



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

“การพัฒนาด้านแบบการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรต่อเชื้อบิโดในไก่โดยใช้เซลล์  
เพาะเลี้ยง”

โดย นาย สาธิต พรตระกูลพิพัฒน์ และคณะ

4 กุมภาพันธ์ 2551

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

“การพัฒนาต้นแบบการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรต่อเชื้อบิตในไก่โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง”

#### คณะผู้วิจัย

- นาย สาธร พรตระกูลพัฒน์
- นาย พิทย ภาณุบุตร
- นางสาว ประสาทพร บริสุทธิ์เพชร

#### สังกัด

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น  
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น  
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)  
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## Executive Summary

### จุดประสงค์

1. เพื่อหาวิธีการผลิต oocyst โดยการป้อนไก่ที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น
2. เพื่อปรับวิธีการแยก sporozoites ที่มีชีวิตให้ได้จำนวนมากที่สุดและมีสิ่งปลอมปนน้อยที่สุด
3. เพื่อหาชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการ infection ของ *Eimeria tenella* ในเซลล์เพาะเลี้ยง
4. เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของ DMSO สำหรับใช้แช่แข็ง sporozoites

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

#### การผลิต oocyst

ไก่พันธุ์อาเบอร์เอเคอร์อายุ 1 วัน เลี้ยงด้วยอาหารผสมยากันบิดเพื่อป้องกันการติดเชื้อ และสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อบิดของไก่ เมื่อไก่มีน้ำหนักตัว 500 กรัม จะหยุดให้อาหารผสมยากันบิดนาน 3 วัน จากนั้นป้อน oocyst จำนวน 50,000 oocyst ต่อไก่หนึ่งตัว

#### การแยก sporozoites ที่มีชีวิตให้ได้จำนวนมาก

เก็บ oocyst จากผนังไส้ตัน ทำการย่อยเมือกออกด้วย pepsin และแยก oocysts ออกจากกากอาหาร ด้วย Clorox<sup>®</sup> แช่เย็น นำ oocysts ไปกระตุ้นให้เกิดการ sporulate โดยการแช่ใน 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) potassium dichromate ( $K_2Cr_2O_4$ ) นาน 48 ชั่วโมงแล้วทำให้เปลือกของ sporulated oocysts แตกโดยการกระแทกด้วย glass beads ขนาด 0.5 mm โดยการเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า ในที่นี้จะใช้หน่วย SI (Shaked Interval) ซึ่ง 1 SI หมายถึง การเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 10 ครั้ง ครั้งละ 1 วินาทีและในแต่ละ SI จะพัก 1 นาทีจากนั้นทำการย่อยเปลือกหุ้ม sporocysts ด้วยกรด Taurocholic 1 เปอร์เซ็นต์ (Sigma) ผสมกับ trypsin 0.25 เปอร์เซ็นต์ (Sigma) บ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส sporozoites จะถูกแยกออกจากเปลือกด้วย column separation technique โดยทำการบรรจุ nylon wool และ DEAE-cellulose (Sigma) ในกระบอกฉีดขนาด 3 มล. ใน PBSG buffer pH 8.0

#### การหาชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการ infection ของ *E. tenella*

sporozoites จำนวน 100,000 เซลล์ infect เซลล์ MDBK, BEK, SK-6 และ Vero ซึ่งอยู่บน Tissue Culture Coverslips ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร และมี confluency 70-80 เปอร์เซ็นต์ Tissue Culture Coverslips จะถูกเก็บที่เวลาต่างกัันดังนี้คือ 16, 24, 46, 71, 96, 120 และ 166 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS pH 7.4 หลายๆ ครั้งแล้วนำไป fix ด้วย Bouin solution ย้อมด้วยสี Periodic acid-Schiff (PAS) (Sigma-Aldrich) นับจำนวนเซลล์ที่ถูก infection และตรวจหาระยะการเจริญเติบโตของ *E. tenella* ในเซลล์

### ปริมาณที่เหมาะสมของ DMSO สำหรับใช้แช่แข็ง sporozoites

Sporozoites จำนวน 1,400,000 ในอาหารแช่แข็งซึ่งมีปริมาณ DMSO ต่างกันดังต่อไปนี้ คือ 0, 1, 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ บรรจุในหลอดแช่แข็งขนาด 1.5 มล. ถูกนำไปปรับอุณหภูมิให้เป็น 4°C ในตู้เย็นนาน 30 นาที จากนั้นนำเข้าเครื่องลดอุณหภูมิ (Biocool III) โดยตั้งค่าการลดอุณหภูมิจาก 4°C ไปถึง -70°C โดยมีการลดอุณหภูมิที่ละ 1°C เมื่ออุณหภูมิของหลอดลดถึง -70°C แล้วนำลงแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที การละลายเพื่อนำกลับมาใช้งานนั้นกระทำโดยการนำไปแช่ในน้ำอุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสทันที ทำการนับจำนวน sporozoites และเซลล์ที่ถูก infection ก่อนและหลังการแช่แข็ง

### **ผลการทดลอง**

จำนวนไก่ที่สามารถเก็บ oocysts ได้จะอยู่ที่ประมาณ 80 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับวันที่ไก่ขับเชื้อออกมาสูงสุดนั้นอยู่ในช่วงวันที่ 7 ถึงวันที่ 10 หลังการป้อนเชื้อ การผลิต sporozoites ที่สะอาดและมีจำนวนมากนั้นต้องกระแทกด้วย glass bead ซึ่งจำนวน SI ที่เหมาะสมสำหรับสภาพการทดลองนี้อยู่ระหว่าง SI ที่ 10 ถึง SI ที่ 12 เพราะมีเปอร์เซ็นต์ sporocysts ใกล้เคียง 90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการย่อยเปลือกของ sporocysts ด้วยกรด Taurocholic 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ Trypsin 0.25 เปอร์เซ็นต์ นั้น พบว่าระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 90 ถึง 120 นาที เพราะเป็นช่วงเวลาที่มียเปอร์เซ็นต์ของ sporozoites สูงที่สุด (70 ถึง 74 เปอร์เซ็นต์)

จากผลการทดลองพบการ infection ของ sporozoites ในเซลล์ทั้ง 4 ชนิดคือ BEK, SK-6, Vero และ MDBK อย่างไรก็ตามไม่พบการพัฒนาของ sporozoites ภายหลังจาก infection ในเซลล์ SK-6 อายุ 24 ชั่วโมง และ Vero อายุ 48 ชั่วโมง และจากการนับจำนวน intracellular sporozoites เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดนั้น MDBK มีจำนวน intracellular sporozoites ใน coverslip มากที่สุด สำหรับการพัฒนาของ *E. tenella* ในเซลล์ BEK ซึ่งถูก infection เมื่ออายุ 1 วันนั้นพบระยะต่างๆ หลังการ infection อยู่ 4 ระยะคือ Intracellular sporozoites ที่ 24 ชั่วโมงหลังการ infection Immature schizonts ใน cytoplasm ของเซลล์ BEK ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการ infection Mature schizonts ที่ 72 ชั่วโมงหลังการ infection และ Extra-cellular merozoites ซึ่งพบบริเวณที่มีไกลโคเจน และ คาร์โบไฮเดรต ที่ 92 ชั่วโมงหลังการ infection อย่างไรก็ตามเมื่อติดตามการพัฒนาของ *E. tenella* ต่อไปจนถึง 166 ชั่วโมงหลังการ infection ไม่พบ complete development ของ *E. tenella* ในเซลล์ดังกล่าว

การแช่แข็ง sporozoites โดยใช้ DMSO เป็น cryoprotectant พบว่าสามารถป้องกันการแตกสลายของ sporozoites ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติม cryoprotectant อย่างไรก็ตามเมื่อนำ sporozoites เหล่านี้มาทดสอบการ infection กับ MDBK เซลล์แล้วพบว่า การ infection ลดลงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

### บทคัดย่อ

เพื่อให้การทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรต่อเชื้อบิดในไก่มีประสิทธิภาพ ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและไม่ต้องใช้ไก่เป็นจำนวนมากโดยไม่จำเป็น จึงได้ทำการพัฒนาต้นแบบการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรต่อเชื้อบิดในไก่โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง เริ่มตั้งแต่การผลิต oocyst ให้ได้ปริมาณมากต้องทำการเลี้ยงไก่อายุ 1 วันด้วยอาหารที่ผสมยากันบิดไปจนถึงน้ำหนัก 500 กรัมแล้วหยุดยา 3 วันจึงป้อนเชื้อบิดพบไก่ที่ขับเชื้อบิดถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์และช่วงที่พบการขับเชื้อจะแคบเข้าโดยพบในช่วงวันที่ 7 ถึง 10 หลังได้รับเชื้อ จากนั้นทำการเก็บ oocyst โดยขูดจากผนังไส้ตันย่อยเมือกด้วย pepsin และแยก oocysts ออกจากกากอาหาร ด้วย Clorox<sup>®</sup> เย็น นำ oocysts ไปกระตุ้นให้เกิดการ sporulate โดยการแช่ใน 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) potassium dichromate ( $K_2Cr_2O_4$ ) นาน 48 ชั่วโมงแล้วทำให้เปลือกของ sporulated oocysts แตกโดยการกระแทกด้วย glass beads ขนาด 0.5 mm 10 ถึง 12 SI จะได้ sporocysts ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการย่อยเปลือกหุ้ม sporocysts ด้วย Taurocholic 1 เปอร์เซ็นต์ (Sigma) ผสมกับ trypsin 0.25 เปอร์เซ็นต์ (Sigma) บ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสพบว่าระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 90 ถึง 120 นาที เพราะเป็นช่วงเวลาที่สปอร์ซัวต์ของ sporozoites สูงที่สุด จากนั้นแยก sporozoites ออกจากเปลือก ด้วย column separation technique โดยทำการบรรจุ nylon wool และ DEAE-cellulose (Sigma) ในกระบอกฉีดขนาด 3 มล. ใน PBSG buffer pH 8.0 จะได้ sporozoites ซึ่งไม่มีเปลือก oocysts และ sporocysts เจือปน รวมทั้งมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียน้อยลงสามารถนำมาเติมในเซลล์เพาะเลี้ยงได้

จากผลการ infection เซลล์เพาะเลี้ยงด้วย sporozoites พบว่า sporozoites infection เซลล์ MDBK ได้ดีที่สุด เหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นต้นแบบการทดสอบ

สำหรับการแช่แข็ง sporozoites โดยใช้ DMSO เป็น cryoprotectant พบว่าสามารถป้องกันการแตกสลายของ sporozoites ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติม cryoprotectant อย่างไรก็ตามเมื่อนำ sporozoites เหล่านี้มาทดสอบการ infection กับ MDBK เซลล์แล้วพบว่า การ infection ลดลงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นวิธีการแช่แข็งดังกล่าวจึงไม่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษา sporozoites เพื่อใช้ในการ infection เซลล์

สัญญาเลขที่ RDG4920060

## โครงการ

“การพัฒนาต้นแบบการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรต่อเชื้อบิดในไก่โดยใช้เซลล์  
เพาะเลี้ยง”

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### ส่วนที่ 1 ข้อมูลโครงการ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน: สาทร พรตระกูลพิพัฒน์

โครงการเริ่มวันที่ 15 กันยายน พ.ศ. 2549 รวมเวลาที่ทำวิจัยทั้งสิ้น 18 เดือน

รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 1

ในช่วงตั้งแต่วันที่ 15 กันยายน พ.ศ. 2549 ถึงวันที่ 15 มีนาคม พ.ศ. 2550

รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 2

ในช่วงตั้งแต่วันที่ 15 มีนาคม พ.ศ. 2550 ถึงวันที่ 15 กันยายน พ.ศ. 2550

รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 3

ในช่วงตั้งแต่วันที่ 15 กันยายน พ.ศ. 2550 ถึงวันที่ 15 กันยายน พ.ศ. 2551

### ส่วนที่ 2 รายงานกระบวนการทำวิจัย

1. ในรอบ 18 เดือนที่ผ่านมาท่านได้

☐ ติดต่อ สกว. หรือ สปว. 24 ครั้ง

☐ ประชุมที่มวิจัย 21 ครั้ง เป็นเรื่อง

a. ทบทวนและ วางแผนงาน 8 ครั้ง

b. หาหรือปัญหาการทำวิจัย 12 ครั้ง

c. วิเคราะห์ผล 8 ครั้ง

2. ในรอบ 6 เดือนที่ผ่านมาท่านได้ติดตามงานวิจัยโดย

☐ บันทึกการทำวิจัย จำนวน 134 หน้า

☐ อ่าน paper ที่เกี่ยวข้อง 70 ชิ้น

☐ ค้นหาข้อมูลทาง internet 20 ครั้ง

### ส่วนที่ 3 รายงานเนื้อหา

ตามเอกสารที่แนบ

ลงนาม.....

