

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 ไม่ร้อนเกินไปจนเสียรูปร่างและมีผลให้แถบโปรตีนที่ได้มีลักษณะบิดเบี้ยวไป
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

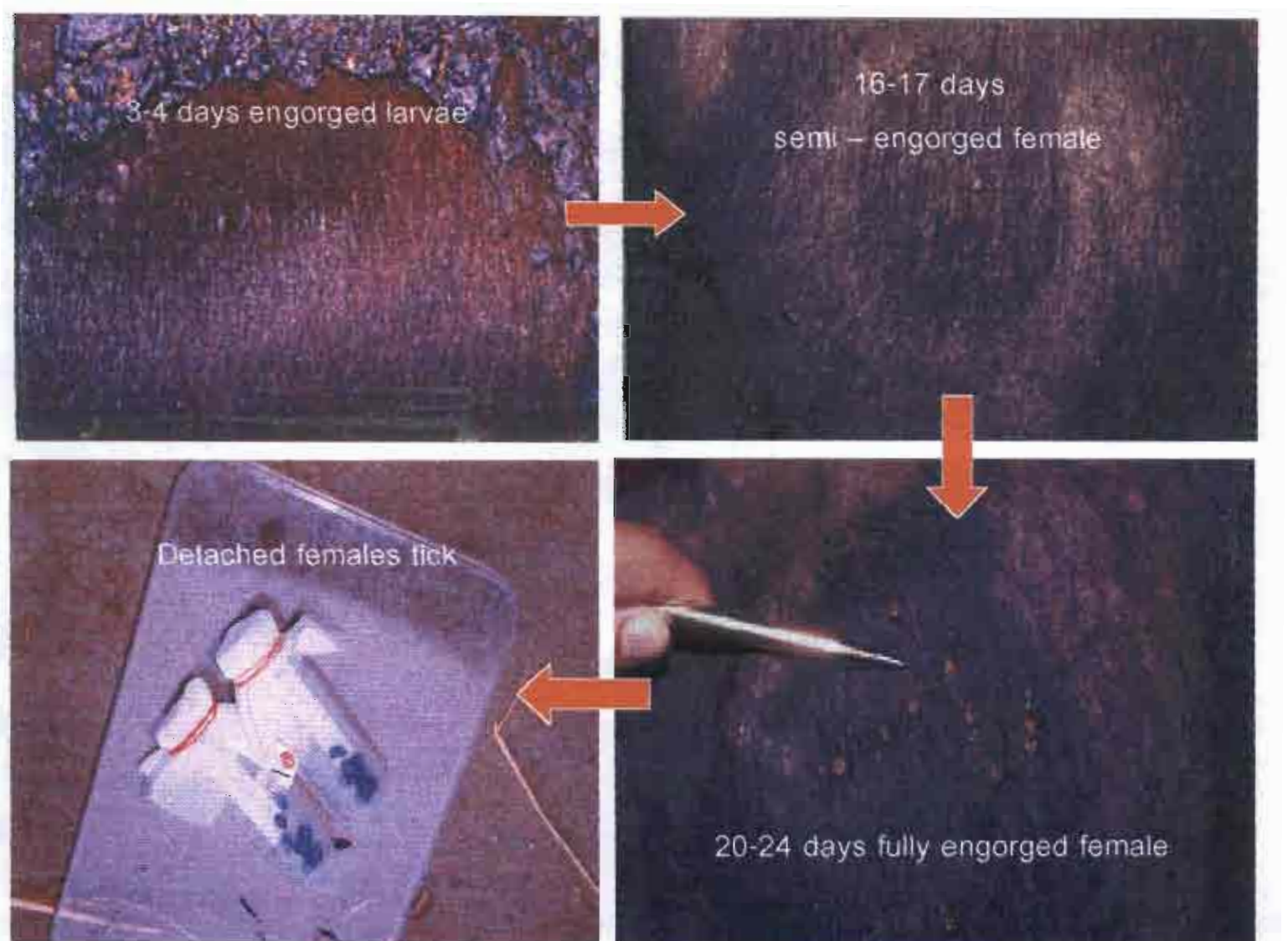
ผลการทดลอง

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

