดลองเพาะเลี้ยงเห็บโคเพื่องานวิจัย โดยนำเห็บโค *Boophilus microplus* จากภาคต่าง ๆ ในประเทศไทยมาเลี้ยงในตู้แก้วในห้องปฏิบัติการแยกตามภาค อุณหภูมิในตู้ที่เหมาะสมที่ใช้ในช่วง 25-30 °C และความชื้นสัมพัทธ์ที่ 80-90 % เห็บจะเริ่มวางไข่ในเวลา 2-4 วัน ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนใช้เวลาตั้งแต่ 2 สัปดาห์ขึ้นไป ตัวอ่อน หรือ ไข่จะถูกตรวจหาเชื้อที่อาจผ่านโดยวิธี PCR จากนั้นนำไปถ่ายลงบนโคที่ถูกตัดม้าม อายุระหว่าง 20-24 เดือน ตัวอ่อนจะเลี้ยงอยู่ภายในถุงเห็บที่ติดอยู่กับตัวโค ระยะเวลาที่ตัวอ่อนเจริญเติบโตจนเป็นตัวกลางวัยและตัวเต็มวัยและหลุดออกจากสัตว์ใช้เวลาประมาณ 21-25 วัน เห็บตัวเต็มวัยเพศเมียที่กินเลือดอิ่มตัวจากโคจะถูกนำไปเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการเพื่อให้สามารถวางไข่ได้ในอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม ผลจากการเพาะเลี้ยงวิธีนี้จะได้เห็บทุกระยะเป็นจำนวนมาก

ABSTRACT

Boophilus microplus (Canestrini), the tropical cattle tick, is an important ecto-parasite of cattle in Thailand because of their role as a vector of many tick-borne pathogens. Tick control and prevention strategies can be achieved by the development of tick research including new acaricide approaches or tick resistance, tick-resistant cattle, and vaccination against tick. The clean colony of cattle tick is needed. Engorged female ticks were collected from each part of Thailand. These ticks were identified, and kept separately in glass chambers under ambient temperature 20-25 °C and relative humidity around 80-90 %. The oviposition occurred within 2-4 days and thereafter hatching

1 ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok Campus.

2 ภาควิชาสูติศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน

Department of Obstetrics, Theriogenology and Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Khamphangsang Campus.

3 ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน

Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Khamphangsang Campus.

was presented in 2 or more weeks. Eggs or larvae were tested by Polymerase chain reaction (PCR) for transovarial tick-borne diseases. Pathogen-free larvae were maintained in the chamber for weeks before transferred to splenectomized cows. Ticks were protected by tick bags and checked daily until molting and engorging. The life cycle of tick on host is approximate 21-25 days.

INTRODUCTION

B. microplus was first recorded in Thailand (Panita *et al.*, 1983). It cause economic loss to farmers by direct effects on biting, blood loss and by indirect effects as the transmission of tick fever (Seddon and Albiston, 1968; Sutherst *et al.*, 1979). In addition the costs of acaricides and production loss have to be considered. Thus rearing and maintaining colony of *B. microplus* is a major concern of tick involved research, for examples, to test the efficacy of acaricide, to investigate the host resistance to tick (Kemp *et al.*, 1970; Wharton *et al.*, 1976), to test the possibility of tick vaccine (Brossard, 1976; Opdebeeck *et al.*, 1988) or to use vaccines and genetically resistant animals in tick control (Utech *et al.*, 1978; Brossard, M. 1998), vaccines and acaricide integrated control (Redondo *et al.*, 1999). This tick specie is needed and demanded especially for a clean colony. The tick colony should be kept clean from most tick-borne diseases including babesiosis, theileriosis and anaplasmosis. These diseases can be transmitted transovarially and/or transstadially. Rearing and maintaining colony of ticks is necessary to understand on and off host biology of this tick since there are a number of factors influenced feeding, oviposition and engorgement. Such factor includes humidity, temperature (Hitchcock, 1955; Knulle, 1966 and Short *et al.*, 1988), temperature (Hitchcock, 1955; Snowball, 1957; Own, 1975 and Davy, 1988) and suitable hosts have an impact on a tick survival rate. From the works of Hitchcock, 1955; Knulle, 1966 and Short *et al.*, 1988 it is evident that an RH of 70% or higher is required for hatching of eggs and survival of larvae. The survival ratio of this tick in the nature and laboratory are differed (Hitchcock 1955; Snowball 1957; Wilkinson and Wilson, 1959) since tropical cattle ticks are incapable of living outside of hosts for too long. This study was to maintain ticks in both the animals and the laboratory to observe the tick parameters such as feeding, oviposition, and molting period.