(หัวหน้าโครงการ)

วันที่ 4 กุมภาพันธ์ 2552

## สัญญาเลขที่ RDG 5020002

### โครงการ การพัฒนาดันแบบการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรต่อเชื้อบิดในไก่โดยใช้เซลล์ เพาะเลี้ยง

#### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อหาวิธีการผลิต oocyst โดยการป้อนไก่ที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น
2. เพื่อปรับวิธีการแยก sporozoites ที่มีชีวิตให้ได้จำนวนมากที่สุดและมีสิ่งปลอมปนน้อยที่สุด
3. เพื่อหาชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการพัฒนาของ *Eimeria tenella* ในเซลล์เพาะเลี้ยง
4. เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของ DMSO สำหรับใช้แช่แข็ง sporozoites

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการตามแผนงานโดยสรุป (พอสังเขป)

การพัฒนาแกรนูลจากน้ำมันหอมระเหยกระเพราเพื่อใช้เป็นสารเสริมอาหารในสัตว์

ระยะเวลา 26 ตุลาคม 2549 ถึงวันที่ 18 พฤศจิกายน 2551

| กิจกรรม (activities)                                                                       | ผลงานที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)                                                                             | ผลการดำเนินงาน                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. เพื่อหาวิธีการผลิต oocyst โดยการป้อนไก่ที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น                      | 1. ได้วิธีการเลี้ยงไก่ที่ทำให้ไก่ขับ oocyst ออกมาเป็นจำนวนมากและขับเชื้อออกมาพร้อมกัน                       | 1. เลี้ยงไก่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยากันบิดตั้งแต่เกิดเพื่อไม่ให้ไก่สร้างภูมิต้านทานต่อเชื้อบิดจนน้ำหนัก 500 กรัมจึงป้อนเชื้อบิดจะทำให้ไก่ 80-90 เปอร์เซนต์ขับเชื้อบิดออกมาในช่วงวันที่ 7 ถึงวันที่ 10 หลังได้รับเชื้อ                                                                                                                                                  |
| 2. เพื่อปรับวิธีการแยก sporozoites ที่มีชีวิตให้ได้จำนวนมากที่สุดและมีสิ่งปลอมปนน้อยที่สุด | 2. ได้ sporozoites ที่ปราศจากสิ่งปลอมปน เช่น เปลือก oocyst และ sporocysts และการอาหาร รวมทั้งเชื้อแบคทีเรีย | 2. ทำการทุบเปลือก oocyst ด้วย glass bead ขนาด 0.5 mm ที่ 10 ถึง 12 SI จะได้ sporocysts ประมาณ 90 เปอร์เซนต์และย่อยเปลือก sporocysts ออกด้วยการใช้กรด Taurocholic 1 เปอร์เซนต์ ผสมกับ trypsin 0.25 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส นาน 90 ถึง 120 นาที จะได้เปอร์เซนต์ของ sporozoites สูงที่สุด จากนั้นแยกสิ่งปลอมปนออกด้วยวิธี column separation technique จะได้ |

|                                                                                                        |                                                                           |                                                                                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                        |                                                                           | sporozoites ที่สะอาดเหมาะที่จะนำไปใช้ในการ infection เซลล์เพาะเลี้ยง                                                                                                                                           |
| 3.เพื่อหาชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการพัฒนาของ <i>Eimeria tenella</i> ในเซลล์เพาะเลี้ยง | 3.ทราบชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการ infection ของ sporozoites | 3.เซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการ infection ของ sporozoites ได้แก่ เซลล์ MDBK เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การ infection สูงที่สุดในบรรดาเซลล์ที่ใช้ทดสอบในครั้งนี้ 4 ชนิดได้แก่เซลล์ MDBK, Vero, SK-6 และ BEK     |
| 4.เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของ DMSO สำหรับใช้แช่แข็ง sporozoites                                         | 4.ได้ปริมาณที่เหมาะสมของ DMSO สำหรับใช้ในการแช่แข็ง sporozoites           | 4.วิธีการแช่แข็งโดยการใช้ DMSO 0,1,3,5 และ 10 เปอร์เซ็นต์เป็น cryoprotectant นั้นพบว่าช่วยในการรักษาไม่ให้เซลล์แตกภายหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งและการละลาย แต่ไม่สามารถทำให้เซลล์คงความสามารถในการ infection ได้ |

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆ ต่อ สกว.

หัวหน้าโครงการ

วันที่ 4 กุมภาพันธ์ 2552

## โครงการ

การพัฒนาต้นแบบการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรต่อเชื้อบิดในไก่โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

---

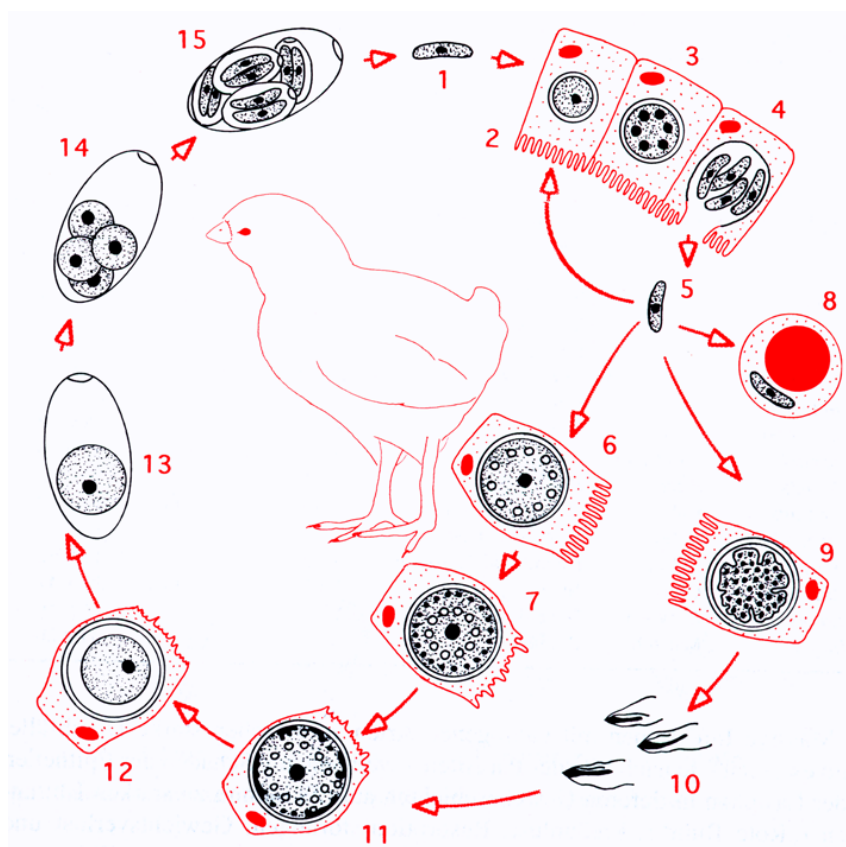
### บทนำ

โรคบิด เป็นโรคระบบทางเดินอาหารที่สำคัญในสัตว์โดยสัตว์จะแสดงอาการท้องเสียถ่ายเป็นมูกเลือดจากการอักเสบของลำไส้ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อโปรโตซัวในกลุ่ม coccidia และพบได้ในสัตว์เกือบทุกชนิด สำหรับในไก่เชื้อ coccidia ที่เป็นสาเหตุจะอยู่ในกลุ่ม *Eimeria spp.* เชื้อนี้เป็น โปรโตซัวที่อาศัยภายในเซลล์ลำไส้ในส่วน caecum ของไก่ เชื้อโปรโตซัวจะทำลายผนังลำไส้ ทำให้ลำไส้อักเสบ พบโรคนี้ได้บ่อยเมื่ออุณหภูมิและความชื้นในโรงเรือนสูง หรือวัสดุรองพื้นเปียกชื้นเสมอๆ ไก่ที่ติดเชื้อชนิดรุนแรงจะท้องเสีย เป็นเมือก หรือเป็นเลือด ไก่จะหงอยซึม กินอาหารน้อย หนาวสั่น ยืนหรือนอนสุมกัน โลหิตจาง ผิวง่ายช้ำ และตาย ส่วนไก่ที่เป็นโรคเรื้อรังจะไม่ค่อยกินอาหาร ผอมซีด โลหิตจาง น้ำหนักลดลงอย่างมาก ขนยุ่ง ไข่ลด

กลไกการเกิดโรคในไก่เกิดจากการที่ไก่ขับ Unsporulated oocysts ออกมากับมูล และใช้เวลา 1 ถึง 2 วันในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก็จะเปลี่ยนเป็น Sporulated oocysts เมื่อเข้าสู่ลำไส้ไก่ Oocysts จะสัมผัสกับน้ำย่อยและการบีบตัวของลำไส้ทำให้ Oocysts แตกออก Sporocysts จะออกมาและเมื่อผนังของ Sporocysts สัมผัสกับกรดและน้ำย่อยจะทำให้ผนัง Sporocysts แตกออกและปล่อย Sporozoites ออกมาซึ่งจะเข้าสู่เซลล์ลำไส้ในที่สุด จากนั้น Sporozoites จะเข้าสู่ระยะการเจริญแบบไม่มีเพศ ซึ่งจะเริ่มจากระยะ Trophozoite, Schizont และ Merozoite ในที่สุดซึ่งเซลล์ลำไส้ที่มี Merozoite อยู่จะแตกออกปล่อย free merozoite ออกมา และ free merozoite จะเข้าสู่เซลล์ลำไส้ใหม่อีกครั้งเริ่มระยะการเจริญแบบแบ่งเพศ ซึ่งจะได้เป็น microgamont และ macrogamont อยู่ภายในเซลล์ลำไส้ จากนั้น free microgametocyte จะผสมกับ macrogametocyte ได้เป็น zygote และแตกออกมาจากเซลล์ลำไส้ เข้าสู่ทางเดินอาหารเป็น Unsporulated oocysts ต่อไป (รูปที่ 1)

ปัจจุบันมีพบว่าการใช้ยาเพื่อฆ่า Oocysts ไม่ได้ผลดีเนื่องจาก Oocysts ก่อนข้ามทนทาน มีเพียงสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเช่น ammonia และ methyl bromide เท่านั้นที่ใช้ได้ผลดี อย่างไรก็ตาม สารดังกล่าวเป็นแก๊สที่มีพิษซึ่งไม่เหมาะในการใช้ ส่วนการใช้เพื่อรักษาและป้องกันเชื้อในทางเดินอาหารนั้นมีการใช้ยาจำพวก แอมโปรเลียม ซัลฟาควิน็อกซาลิน ซาลิโนมายซิน มาดูรามัยซิน และ โทลทราซูริล ในการรักษาโรค หรืออาจจะผสมยาในน้ำหรืออาหารเพื่อป้องกันโรค ซึ่งก่อให้เกิดผลเสียในอุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ ที่สำคัญคือ เพิ่มต้นทุน และ มียาตกค้างในเนื้อไก่ เป็นอุปสรรคต่อการส่งออกเนื้อไก่ และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคเนื้อไก่อีกด้วย ในส่วนของสมุนไพรที่มีการนำมาทดลองใช้เพื่อป้องกันโรคบิดในไก่หลายชนิด เช่น Du and Hu 2004 ทดลองใช้สมุนไพรผสมกันหลายชนิดได้แก่ *Uncariae Ramulus cum Uncis*, *Agrimoniae Herba*, *Sanguisorbae Radix*, *Eclipta Prostrate Herba*, *Pulsatillae*