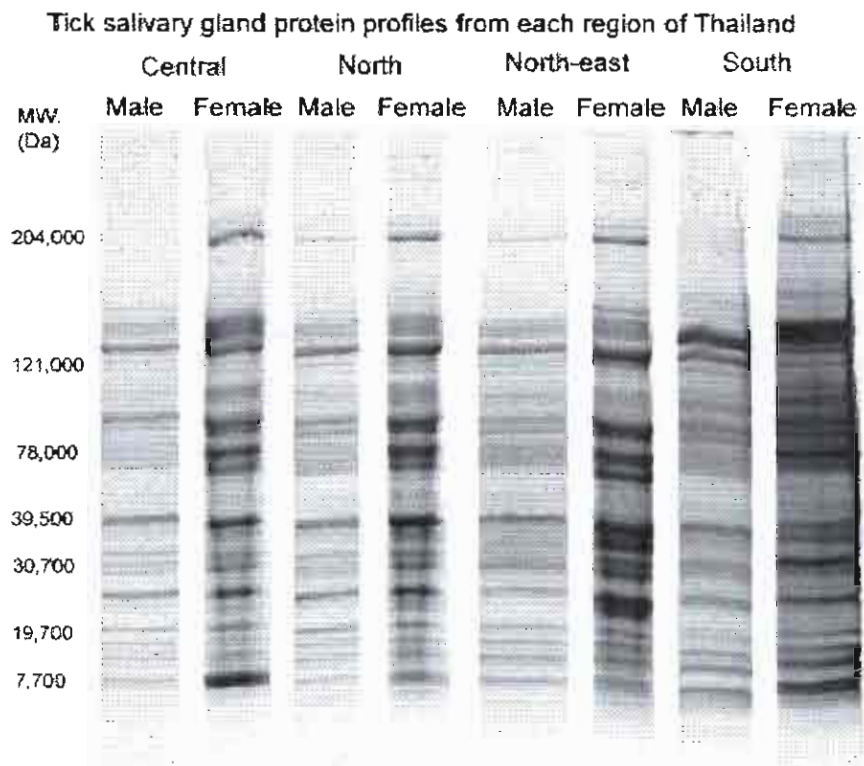
3. ความแตกต่างของโปรตีนจากต่อมน้ำลายที่มาจากเห็บโค (*B. microplus*) จากแต่ละภาคของประเทศไทย (ภาพที่ 7)

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

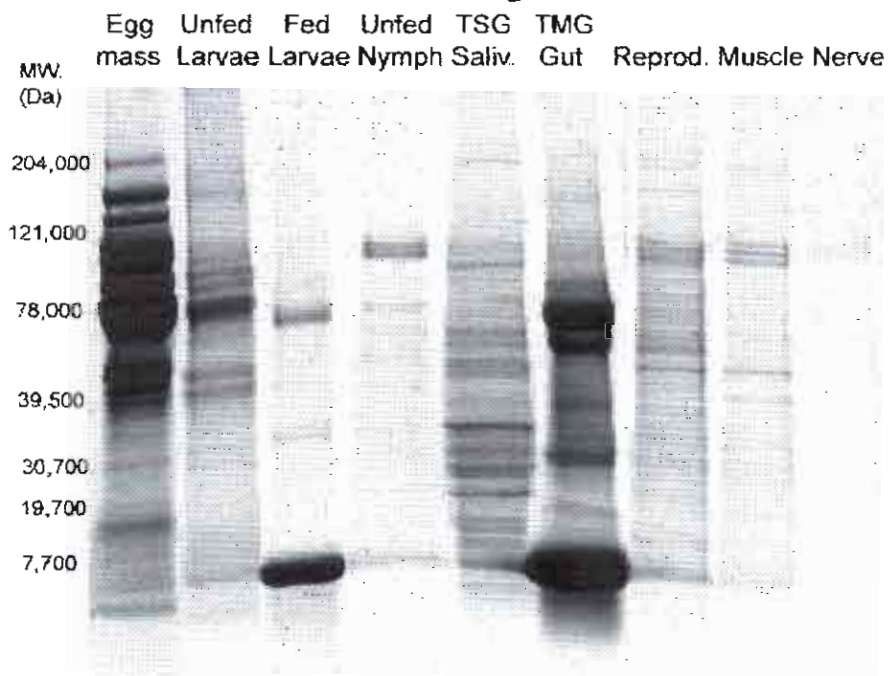
4. ความแตกต่างของโปรตีนที่มาจากเนื้อเยื่อเห็บแต่ละชนิด (ภาพที่ 8)