MATERIALS AND METHODS

Ticks

Adult male and female cattle ticks were collected from the North, North-East and South of Thailand during June and July 2000. All ticks were dipped in 1-5% Chlorox (Sodium hypochloride 0.1%) for preventing fungal infection. *B. microplus* is identified followed by Harry D. Pratt (Key to genera in United States) and by Krantz, 1978 (Key to families, selected genera, and species of Ixodida, adults). Engorged female ticks were individually separated and kept in clean-plastic tube placed in a glass chamber with cover. Humidity was created by saturated potassium nitrate solution

and keep in the range of 80-90%. Ticks laid eggs, which later hatched for larvae. A part of larvae or egg mass was tested for blood parasites such as babesia spp., anaplasma spp. and theileria spp. by PCR technique. The clean larvae transferred into the splenectomized cows.(Thomson *et al.*, 1992).

Experimental animals

Two crossbred cows, native and Jersey breed, age between 18 and 24 months old, born and raised in the experimental farm of faculty of veterinary medicine, Kasetsart university, Khamphangsang campus, Nakorn Prathom province, were completely examined for blood parasites. In addition indirect fluorescence antibody (IFA) test was confirmed as well. If all tests were negative result, they would be splenectomized and kept in a free tick area. The cows were fed with silage, grass, and clean water. Each cow was represented for each part. The cows were shaped and cleaned for connecting tick bags before larvae were transferred to them. Two or three tick bags were glued on the conjunction between back and shoulder. Two types of tick bags were used in this study. The first one is made of elastic nylon, like sock, and had cylindrical shape with two ends. One end was glued on skin of animal with water soluble glue and the other left it free and clamped with rubber bands. The second one is panty stocking made of silk or linen.

Rearing colony of ticks on experimental animals

1000-2000 larvae were transferred into each bag in the early morning. Every stage of tick was daily observed until fully engorged female tick dropped from the animal. In the experimental area, temperature and relative humidity were routinely noted

Maintaining colony of ticks in the laboratory

The detached female ticks were raised in the clean tick chamber followed as the tick collected from the field. The ticks laid eggs and then hatched to larvae. The second generation of larvae or egg mass derived in the laboratory were detected for possibly tick-borne parasites by PCR. The tick-born free larvae were transferred into the splenectomized cows to reproduce and maintain for the complete cycle and for further study.

RESULTS AND DISCUSSION

Three species of ticks, *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis spp*, and *Rhipicephalus spp.*, were found from the North and North-East of Thailand (Fig. 1). Only *B. microplus* was found in the South. We have seen *B. microplus* every provinces (15) almost part of Thailand from this specimens collection. Pathogen-free larvae fed on the cattle from each part became fed or engorged larvae within 2-4 days and molted to nymphs within 3-5 days. Unfed nymphs might wander around the host for a while before engorging and molting to adults for 4-10 days. Before mating, they fed slowly at first 6-7 days. Then they fed quickly and became fully engorged female and dropped from the host around 4-6 days. Life-cycle on the host was about 21-25 days. The engorged female tick dropped from the host was raised in the chamber at the laboratory. The oviposition occurred within 2-4 days and thereafter hatching presented in 2 or more weeks. Life cycle of tick off host took time at least 16 days. Complete life cycle of ticks was around 5 or 6 weeks (Fig. 2). It is similar to report of Roberts (1952) that the minimum time to complete the life cycle is 5 weeks and under less favorable conditions will extend to several months. The temperature and relative humidity inside the chamber were average 20-25 °C and 80-90% respectively during on the experiment. From other studies the engorged female raised under in the incubator at 23-28 °C and 85-95% RH. The temperature and relative humidity outside the chamber or in the laboratory were average 25-30 °C and 40-60% respectively. The humidity in the laboratory is rather low. The colony of larvae could not persist longer in dry areas with low humidity. (Seddon and Albiston, 1981). The temperature at the stable was 25-30 °C and 60-80% relative humidity. The advantage from this study, we can reproduce and maintain clean colony of tick for tick research development.