*Radix, Sophorae Flavescentis Radix, Rehmanniae Radix and Glycyrrhizae Radix* พบว่าสมุนไพรสามารถช่วยป้องกันการป่วยจาก *Eimeria tenella* ได้ระดับหนึ่ง หรือ Youn and Noh 2001 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรถึง 15 ชนิดและพบว่ามียุทธในการรักษาโรคในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบดังกล่าวต้องใช้ไก่ในการทดสอบซึ่งมีข้อดีคือ เป็นการทดสอบผลได้โดยตรง แต่ต้องมีการเลี้ยงไก่ ป้อนเชื้อ และฆ่าไก่เพื่อตรวจดูรอยโรค นอกจากนี้ยังใช้เวลานานในการทดสอบอีกด้วย



รูปที่ 1 วงจรชีวิตของ *Eimeria tenella* หมายเลขแต่ละตัวมีความหมายดังต่อไปนี้คือ 1. Sporozoite, 2. Trophozoite ในอีพิทีเลียมเซลล์ของลำไส้, 3. Schizont, 4. Merozoite, 5. Free Merozoite, 6. Macrogamete, 7. Macrogamete, 8. Merozoite ใน Lymphocyte, 9. Microgamete, 10. Microgamete, 11. Zygote, 12. Intracellular Sporont, 13. Unsporulated oocyst, 14. oocyst บรรจุ Sporoblast, 15. oocyst บรรจุ Sporozoite  
ดัดแปลงจาก: Klotz, C. (2005)

สำหรับแนวคิดการทดสอบฤทธิ์ของยาต้านปรสิตในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นนับมาตั้งแต่ปี 1965 โดย Patton ได้แสดงให้เห็นว่าสามารถเลี้ยง *Eimeria tenella* ใน Madin-Darby kidney (MDBK) cells ซึ่งสามารถพบเชื้อในระยะที่ไม่อาศัยเพศในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ทำให้ในเวลาต่อมา Strout and Quellet 1973 ได้ใช้การเพาะเลี้ยง *Eimeria tenella* ในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อ screen หาฤทธิ์ของสารเคมีที่ใช้ทำลายเชื้อ *Eimeria tenella* โดยการตรวจหาเชื้อในเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์

อย่างไรก็ตาม เชื้อ *Eimeria tenella* เจริญได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยงต่างชนิดกัน และอุณหภูมิที่เหมาะสมก็จะแตกต่างกันไป ซึ่ง Tierney and Mulcahy, 2003 สรุปว่า เซลล์ Baby Hamster Kidney (BHK) และ MDBK เป็นเซลล์ที่เหมาะสมในการ infection ของ sporozoites ที่สุกโดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสภายใต้ความเข้มข้นของ CO<sub>2</sub> 5 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะหากต้องการให้ *E. tenella* พัฒนาต่อไปเป็น merozoites หรือ ระยะ Sexual stage ไปจนถึงการสร้าง Oocysts อย่างไรก็ตาม การที่จะ infection และ พัฒนาให้สามารถเลี้ยง *E. tenella* ให้ได้ตามที่ปรากฏในเอกสารที่กล่าวอ้างนั้นเป็นงานที่ค่อนข้างต้องใช้เวลาเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในสิ่งแวดล้อมของเรา เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่แตกต่างกัน ดังนั้น กลุ่มผู้วิจัยจึงเสนอ การพัฒนา Model จากเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อทดแทนการทดสอบโดยใช้ไก่มีชีวิต ซึ่งมีข้อดีคือไม่ต้องเลี้ยงไก่ ได้ผลการทดสอบที่รวดเร็วกว่า ทำให้สามารถทดสอบกับสารสกัดจากสมุนไพรได้หลายชนิดในระยะเวลาที่สั้นกว่า จากนั้นเมื่อได้ผลแล้วจึงขยายผลไปทดสอบในไก่ต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาวิธีการผลิต oocyst โดยการป้อนไก่ที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น
2. เพื่อปรับวิธีการแยก sporozoites ที่มีชีวิตให้ได้จำนวนมากที่สุดและมีสิ่งปลอมปนน้อยที่สุด
3. เพื่อหาชนิดเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการ infection ของ *Eimeria tenella* ในเซลล์เพาะเลี้ยง
4. เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของ DMSO สำหรับใช้แช่แข็ง sporozoites

## วิธีการทดลอง

### เชื้อ *Eimeria tenella* เซลล์เพาะเลี้ยง และ ไก่

เชื้อ *Eimeria tenella* ได้จากความอนุเคราะห์ของ รศ.ดร. สมบูรณ์ แสงมณีเดช ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เซลล์ BEK, SK-6 และ Vero ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน จ.ขอนแก่น

เซลล์ MDBK ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Roland Riebe จาก Friedrich-Loeffler-Institut ประเทศเยอรมนี

### อาหารเลี้ยงเซลล์

อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง MDBK ในขวดเลี้ยงเซลล์คือ Minimum essential medium (MEM) in Hank's salt: MEM in Earle's salt อัตราส่วน 1:1 (pH 7.4) ซึ่งเติมสารต่อไปนี้คือ fetal bovine serum 5 เปอร์เซ็นต์, sodium pyruvate 10 mM และ GlutaMax 10 mM ส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง MDBK ใน tissue culture plate ขนาด 24 หลุม นั้นใช้ DMEM ซึ่งเติมสารต่อไปนี้คือ fetal bovine serum 5 เปอร์เซ็นต์, sodium pyruvate 10 mM และ GlutaMax 10 mM

อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงอื่น ๆ ในขวดเลี้ยงเซลล์และ tissue culture plate ในการทดลองนี้ใช้ Minimum essential medium (MEM) in Earle's salt (pH 7.4) ซึ่งเติมสารต่อไปนี้คือ fetal bovine serum 5 เปอร์เซ็นต์, sodium pyruvate 10 mM และ GlutaMax 10 mM ส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง

สำหรับวันที่เติม sporozoites ให้แก่เซลล์จะเติมยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อราความเข้มข้น 5 เท่าซึ่งได้แก่ penicillin-G 500 ยูนิต/มล., streptomycin 500 ไมโครกรัม/มล. และ Amphotericin B 12.5 ไมโครกรัม/มล. ทั้งนี้จะลดความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อราลงเป็น 1 เท่าคือ penicillin-G 100 ยูนิต/มล., streptomycin 100 ไมโครกรัม/มล. และ Amphotericin B 2.5 ไมโครกรัม/มล. ภายใน 24 ชั่วโมง

อาหารสำหรับแช่แข็ง sporozoites ได้แก่ Minimum essential medium (MEM) in Earle's salt (pH 7.4) ซึ่งเติมสารต่อไปนี้คือ fetal bovine serum 25 เปอร์เซ็นต์, sodium pyruvate 10 mM และ GlutaMax 10 mM, penicillin-G 500 ยูนิต/มล., streptomycin 500 ไมโครกรัม/มล. และ Amphotericin B 12.5 ไมโครกรัม/มล. ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์ DMSO จะแตกต่างกันไปตั้งแต่ 0, 1, 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์

### การเลี้ยงไก่

ไก่เนื้อพันธุ์อาเบอร์เอเคอร์ (บริษัทเบทาโกร ขอนแก่น) อายุ 1 วันทำการเลี้ยงไก่ในโรงเรือนสัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยทำการเลี้ยงไก่ครั้งละ 10-20 ตัว (แล้วแต่กิจกรรมที่ต้องการใช้ oocysts หรือ sporozoites ว่ามากน้อยเพียงใด) จนมีน้ำหนัก 500 กรัมจึงเริ่มเข้าสู่การทดลอง ให้กินอาหารและน้ำดื่มที่

### อาหารไก่

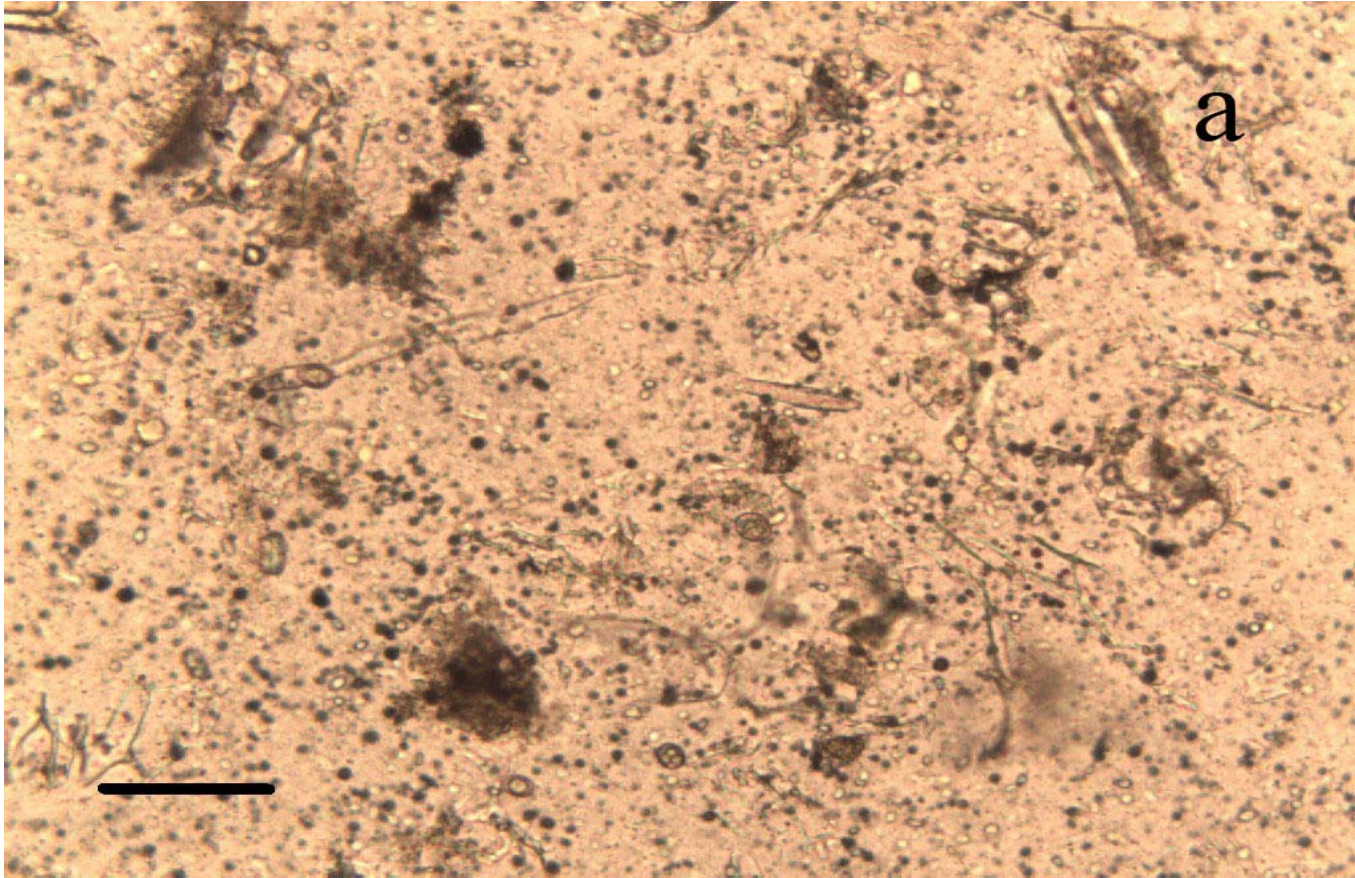
อาหารไก่ที่ใช้มีสองสูตรคือ สูตรที่ผสมยากันบิต และ ไม่ผสมยากันบิต อาหารสูตรผสมยากันบิตซื้อจากอาหารไก่ที่มีขายตามท้องตลาดให้ไก่กินตั้งแต่วันเข้าคอกสัตว์ทดลอง (ไก่อายุ 1 วัน) โดยให้กินอาหารสูตรนี้ต่อเนื่องไปจนไก่มีน้ำหนัก 500 กรัม จากนั้น 3 วันก่อนป้อนเชื้อให้ไก่ เปลี่ยนอาหารเป็นสูตรที่ไม่ผสมยากันบิตไปจนจบการทดลอง