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

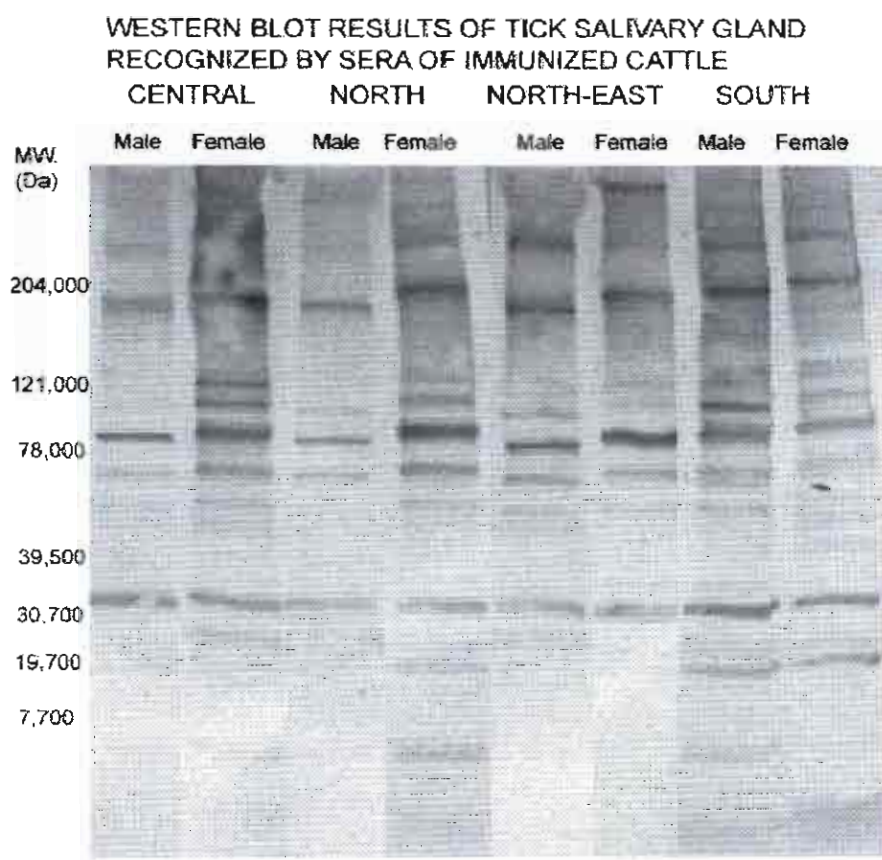
ซ้ายมือ (7,700-204,000 Da) TSG = Tick Salivary Gland

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 กระจุกมากกว่าเห็บชนิดอื่น ๆ เห็บที่พบรองลงมา ได้แก่ เห็บ *Rhipicephalus sanguineus* ซึ่งเป็นเห็บชนิด 3-host tick ที่ส่วนใหญ่จะพบในสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข มากกว่าสัตว์ชนิดอื่น ๆ การติดเห็บชนิดนี้อาจเกิดจากการเลี้ยงสัตว์เลี้ยงอยู่ใกล้กับสัตว์ใหญ่ เช่น โค กระจุก ทำให้มีการแพร่กระจายของเห็บชนิดนี้ ส่วนเห็บชนิดสุดท้ายที่พบในโค ได้แก่ *Haemaphysalis spp.* ซึ่งเป็นเห็บชนิด 2-host tick โดยมักจะพบในเขตภูเขาหรือชายป่ามากกว่าที่จะพบในเขตเมือง เห็บชนิดนี้มักจะพบในโคกระจุกที่นำไปเลี้ยงในเขตชายป่า หรือ ภูเขา หรือที่มีสัตว์ป่าชุกชุม การเลี้ยงสัตว์ในบางพื้นที่ เช่น ในภาคเหนือ และภาคใต้ นิยมเลี้ยงสัตว์แบบปล่อยหากินเป็นอิสระอยู่ตามป่าเขา และทะเลสาบ ทำให้มีโอกาสติดเห็บชนิดนี้ได้ แต่เนื่องจากสัตว์ดังกล่าวไม่สามารถบังคับมาให้อุ้มได้ซึ่งเจ้าของสัตว์จะจับตัวสัตว์ต่อเมื่อจะทำการขาย ทำให้ไม่พบเห็บชนิดนี้จากการเก็บตัวอย่างครั้งนี้จากในภาคใต้ ถึงแม้จะพบว่าเห็บ 3 ชนิด ในโคกระจุก 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 แต่ในความเป็นจริงแล้วระยะที่อยู่บนตัวสัตว์มีเพียงระยะที่เป็นไข่เท่านั้น 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 และหนังสือพิมพ์ออกมาขอข้อมูล เพื่อไปเผยแพร่ 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 ผลจากการเพาะเลี้ยงวิธีนี้ได้เห็บทุกระยะเป็นจำนวนมาก

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.