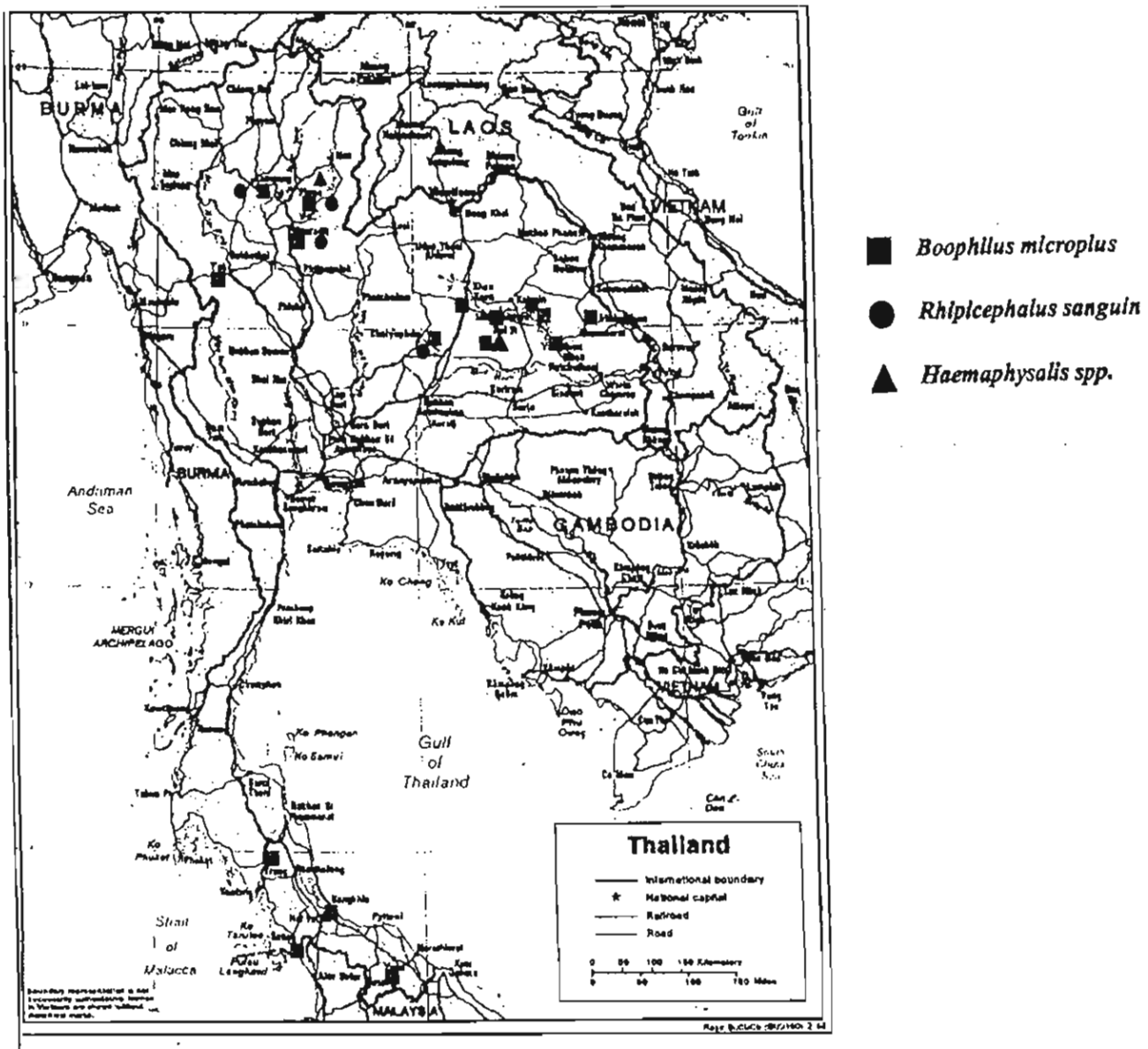


Fig. 1 Three species of cattle ticks in the North, North-East, and South of Thailand.

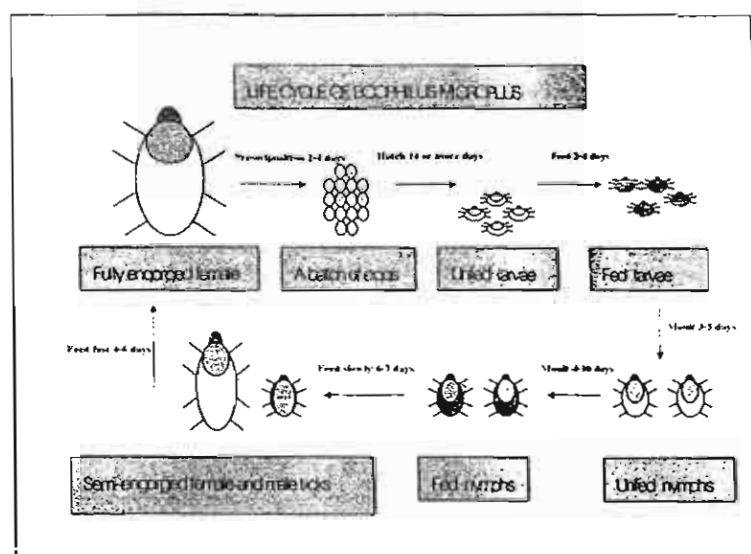


Fig. 2 The life-cycle of *B. microplus* from the experiment.