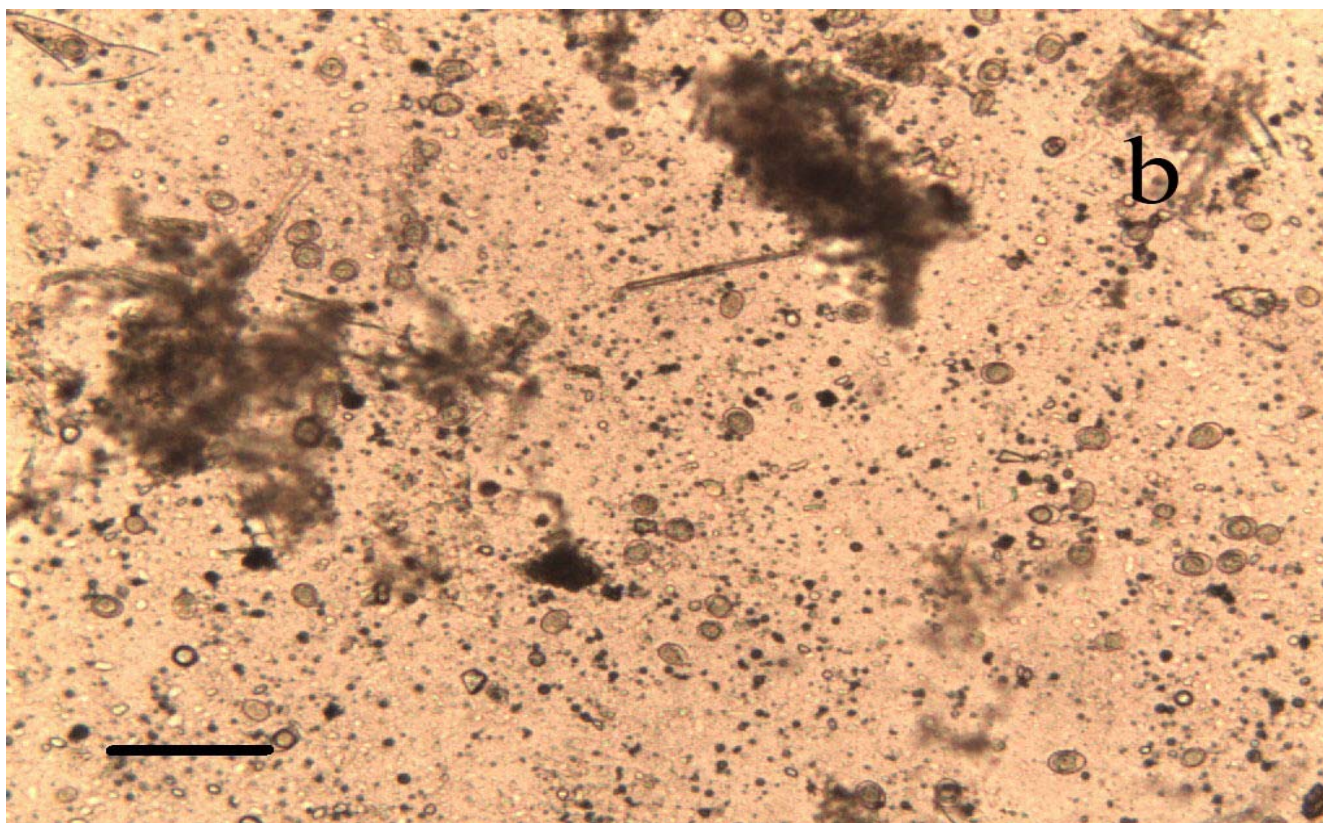
### การป้อนเชื้อ *Eimeria tenella*

เชื้อ *Eimeria tenella* (sporulated oocysts) จำนวน 50,000 oocysts ต่อไก่ 1 ตัว จะถูกป้อนให้แก่ไก่น้ำหนักประมาณ 500 กรัม หลังจากเปลี่ยนอาหารจากอาหารที่ผสมยากันบิตเป็นอาหารที่ไม่ผสมยากันบิตมาแล้ว 3 วันเพื่อให้แน่ใจว่าไก่ไม่มีการสะสมยากันบิตอยู่ในทางเดินอาหาร โดยทำการป้อนเพียง 1 ครั้งเท่านั้น

### การเก็บตัวอย่าง oocysts

เมื่อไก่ได้รับเชื้อ *Eimeria tenella* จะทำการสังเกตอาการป่วย และเริ่มทำการตรวจมูลไก่หลังจากป้อนเชื้อไป 6 วันโดยต้องทำการตรวจทุกวัน ด้วยวิธี simple direct smear ดังนี้ ป้ายมูลไก่ปริมาณเล็กน้อยลงบนแผ่น slide ที่มีหยดน้ำปริมาตร 20 ไมโครลิตร คนให้เข้ากันแล้วปิดด้วย cover slide ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100X เลือกไก่ที่ขับ oocysts ออกมาเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 2b) ซึ่งต้องมีใกล้เคียง 100 oocysts ต่อ field ของ objective lens 10x จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างไส้ตันจากไก่ โดยการขูดผนังไส้ตันออกมาและทำการย่อยเมือกออกด้วย pepsin (2 มก./มล.) ที่ pH ต่ำกว่า 4 อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง





รูปที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณ oocysts ในมูลไก่ที่ทำการตรวจด้วยวิธี simple direct smear ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า จากมูลไก่ในวันที่ 7 หลัง ป้อนเชื้อ a:) พบ unsporulated oocysts ปริมาณน้อย แสดงว่าไก่ตัวนี้ไม่เหมาะสำหรับการเก็บตัวอย่างจากไส้ตัน b:) พบ unsporulated oocysts ปริมาณมาก ไกล่เพียง 100 oocysts ต่อ 1 field ของกำลังขยาย 100 เท่า ซึ่งเหมาะสำหรับการเก็บตัวอย่างจากไส้ตัน ขนาดของบาร์เท่ากับ 10 ไมครอน

### การทำให้เกิด sporulation

oocysts จะถูกนำไปแช่ใน 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) potassium dichromate ( $K_2Cr_2O_4$ ) อัตราส่วน  $2.5 \times 10^5$  oocysts ต่อ มล.ของ  $K_2Cr_2O_4$  ใน conical flask แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 130 rpm ที่อุณหภูมิห้อง นาน 72 ชั่วโมง ทำการสังเกตความสมบูรณ์ของการเกิด sporulation ทุกวัน

### การแยก oocysts ออกจากกากอาหาร

oocysts ถูกแยกออกจากกากอาหาร ด้วยการเติม sodium hypochlorite 6 เปอร์เซ็นต์ (Clorox<sup>®</sup>) แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส อัตราส่วน 1:1 โดยทำการ เขย่า ทุก 5 นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายตะกอนจาก feces และฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาบางส่วน จากนั้นล้าง Clorox<sup>®</sup> ออกให้สะอาดโดยการปั่นล้างด้วยน้ำหลายๆ ครั้งจนกว่าจะหมดกลิ่น Clorox<sup>®</sup>

### การ exystation และ การแยก sporozoites

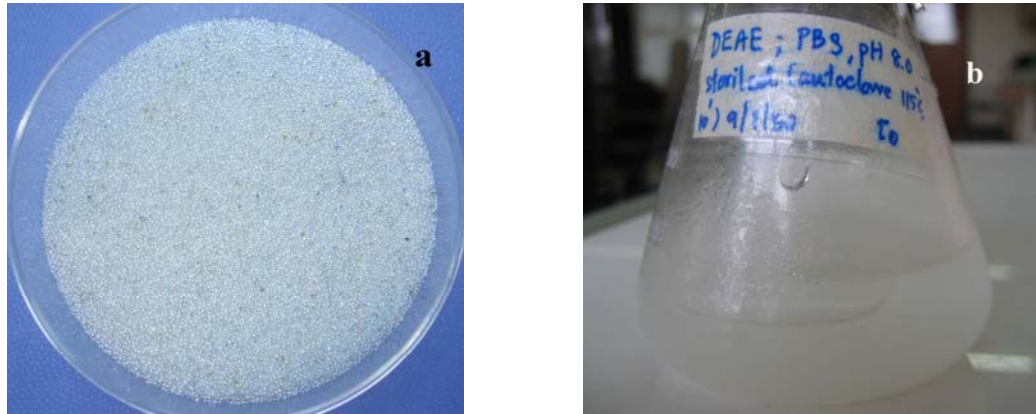
ทำการ excystation เพื่อให้ได้ sporozoites ที่มีการปนเปื้อนน้อยที่สุด ใช้หลักการ 3 ข้อ ใหญ่ๆ คือ

1. การทำให้เปลือกของ oocysts แตกด้วยการกระแทกด้วย glass beads เติม glass beads ขนาด 0.5 มม. (รูปที่ 3a) ปริมาตร 0.75 มล. ในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 15 มล. ซึ่งมี sporulated oocysts ประมาณ 10 ล้านในปริมาตร 2 มล. โดยการเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า (Vortex-2 Genie, Scientific industries, Inc) ในที่นี้จะใช้หน่วย SI (Shaked Interval) ซึ่ง 1 SI หมายถึง การเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 10 ครั้ง ครั้งละ 1 วินาทีและในแต่ละ SI จะพัก 1 นาที โดยจะทำการดูดตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยมาเพื่อตรวจหา sporozoites เป็นช่วงๆ โดยหากพบ sporozoites ก็ให้หยุดการสั่น เพื่อป้องกัน sporozoites ถูกทำลายด้วย glass beads ในขั้นตอนนี้จะพบ sporocysts เป็นจำนวนมาก

2. การย่อยเปลือกหุ้ม sporocysts ด้วยกรด Taurocholic 1 เปอร์เซ็นต์ (Sigma) ผสมกับ Trypsin 0.25 เปอร์เซ็นต์ (Sigma) บ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ในทุก 15 นาที จะทำการตรวจหาจำนวนของ sporozoites

3. การแยก sporozoites ออกจากเปลือกที่ได้จากข้อ 2 ด้วย column separation technique ซึ่งได้ดัดแปลงจากวิธีของ Schmatz et al. 1984 โดยทำการบรรจุ DEAE-cellulose (Sigma) ที่ได้ผ่านการล้างและปรับให้อยู่ใน PBSG buffer pH 8.0 ซึ่งปลอดเชื้อ (รูปที่ 3b) จากนั้นนำไปใส่ลงใน column ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ syringe ขนาด 3 มล. ซึ่งมี nylon wool ที่ปลอดเชื้อแพ็คอยู่ด้านล่างบริเวณปลายของ syringe และบริเวณด้านบนของ syringe จากนั้นตั้ง syringe ที่บรรจุ DEAE เรียบร้อยแล้วไว้ในแนวตั้ง (รูปที่ 4) โดยติดตั้งอุปกรณ์ควบคุมการไหลของของเหลวใน syringe แล้วปรับอัตราการไหลของ buffer ให้ได้ 2 มล./นาที จากนั้นจึงเติมสารละลาย 1 มล. ที่มี sporozoites เพื่อให้ไหลผ่าน column ซึ่งจะได้ sporozoites ที่ไม่มีเศษ

เปลือกของ oocysts และ sporocysts รวมทั้งเศษของ feces ที่อาจตกค้างอยู่ ซึ่งเหมาะที่จะนำไปเติมลงในเซลล์เพาะเลี้ยงต่อไป



รูปที่ 3 a) ลักษณะของ glass beads ขนาด 0.5 mm ที่ใช้ในการทดลองนี้ และ b) ลักษณะของ DEAE ที่แช่ใน PBS pH 8.0 ก่อนนำไปแพ็คลงใน column



รูปที่ 4 column ที่ใช้แยก sporozoites ซึ่งดัดแปลงจากหลอดฉีดยาขนาด 3 มล. โดยการบรรจุ nylon wool และ DEAE-cellulose ไว้ภายใน

### การ infection ของ sporozoites และ ระยะการพัฒนามตามระยะเวลา

เลี้ยงเซลล์ MDBK, BEK, SK-6 และ Vero ซึ่งอยู่บน Tissue Culture Coverslips ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มม. (Nunc, Nalgen Nunc International, USA) เมื่อเซลล์เจริญเติบโตครอบคลุม 70-80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ coverslips ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มล. ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จะถูกดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติม sporozoites จำนวน 100,000 เซลล์ ซึ่งอยู่ในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มล. และมียาปฏิชีวนะและยาฆ่าเชื้อราความเข้มข้น 5 เท่า บ่มไว้ข้ามคืน ล้าง sporozoites ส่วนเกินทิ้งให้สะอาดที่สุด จากนั้นเก็บ Tissue Culture Coverslips ออกมาที่เวลาต่างกัันดังนี้คือ 16, 24, 46, 71, 96, 120 และ 166 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งทุกๆ ช่วงเวลาจะมีกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีการเติม sporozoites ลงไป coverslips ที่ถูกยกออกมาจะนำมาล้างด้วย PBS pH 7.4 หลายๆ ครั้งแล้วปล่อยให้หมาดจากนั้นนำไป fix ด้วย Bouin solution โดยแช่ทิ้งไว้จนกว่าจะทำการย้อมด้วย สี Periodic acid-Schiff (PAS) (Sigma-Aldrich) coverslide ที่ย้อมสีแล้วจะถูกนำมาเตรียมเป็น สไลด์ถาวร และอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