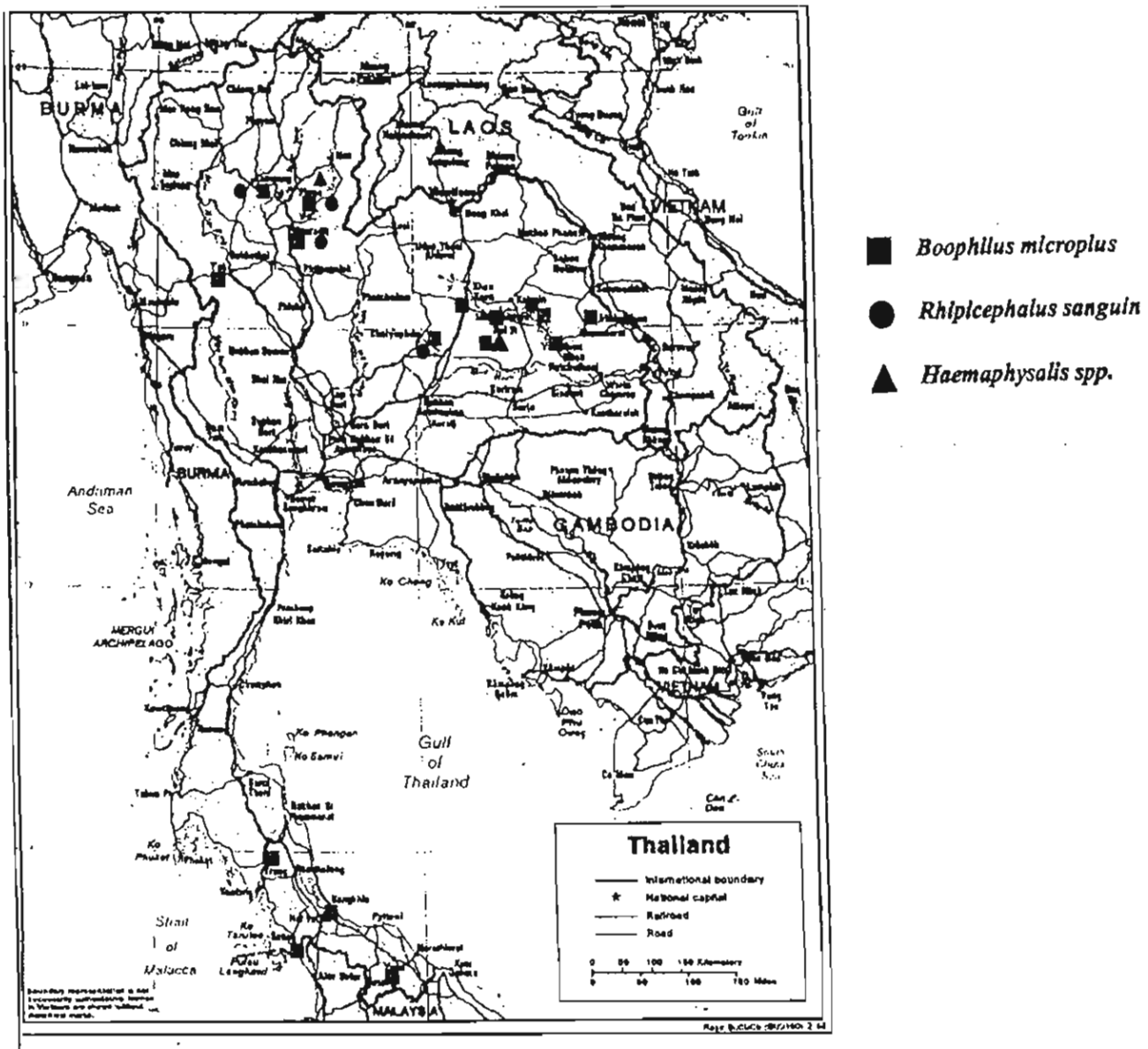


Fig. 1 Three species of cattle ticks in the North, North-East, and South of Thailand.

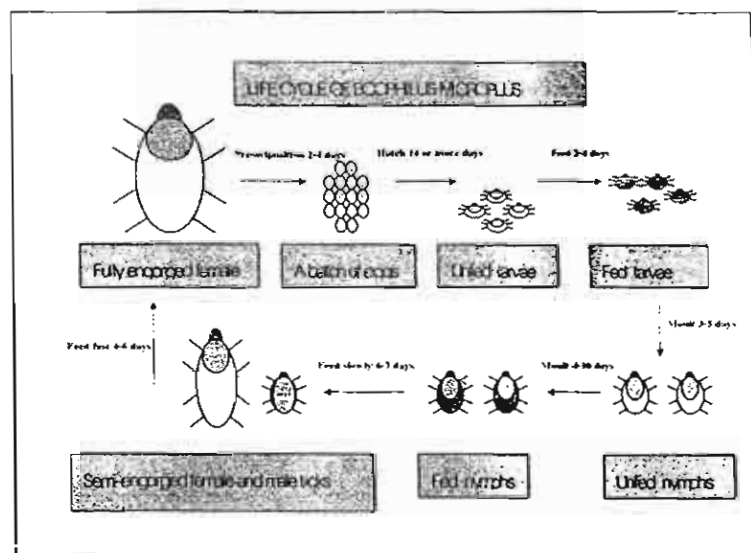


Fig. 2 The life-cycle of *B. microplus* from the experiment.

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.