REFERENCES

- Brossard, M. 1976. Immunologic relations between cattle and ticks, special between cattle and *Boophilus microplus*. *Acta. Trop* 1976; 33(1):15-36
- Brossard, M. 1998. The use of vaccines and genetically resistant animals control. *Rev. Sci. Tech*; 1998 17(1):15-36.
- Davy, R.B. 1988. Effect of temperature on the oviposition biology and egg viability of the cattle tick *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 5:1-14.
- Hitchcock, L.F. 1955. Studies on the non-parasitic stages of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina : Ixodidae). *Aust. J. Zool.* 3:295-311.
- Kemp, D.H., D. Koudstaal, J.A. Roberts and J.D. Kerr. 1976. *Boophilus microplus*: the effect Of host resistance on the attachments and growth. *Parasitology* 1976 Aug; 73(1):123-36.
- Knull, W. 1966. Equilibrium humidities and survival of some tick larvae. *J. Med. Entomol.* 2:335-338
- Opdebeeck, J.P., J.Y. Wong, L.A. Jackson and C. Dobson. 1988. Vaccines to protect Hereford cattle against the cattle *Boophilus microplus*. *Immunology*. 1988 Mar; 63(3):363-7.
- Own, I.L., 1975. Survival of the non-parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus*, under simulated field conditions in Papua New Guinea. *Aust. J. Zool.* 23:219-236.
- Quinlan, J.F., C.A. Scarone, and J.L. Laneri, 1980. Cattle tick identification and seasonal variation in infestation rates in Paraguay. *Trop. Anim. Health Prod.* 1980 Nov; 12(4):259-64.
- Redondo M., H. Frago, M. Ortiz, C. Montero, J. Lona, R. Medel, V. Hernandez, R. Franco,

- H. Machado and M. Rodriguez. 1999. Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination of Gavac and amidine treatments. *Exp. Appl. Acarol.* 1999 Oct; 23(10):841-9.
- Roberts, F.H.S. 1952. Insects Affecting Livestock. Angus and Robertson, Sydney
- Seddon, H.R. and H.E. Albiston. 1968. Disease of Domestic Animals in Australia. Part3 Arthropod Infestations (Ticks and Mites). Department of Health, Commonwealth of Australia.
- Seebeck, R.M., P.H. Springell and J.C. O'Kelly. 1971. Alterations in host metabolism by the specific and anorectic effects of the cattle tick (*Boophilus microplus*):1. Food intake and bodyweight growth. *Aust. J. Bio. Sci.* 24:373-380.
- Short, N.J., R.B. Floyd, R.A.I. Norval and R.W. Sutherst. 1988. Development rates, fecundity and survival of development stages of the ticks *Rhipicephalus appendiculatus*, *Boophilus decoloratus* and *B. microplus* under field conditions. *Zimbabwe J. Exp. Appl. Acarol.* 6:123-141.
- Snowball, G.H. 1957. Ecological observations on the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. Agric. Res.* 8:394-413.
- Sutherst, R.W., G.A. Norton and G.F. Marywald. 1979 *Symposium on Ticks and Tickborne Diseases*, Townsville, May 1979. Edited by M.C. Cooper and L.A.Y. Johnston.
- Sutherst, R.W., G.F. Marywald, J.D. Kerr and D.A. Stegeman. 1983. The effect of cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *B. taurus* steers. *Aust. J. Agric. Res.* 34:317-327.
- Tanskul, P., H.E. Stark, and I. Inkam. 1983. A checklist of ticks of Thailand (Acari: metastigmata: Ixodoidea). *J. Med. Entomol.* 20:330-341.
- Thomson, J.R *et al* .1992. Splenectomy in cattle via transthoracic approach. *Am J Vet Res.* 53(1):143-145.
- Utech, K. B. W., R.H. Wharton and J.D. Kerr. 1978. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. *Aust. J. Agric1978; Res.*29:885-95.
- Wharton, R.H., K.B.W. Utech and H.G. Turner. 1970. Resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus* in a herd of Australian Illawarra shorthorn cattle:its assessment and heritability. *Aust. J. Agric. Res1970; 21:*163-81.
- Wilkinson, P.R. and J.T. Wilson(1959)Survival of cattle ticks in central Queensland pastures. *Aust. J. Agric. Res.* 10:129-43.