### การย้อมสี Periodic acid-Schiff (PAS)

วิธีการย้อมสี PAS เป็นไปตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้คือ

1. coverslide ที่อยู่ใน Bouin solution จะถูกนำมาแช่ใน formalin-ethanol solution นาน 1 ถึง 2 นาที
2. นำไปล้างด้วยน้ำไหลเบาๆ นาน 1 นาที
3. นำไปแช่ใน periodic acid solution นาน 5 ถึง 8 นาที
4. ล้างด้วย distilled water หลายๆ ครั้ง
5. แช่ใน shiff's reagent นาน 15 ถึง 20 นาที
6. ล้างด้วยน้ำไหลเบาๆ 5 ถึง 8 นาที
7. counterstain ด้วย hematoxylin solution 1.5 ถึง 3 นาที
8. ล้างด้วยน้ำไหลเบาๆ 15 ถึง 30 วินาที
9. ทิ้งให้แห้ง

### การแช่แข็ง sporozoites และการละลายเพื่อนำกลับมาใช้งาน

Sporozoites จะถูกแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว โดยผ่านขั้นตอนดังต่อไปนี้คือ หลังจากนับจำนวน sporozoites และปรับให้มีจำนวน 1,400,000 sporozoites ต่อ มล.ของอาหารสำหรับแช่แข็ง (โดยเติมเปอร์เซ็นต์ DMSO ที่ต่างกัน) แล้วบรรจุลงหลอดแช่แข็งขนาด 1.5 มล. จากนั้นนำไปเข้าปรับอุณหภูมิให้เป็น 4°C ในตู้เย็นนาน 30 นาที จากนั้นนำเข้าเครื่องลดอุณหภูมิ (Biocool III) (รูปที่ 5) โดยตั้งค่าการลดอุณหภูมิจาก 4°C ไปถึง -70°C โดยมีการลดอุณหภูมิทีละ 1°C เมื่ออุณหภูมิของหลอดลดถึง -70°C แล้วนำลงแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที

การละลายเพื่อนำกลับมาใช้งานนั้นกระทำได้โดยการนำหลอดตัวอย่างขึ้นจากไนโตรเจนเหลวแล้วนำไปแช่ในน้ำอุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสทันที รอจนน้ำแข็งละลายหมดจึงนำไปดำเนินการ

### การวัดผลของการแช่แข็งต่อจำนวน sporozoites

ทำการนับจำนวน sporozoites ก่อนการแช่แข็งและภายหลังการแช่แข็งโดยทำละลายที่อุณหภูมิ 37°C ด้วย Haemocytometer counting chamber เปรียบเทียบจำนวนที่นับได้ก่อนการแช่แข็งกับจำนวนที่นับได้ภายหลังการทำละลายและแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์



รูปที่ 5 เครื่องลดอุณหภูมิ (Biocool III)

### การวัดผลของการแช่แข็งต่อการ infection เซลล์ MDBK ของ sporozoites

นับจำนวน intracellular sporozoites ของ *Eimeria tenella* ตามวิธี “การนับจำนวนของ sporozoites ที่ infection เซลล์เพาะเลี้ยง” เปรียบเทียบกันระหว่างจำนวนที่ infection ในแต่ละ treatments ดังนี้คือ

- กลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้มีการเติม sporozoites
- กลุ่มควบคุม ซึ่งมีการเติม sporozoites ซึ่งเพิ่งถูก exystation
- กลุ่มที่แช่แข็งซึ่งมีปริมาณ DMSO ต่างกันดังต่อไปนี้คือ 0, 1, 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์

### การนับจำนวนของ sporozoites ที่ infection เซลล์เพาะเลี้ยง

Tissue culture coverslips ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มม. ที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่ง infection ด้วย sporozoites ของ *Eimeria tenella* และ ย้อมด้วย PAS แล้วจะถูกนำมานับจำนวน intracellular sporozoites ทั้งนี้จะนับทั้งแผ่น coverslips ด้วย objective lens กำลังขยาย 100x ซึ่งทำทั้งหมด 4 ซ้ำ

### การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

เปอร์เซ็นต์ของ oocyst และ sporocysts, เปอร์เซ็นต์ของ sporocysts และ sporozoites, จำนวน intracellular sporozoites ถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS statistical package (version 8, SAS Institute Inc. 1998, Car, NC, USA) ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม (จำนวนการเขย่า 0,2,4,6,8,12 (SI); เวลาในการแช่ในกรด Taurocholic และ Trypsin ) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) (Proc ANOVA) ค่า  $p \leq 0.05$  ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

## **ผลการวิจัย และวิจารณ์**

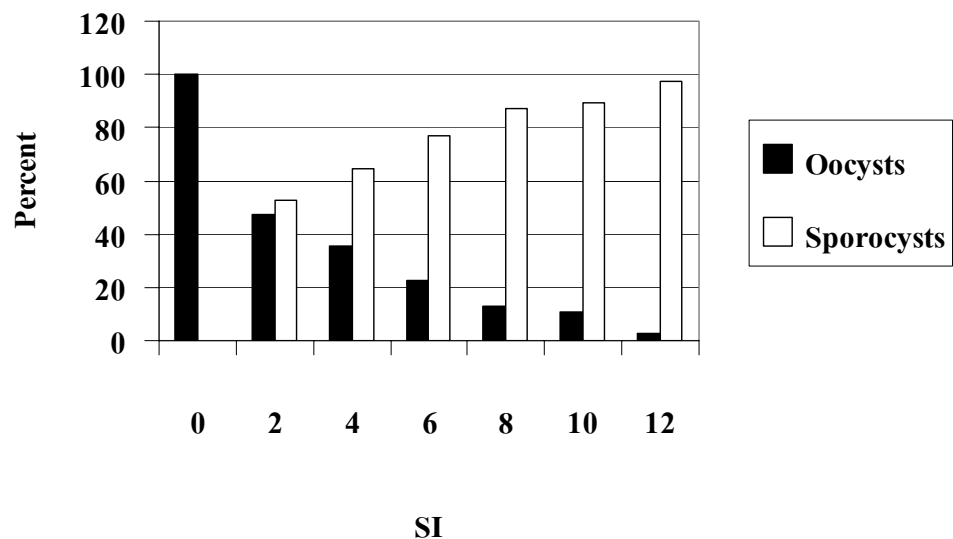
### ปรับปรุงวิธีการผลิต oocyst โดยการป้อนไก่ที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

จำนวนไก่ที่สามารถเก็บ oocysts ได้จะอยู่ที่ประมาณ 80 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ไก่ที่เหลือจะเป็นไก่ที่ขับเชื้อออกมาไม่มากทำให้ไม่คุ้มกับการเก็บตัวอย่างซึ่งต้องมีการฆ่าไก่ สำหรับวันที่ไก่ขับเชื้อออกมามากสุดนั้นอยู่ในช่วงวันที่ 7 ถึงวันที่ 10 หลังการป้อนเชื้อ การปรับปรุงวิธีการผลิต oocyst โดยการป้อนไก่ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นนั้นพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนไก่ที่สามารถเก็บ oocysts ได้จนถึง 80 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ จากที่เคยทำได้เพียง 50 – 60 เปอร์เซ็นต์และลดความแปรปรวนของระยะห่างระหว่างวันที่ป้อนเชื้อถึงวันที่ขับเชื้อออกมาสูงสุดอยู่ที่วันที่ 7 ถึงวันที่ 10 หลังการป้อนเชื้อ แทนที่จะเป็น วันที่ 7 ถึงวันที่ 14 หลังการป้อนเชื้อนั้น ทำให้ลดงานที่ทำลงไปได้มากและยังทำให้ได้ปริมาณ oocysts สูงขึ้นในการเลี้ยงไก่คราวเดียว ทำให้ประหยัดงบในการเลี้ยงไก่ ทั้งนี้เป็นผลจากการเปลี่ยนวิธีการให้อาหารก่อนการป้อนเชื้อจากที่ให้อาหารปลอดเชื้อตลอดการทดลองเป็นให้กินอาหารที่มียากันบิดกินไปจนถึง 3 วันก่อน

การป้อนเชื้อ ซึ่งไก่ที่ไม่ได้รับยากันบิตก่อนการป้อนเชื้อบางตัวอาจได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมหรือในอาหารในระดับต่ำๆ มาก่อนที่จะป้อนเชื้อทำให้เกิดภูมิคุ้มกันบางส่วน เมื่อได้รับเชื้อจึงทำให้จำนวนไก่ที่ขับเชื้อค่อนข้างต่ำ

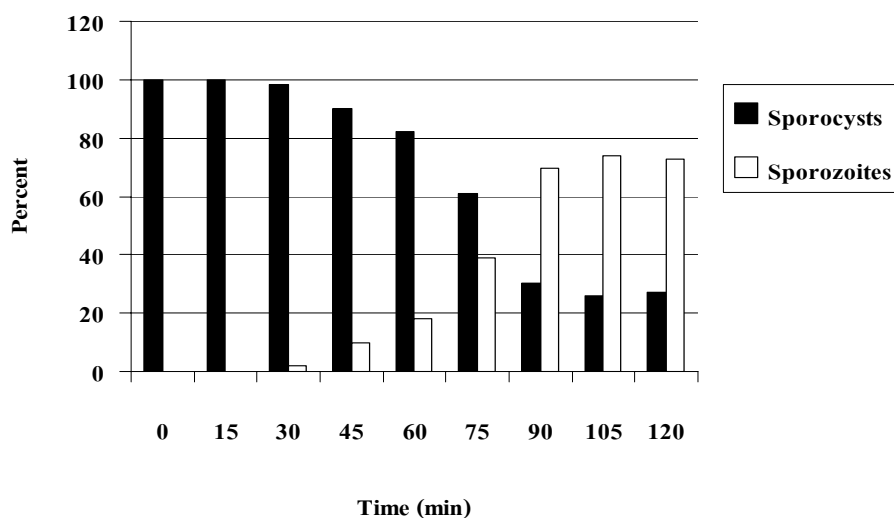
#### การ excystation เพื่อให้ได้ sporozoites ที่มีการปนเปื้อนน้อยที่สุด

การ excystation เพื่อให้ได้ sporozoites ที่มีการปนเปื้อนน้อยที่สุด ใช้หลักการ 3 ข้อ ใหญ่ๆ คือ 1. การทำให้เปลือกของ oocysts แตกด้วยการกระแทกด้วย glass beads ขนาด 0.5 มม. ปริมาตร 0.75 มล. ในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 15 มล. ซึ่งมี sporulated oocysts ประมาณ 10 ล้านในปริมาตร 2 มล. โดยการเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า (Vortex-2 Genie, Scientific industries, Inc) ในที่นี้จะใช้หน่วย SI (Shaked Interval) ซึ่ง 1 SI หมายถึง การเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 10 ครั้ง ครั้งละ 1 วินาทีและในแต่ละ SI จะพัก 1 นาที 2. การย่อยเปลือกหุ้ม sporocysts ด้วย กรด Taurocholic 1 เปอร์เซ็นต์ (Sigma) ผสมกับ trypsin 0.25 เปอร์เซ็นต์ (Sigma) บ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส และ 3. การแยก sporozoites ออกจากเปลือกที่ได้จากข้อ 1 และ 2 ด้วย column separation technique ที่ได้ดัดแปลงจากวิธีของ Schmatz et al. 1984 โดยทำการบรรจุ nylon wool และ DEAE-cellulose (Sigma) ในกระบอกฉีดขนาด 3 มล. ใน PBSG buffer pH 8.0 ซึ่งผลของการ excystation ด้วยวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับ จำนวนครั้งของการถูกกระแทกด้วย glass beads ระยะเวลาที่สัมผัสกับกรด และเทคนิคการแพ็ค column โดยมีผลแสดงใน รูปที่ 6 และ 7 ซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นต์ของ sporocysts จะเริ่มสูงกว่า sporulated oocysts ตั้งแต่ 2 SI ขึ้นไปอย่างไรก็ตามจำนวนสุทธิของ sporocysts ยังคงมีน้อย (ประมาณ 2,600,000 sporocysts) และเมื่อจำนวน SI เพิ่มขึ้นจะพบว่า เปอร์เซ็นต์ของ sporocysts จะเพิ่มขึ้นตามลำดับเช่นเดียวกัน ขณะที่เปอร์เซ็นต์ของ sporulated oocysts นั้นลดลงตามลำดับจำนวน SI ที่เหมาะสมสำหรับสภาพการทดลองนี้อยู่ระหว่าง SI ที่ 10 ถึง SI ที่ 12 เพราะมีเปอร์เซ็นต์ sporocysts ใกล้เคียง 90 เปอร์เซ็นต์ (89 เปอร์เซ็นต์) (8,300,000 ถึง 9,500,000 sporocysts) ขณะที่ sporulated oocysts เหลืออยู่ในช่วง 11 เปอร์เซ็นต์ ถึง 3 เปอร์เซ็นต์ (1,000,000 ถึง 250,000 oocysts) (รูปที่ 6) จากการทดลองพบว่าหากจำนวน sporulated oocysts ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วและทำการกระแทกต่อไปด้วย glass beads จำนวนของ sporocysts จะลดลง (ไม่ได้แสดงข้อมูล) โดยจะมีจำนวน sporozoites เพิ่มขึ้นซึ่งไม่เหมาะสมเนื่องจาก sporozoites ไม่ทนทานต่อสิ่งแวดล้อม และขั้นตอนต่อจากนี้ไปจะต้องทำการย่อยเปลือกของ sporocysts ด้วยกรดซึ่งจะทำให้ sporozoites สลายตัวไปก่อนใช้งาน



**รูปที่ 6** เปอร์เซนต์ของ Oocysts และ Sporocysts ตามจำนวนของการเขย่าอย่างแรง SI = Shaked Interval, 1 SI หมายถึงการเขย่าหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่า 10 ครั้ง ครั้งละ 1 วินาที

สำหรับการย่อยเปลือกของ sporocysts ด้วยกรด Taurocholic 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ Trypsin 0.25 เปอร์เซ็นต์ นั้น พบว่าระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 90 นาที ถึง 120 นาที เพราะเป็นช่วงเวลาที่เปอร์เซนต์ของ sporozoites สูงที่สุด (70 ถึง 74 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่จำนวนของ sporocysts จะค่อนข้างคงที่ และหากใช้เวลาในการบ่มนานกว่านี้เปอร์เซนต์ของ sporozoites จะลดลง (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 เปอร์เซนต์ของ sporocysts และ sporozoites ซึ่งแช่อยู่ในกรด Taurocholic 1 เปอร์เซนต์และ Trypsin 0.25 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

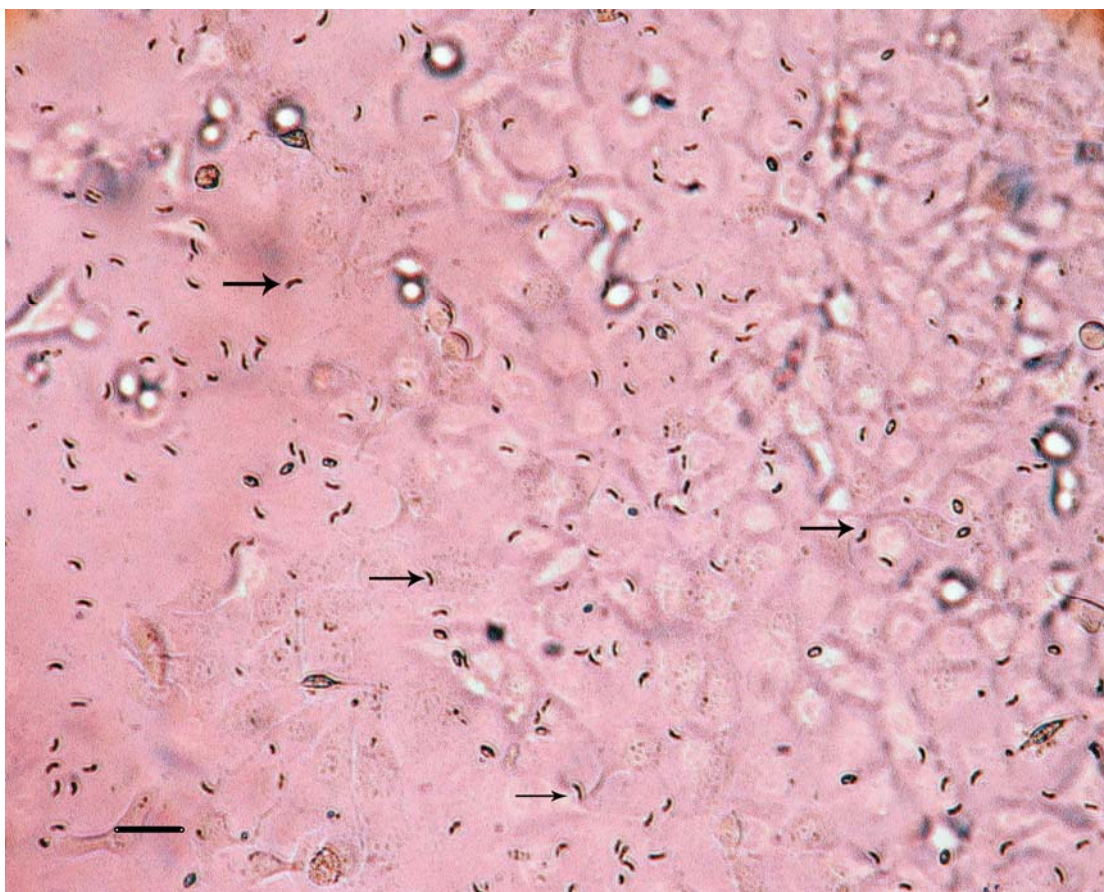
#### การ infection ของ sporozoites และ ระยะการพัฒนาระยะเวลา

จากผลการทดลองพบการ infection ของ sporozoites ในเซลล์ทั้ง 4 ชนิดคือ BEK, SK-6, Vero และ MDBK ส่วน sporozoites ที่ไม่สามารถ infection ได้จะลอยอยู่บนเซลล์ซึ่งเห็นได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 8) อย่างไรก็ตามไม่พบการพัฒนาเป็นระยะ trophozoit, Schizont และ Merozoit ของ sporozoites ภายหลังการ infection ในเซลล์ SK-6 และ Vero (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการ infection และ การพัฒนาของ *E. tenella* ภายหลังการ infection ในเซลล์ ชนิดต่างๆ ที่อายุเซลล์ 24 และ 48 ชั่วโมง

| ชนิดเซลล์ | ผลการ infection | การพัฒนาของ sporozoites ภายหลัง infection* | อายุเซลล์ขณะเริ่ม infection (ชม.) |
|-----------|-----------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|
| BEK       | Infection       | Yes                                        | 24                                |
| BEK       | Infection       | No                                         | 48                                |
| SK-6      | Infection       | No                                         | 24                                |
| Vero      | Infection       | No                                         | 24                                |
| Vero      | Infection       | No                                         | 48                                |
| MDBK      | Infection       | Yes                                        | 24                                |
| MDBK      | Infection       | Yes                                        | 48                                |

\* การพัฒนาเป็นระยะ trophozoit, Schizont และ Merozoit



**รูปที่ 8** sporozoites ที่เหลือ (ลักษณะเหมือนที่ลูกศรชี้) อยู่บนเซลล์ BEK 24 ชั่วโมงภายหลังการ infection ก่อนการล้างด้วย PBS ขนาดของบาร์เท่ากับ 20 ไมครอน

จากการนับจำนวน intracellular sporozoites บน tissue culture coverslips ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มม. (นับทั้งแผ่น ซึ่งคำนวณพื้นที่ได้ 530.3 ตร.มม.) เปรียบเทียบกันในเซลล์แต่ละชนิดนั้น MDBK มีจำนวน intracellular sporozoites ใน coverslip มากที่สุดคือ 705.5 intracellular sporozoites ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเซลล์เพาะเลี้ยงอีกสามชนิด ส่วน Vero Cell มีจำนวน intracellular sporozoites ใน coverslip 538.25 intracellular sporozoites ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเซลล์เพาะเลี้ยงอีกสามชนิด ส่วนเซลล์อีกสองชนิดคือ BEK และ SK-6 นั้น มีค่า intracellular sporozoites ใกล้เคียงกันคือ 268 และ 264 intracellular sporozoites ตามลำดับซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ MDBK และ Vero Cell (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนของ intracellular sporozoites บนแผ่น coverslip เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มม. ซึ่งมีพื้นที่ทั้งแผ่นเป็น 530.6 ตร.มม.

| Cells | Average intracellular sporozoites on coverslip $\pm$ SD* |
|-------|----------------------------------------------------------|
| BEK   | 268 $\pm$ 15.89 <sup>c</sup>                             |
| SK-6  | 264 $\pm$ 6.88 <sup>c</sup>                              |
| Vero  | 538.25 $\pm$ 14.34 <sup>b</sup>                          |
| MDBK  | 705.5 $\pm$ 4.80 <sup>a</sup>                            |

<sup>a, b, c</sup> อักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

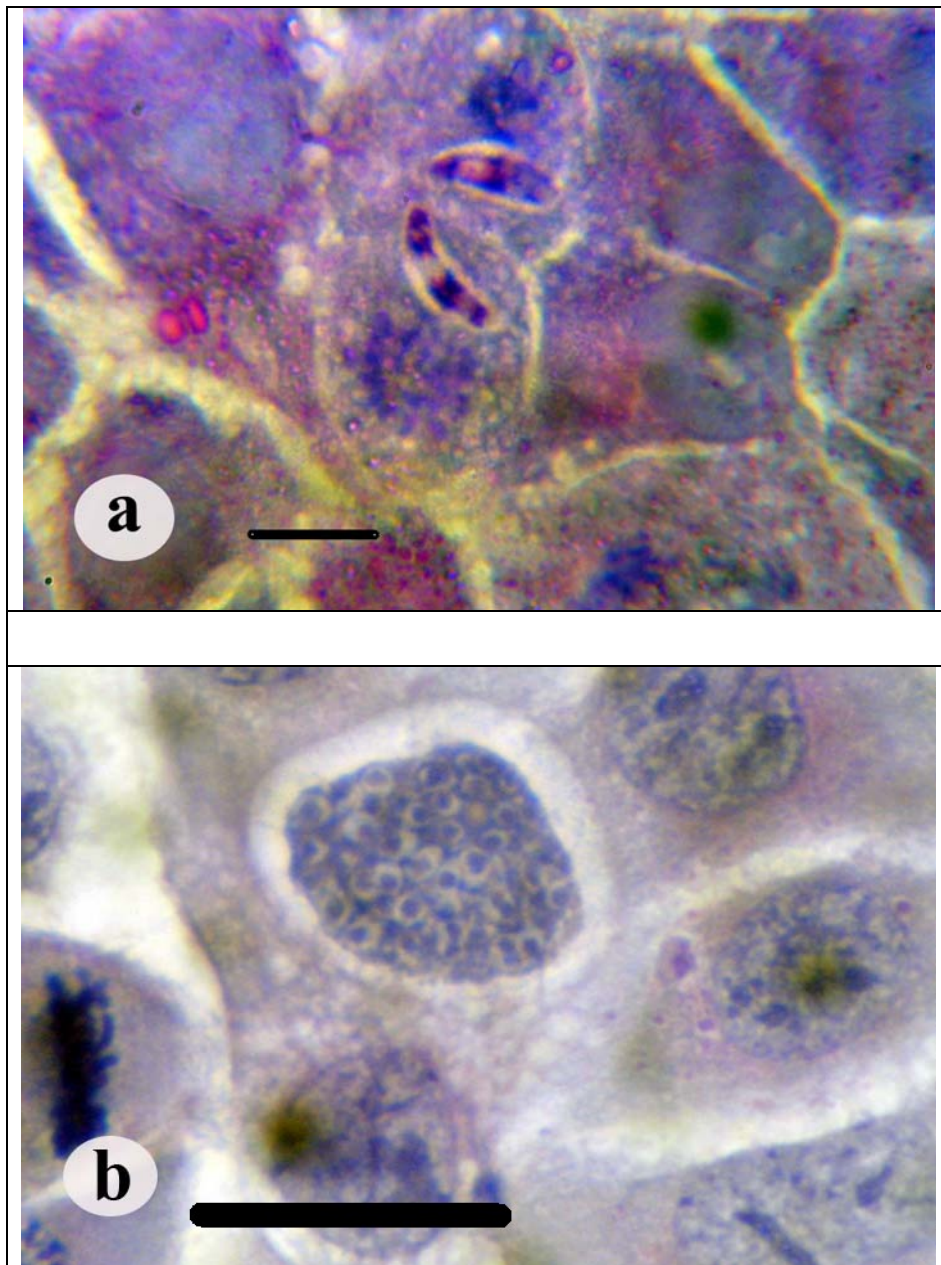
\*นับทั้งแผ่น coverslip ซึ่งมีพื้นที่ 530.6 ตร.มม.

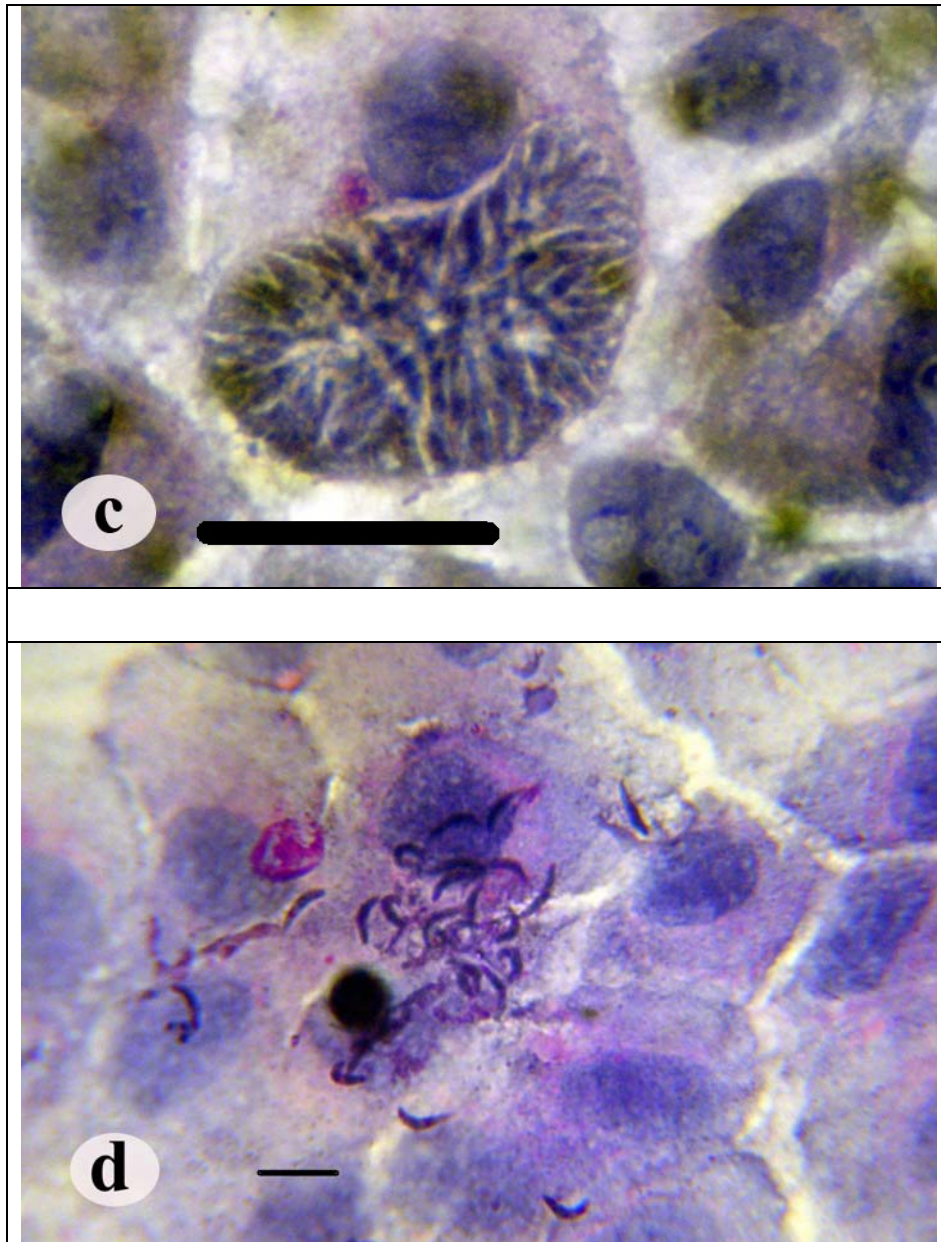
การเปรียบเทียบจำนวนการ infection โดยการนับจำนวน intracellular sporozoites ในเซลล์เพาะเลี้ยง 4 ชนิดคือ BEK, SK-6, Vero และ MDBK cell นั้นพบว่า MDBK มีจำนวนการ infection สูงที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากเซลล์ชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นเซลล์ที่เลี้ยงง่ายและเติบโตได้ดีในห้องปฏิบัติการเซลล์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือก MDBK เป็นเซลล์เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับการ screen ผลของสมุนไพรต่อเชื้อบิดในไก่ โดยนำมาใช้ในช่วงตอนการทดสอบการยับยั้งการ infection

ในส่วนของการนับจำนวนเซลล์ที่ถูก infect ด้วย sporozoites ของ *E. tenella* นั้นในการทดลองนี้ใช้วิธีนับทั่วทั้งแผ่นของ tissue culture coverslip ซึ่งมีรัศมี 13 มม. และมีพื้นที่ 530.5 ตร.มม. นั้นต้องใช้เวลาในการนับค่อนข้างนานซึ่งหากต้องการให้เกิดความรวดเร็วในการนับอาจใช้วิธีสุ่มนับโดยใช้หัว objective ขนาด 100x หรือ 1,000 เท่าซึ่งมีพื้นที่ต่อ field เท่ากับ 0.023 ตร.มม. โดยสุ่มนับไป 20 field ก็จะได้จำนวน infected sporozoites ในพื้นที่ 0.46 ตร.มม. ซึ่งจะสามารถเทียบบัญญัติไตรยางศ์ให้เป็นจำนวน infected sporozoites ในพื้นที่ 530.6 ตร.มม. ได้ต่อไป อย่างไรก็ตามก็ตามจำนวนเซลล์ MDBK เริ่มต้น อายุของเซลล์ จำนวน sporozoites ที่เติมเข้าไปจะต้องเท่ากันในทุกการทดลอง

สำหรับการศึกษาการพัฒนาของ *E. tenella* ในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นเลือกศึกษาในเซลล์ BEK เนื่องจากไม่พบการพัฒนาใน Vero และ SK-6 ส่วน MDBK พบมีรายงานแล้วโดย Tierney and Mulcahy (2003) ส่วนในเซลล์ BEK ยังไม่พบรายงานการศึกษา ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ในเซลล์ BEK ซึ่งถูก infection เมื่ออายุ 1 วันนั้นพบระยะต่างๆ หลังการ infection ของ *E. tenella* ในเซลล์ BEK ที่ 41 องศาเซลเซียส โดยพบการพัฒนาของ *E. tenella* อยู่ 4 ระยะคือ Intracellular sporozoites ที่ 24 ชั่วโมงหลังการ infection (รูป 9a) Immature schizonts ใน cytoplasm ของเซลล์ BEK ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการ infection (รูป 9b) Mature schizonts ที่ 72 ชั่วโมงหลังการ infection (รูป 9c) Extra-cellular merozoites ซึ่งพบบริเวณที่มีไมโทคอนเดรีย

และ คาร์โบไฮเดรต (สีม่วงแดง) ที่ 92 ชั่วโมงหลังการ infection (รูป 9d) อย่างไรก็ตามเมื่อติดตามการพัฒนาของ *E.tenella* ต่อไปจนถึง 166 ชั่วโมงหลังการ infection ไม่พบ complete development ของ *E. tenella* ในเซลล์ดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับ Hofmann and Raether (1990) ซึ่งรายงานว่าพบ complete development ของ *E. tenella* ใน primary kidney cells ของไก่เท่านั้น และจากการทดลองของ Tierney and Mulcahy (2003) ซึ่งทำการศึกษาการ development ของ *E. tenella* ใน MDBK ก็ไม่พบ complete development เช่นเดียวกัน นอกจากนี้จำนวนเซลล์ที่พบการพัฒนาของ *E.tenella* นั้นพบว่ามีประมาณ 10 เซลล์ต่อแผ่น tissue culture coverslip ขนาด 530.3 ตร.มม. ซึ่งถือว่าน้อยมาก ดังนั้นหากต้องการทำการศึกษาในแง่ของการพัฒนาน่าที่จะใช้ primary kidney cells จะดีกว่า





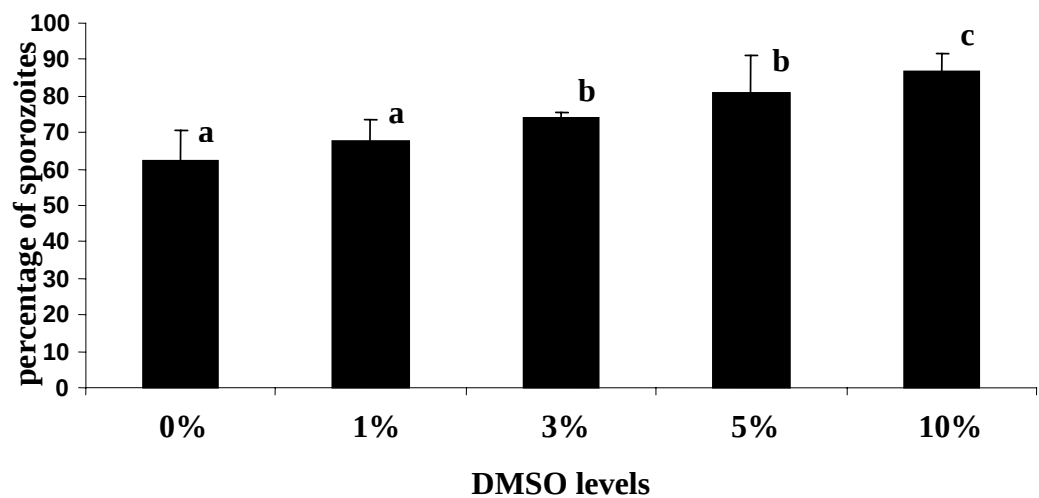
**รูปที่ 9** ระยะต่างๆ ที่พบหลังการ infection ของ *E. tenella* ในเซลล์ BEK ที่ 41 องศาเซลเซียส  
**a** Intracellular sporozoites ที่ 24 ชั่วโมงหลังการ infection **b** Immature schizonts ใน cytoplasm ของเซลล์ BEK ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการ infection **c** Mature schizonts ที่ 72 ชั่วโมงหลังการ infection และ **d** Extra-cellular merozoites ซึ่งพบบริเวณที่มีไกลโคเจน และ คาร์โบไฮเดรต (สีม่วงแดง) ที่ 92 ชั่วโมงหลังการ infection ขนาดของบาร์เท่ากับ 10 ไมครอน

การพบการ infection ของ sporozoites ของ *E. tenella* ในเซลล์ BEK และ SK-6 นั้นยังไม่พบว่าการรายงานมาก่อน ส่วนเซลล์ Vero นั้นเคยมีรายงานการ infection ของ sporozoites ของ *E. tenella* มาแล้วโดย Tierney and Mulcahy (2003) แต่เปอร์เซ็นต์การ infection นั้นไม่สูงนัก ในการทดลองนี้อัตราส่วนของเซลล์ต่อ sporozoites นั้นอยู่ที่ประมาณ 1:2

– 1:3 โดยเลี้ยงเซลล์ไว้หนึ่งคืน หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงจะทำการเติม sporozoites 100,000 sporozoites ลงไป ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสอดคล้องกับรายงานของ SchMatz et al. (1984) ซึ่งได้เปอร์เซ็นต์การ infection อยู่ที่ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ แต่หากใช้ sporozoites มากกว่านี้อาจทำให้เกิด multiple infection และทำให้เซลล์โดนทำลายก็จะพบมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลเสียต่อการทดลอง

#### ผลของการแช่แข็งต่อจำนวน sporozoites

เปอร์เซ็นต์ของ sporozoites ซึ่งผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-196^{\circ}\text{C}$  ที่ระดับ DMSO ต่างกันนั้นพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การคงอยู่ของ sporozoites แตกต่างกัน โดยพบว่าในอาหารแช่แข็งที่ไม่มี DMSO (0 เปอร์เซ็นต์) นั้นมีเปอร์เซ็นต์ของ sporozoites แตกต่างจากในอาหารแช่แข็งที่มี DMSO 1 เปอร์เซ็นต์ อย่างไม่มีนัยสำคัญ ขณะที่มีความแตกต่างจากในอาหารแช่แข็งที่มี DMSO 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ เปอร์เซ็นต์ของ sporozoites ซึ่งอยู่ใน



**รูปที่ 10** เปอร์เซ็นต์ sporozoites ซึ่งแช่แข็งในอาหารที่มีระดับ DMSO ต่างๆ กันภายหลังการนำมาทำละลายเทียบกับ sporozoites ก่อนการแช่แข็ง

\* ค่าเฉลี่ยที่แสดงด้วยตัวอักษรเดียวกันไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \geq 0.05$ )

อาหารแช่แข็งที่มี DMSO 1 เปอร์เซ็นต์นั้นแตกต่างจากที่อยู่ในอาหารแช่แข็งที่มี DMSO 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญ เปอร์เซ็นต์ของ sporozoites ซึ่งอยู่ในอาหารแช่แข็งที่มี DMSO 3 เปอร์เซ็นต์นั้นแตกต่างจากที่อยู่ในอาหารแช่แข็งที่มี DMSO 5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไม่มีนัยสำคัญและแตกต่างจากที่อยู่ในอาหารแช่แข็งที่มี DMSO 10 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญ และ

เปอร์เซ็นต์ของ sporozoites ซึ่งอยู่ในอาหารแช่แข็งที่มี DMSO 5 เปอร์เซ็นต์นั้นแตกต่างจากที่อยู่ในอาหารแช่แข็งที่มี DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 10)

#### ผลของการแช่แข็งต่อการ infection เซลล์ MDBK ของ sporozoites

ภายหลังการแช่แข็ง sporozoites พบว่าเปอร์เซ็นต์การ infection ลดลงเหลือไปกว่า 90 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ sporozoites ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง และจะเห็นได้ว่าระดับ DMSO ที่เพิ่มขึ้นไม่ช่วยให้เปอร์เซ็นต์การ infection เซลล์ MDBK ดีขึ้น ทั้งนี้จะเห็นว่าที่ระดับ DMSO ต่างๆกันนั้นไม่ทำให้ระดับการ infection เซลล์ MDBK แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

DMSO ช่วยลดการสูญเสีย sporozoites จากการแตกภายหลังการแช่แข็งได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์การสูญเสีย sporozoites จะแปรผกผันกับเปอร์เซ็นต์ของ DMSO ที่เพิ่มขึ้น โดยระดับ DMSO สูงสุดที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 10 เปอร์เซ็นต์ นั้นให้ผลในการป้องกันการแตกของ sporozoites ได้ดีที่สุด ซึ่งจะแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่เสริม DMSO ถึงเกือบ 25 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม sporozoites ที่คงอยู่ภายหลังการแช่แข็งในการทดลองนี้นั้นไม่สามารถบอกได้ว่าประสิทธิภาพในการ infection นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบต่อไป โดยการทำสอบการ infection เซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งจากผลการ Infection เซลล์เพาะเลี้ยง MDBK ของ sporozoites ที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้วนั้นพบว่า ความสามารถในการ infection นั้นลดลงไปกว่า 90 เปอร์เซ็นต์โดยมีแนวโน้มว่า sporozoites ที่แช่แข็งในอาหารแช่แข็งที่ไม่เสริม DMSO นั้นสามารถ infection ได้ดีกว่ากลุ่มอื่นๆ ที่ทดสอบ ทั้งนี้ผลการ infection จะลดลงไปตามเปอร์เซ็นต์ของ DMSO ที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวถึงสาเหตุของการลดความสามารถในการ infection ของ sporozoites ที่ผ่านการแช่แข็งในการทดลองนี้นั้น อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ ไม่ว่าจะเป็นชนิดของ cryoprotective agent อาจจะไม่เหมาะสม ซึ่งหากต้องการทราบก็จะต้องทำการทดลองใช้ cryoprotective agent ชนิดอื่น polyvinylpyrrolidone, Dextran, Glycols และ glycerol เป็นต้น หรืออาจจะเกิดจากการลดอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ซึ่งต้องทำการศึกษาขั้นตอนการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมกว่านี้ ในเรื่องของเปอร์เซ็นต์ของ DMSO ที่ใช้นั้นคงไม่สามารถกล่าวได้ในที่นี้ว่าการใช้ที่ระดับ DMSO เป็น 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ นั้นไม่เหมาะสม ถึงแม้ผลการทดลองจะชี้ชัดว่า sporozoites ที่ผ่านการแช่แข็งมีความสามารถในการ infection เซลล์ MDBK ได้ไม่ต่างจากกลุ่มที่ไม่เติม DMSO แต่จะต้องทำการทดลองเพิ่มเติมจึงจะชี้ชัดได้ว่าความเข้มข้นดังกล่าวไม่เหมาะสมเนื่องจากการใช้งานในความเข้มข้นดังกล่าวสำหรับการแช่แข็ง สเปิร์ม หรือ เซลล์เพาะเลี้ยงนั้นได้ผลดี ส่วนการใช้ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายสำหรับแช่แข็งนั้นไม่เหมาะสมเนื่องจากเปอร์เซ็นต์ของ sporozoites ที่สูญเสียไปภายหลังการแช่แข็งใกล้เคียง sporozoites ที่ไม่เติม DMSO มาก ซึ่งบ่งว่าในระดับดังกล่าวไม่สามารถป้องกันการแตกของ sporozoites ได้เมื่อถูกแช่แข็ง

ตารางที่ 3 ผลของการแช่แข็ง sporozoites ด้วยอาหารสำหรับแช่แข็งที่มีเปอร์เซ็นต์ของ DMSO ที่ความเข้มข้นต่างกัน ต่อความสามารถในการ infection เซลล์ MDBK

| Percentage of DMSO        | Number of sporozoites showing parasitophorous vacuole after entering MDBK cells | Average intracellular sporozoites on coverslip $\pm$ SD* | Reduction compared with before freezing (control) |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 10                        | 68, 80, 65                                                                      | 71 $\pm$ 7.9                                             | 91.3                                              |
| 5                         | 72, 66, 73                                                                      | 70.3 $\pm$ 3.8                                           | 91.2                                              |
| 3                         | 80, 74, 71                                                                      | 75 $\pm$ 4.6                                             | 90.7                                              |
| 1                         | 79, 80, 67                                                                      | 75.3 $\pm$ 7.2                                           | 90.7                                              |
| 0                         | 82, 77, 69                                                                      | 76 $\pm$ 6.6                                             | 90.6                                              |
| Before freezing (control) | 714, 768, 981                                                                   | 821 $\pm$ 141.17                                         | 0                                                 |

\*นับทั้งแผ่น coverslip ซึ่งมีพื้นที่ 530.6 ตร.มม.

โดยสรุปจะเห็นว่าการแช่แข็ง sporozoites ของ *Eimeria tenella* โดยใช้ cryoprotectant additive เป็น DMSO และค่อยๆ ลดอุณหภูมิลงทีละ 1 องศาเซลเซียสนั้น ยังไม่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษา sporozoites เพื่อนำมาใช้ infection เซลล์เพาะเลี้ยง เพราะ เปอร์เซ็นต์การ infection ต่างจากการใช้ sporozoites สดเป็นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรต่อการยับยั้งการ infection ในเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นยังคงต้องใช้ sporozoites ซึ่งต้องทำการเตรียมสดๆ ก่อนการ infection

## เอกสารอ้างอิง

Hofmann J. and Raether W. 1990. Improved techniques for the in vitro cultivation of *Eimeria tenella* in primary chick kidney cells. Parasitol Res. 76(6): 479-486

James, E.R. 2004. Parasite cryopreservation by vitrification. Cryobiology. 49, 201-210

Klotz C. 2005. Studien zur DNA-Vakzinierung von Hühnern mit *Eimeria tenella*-Antigenen. Retrieved August, 2009, from <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/klotz-christian-2005-02-21/HTML/chapter1.html>

Raether, W., Mehlhorn, H., Hofmann, J., Brau, B., and Ehrlich, K. 1991. Flow cytometric analysis of *Eimeria tenella* sporozoite populations exposed to salinomycin sodium in vitro: a comparative study using light and electron microscopy and an in vitro sporozoite invasion-inhibition test. Parasitology Research. 77, 386-394.

Schmatz DM., Crane MJ. And Murray PK. 1984. Purification of *Eimeria* Sporozoites by DE-52 Anion Exchange Chromatography. J Protozool. 31(1): 181-183

Tierney J. and Mulcahy G. 2003. Comparative development of *Eimeria tenella*(Apicomplexa) in host cells in vitro. Parasitol Res. 90: 301-304

# The *ex vivo* development of *Eimeria tenella* in BEK and SK-6 cell lines

S.Porntrakulpipat<sup>1\*</sup>, P.Borisutpeth<sup>1</sup>, S. Supunkong<sup>3</sup>, P.Kanbutra<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand

<sup>2</sup> Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand

<sup>3</sup> Department of Animal Science, Graduate school, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand \*Corresponding author

**Keywords:** *Eimeria tenella*, coccidia, *ex vivo* infection, BEK, SK-6

## Introduction

*Eimeria tenella* (*E.tenella*) is the best known of poultry coccidiosis due to its easily recognizable lesions and dramatic losses in commercial broilers and layer pullets (1). Chemotherapy and chemoprevention are widely used in most commercial poultry today. Drug resistance among parasite strains is still found in the field (1) which makes it remains in need for development of alternative control methods (2). However, in order to develop new product for antiparasitic use, infection and developmental model of coccidian must be established. Several cell lines (e.g. MDBK, BHK, Vero etc.) have been studied for this purpose (3) (4) (5). Among these cell lines, MDBK has been demonstrated to be one of the most suitable epithelial lines for supporting *E.tenella* (5) (6). Nevertheless, BEK cell lines could support only first asexual cycle in life cycle of *E.tenella* (6). Consequently, other alternative cell lines which are widely used in laboratory remain to be studied whether it could support further stage in life cycle of *E.tenella*. In this study, we have studied the developmental model of *E.tenella* using BEK and SK-6 cell line.

## Material and Methods

**Production of sporulated oocyst:** Oocysts stock was obtained from Assistant Professor Doctor Somboon sangmaneedet, department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University. Day old Arbor Acres broiler were obtained from a commercial hatchery, and raised individually in cage free from coccidian. Not until 2 weeks old, they were fed with commercial ration containing anticoccidial drug. Three days before inoculation with *E. tenella*, ration without anticoccidial drug was given to the chicks. Each chicken received  $1 \times 10^5$  sporulated oocysts orally. Feces were monitored for the existing of oocysts from 6 day post inoculation. Cecum was collected from chicken in which 50 to 100 oocysts were found under 10 x objectives in their feces. Cecum was washed several times with normal saline to reduce the contamination of other *Eimeria* species. Cecal mucosa was scraped with glass slide and digested with pepsin (2mg/ml) at pH 2.0 and 39°C for 1 h. Pepsin and debris were removed by centrifugation (1000g) in distilled water (5). After floatation in saturated NaCl, oocysts were further purified and sterilized by incubating in cold Clorox (4°C) for 10 minutes (7). Oocysts were washed several times with PBS (pH 7) to remove Clorox. In order to sporulation, oocysts of *E.tenella* were suspended at approximately  $2.5 \times 10^5$  per ml in 2% (w/v) potassium dichromate in a conical flask (8)

and gently shaken at 130 rpm and room temperature for 48 h.

**Isolation and purification of sporozoites:** Excystation process was modified from Tomley et al 1997 (8) which can be briefly described as the following.  $1 \times 10^7$  sporulated oocysts were suspended in 2 ml of PBS in 15 ml conical flask. 0.75 ml of 0.5 millimeter diameter glass beads were added to conical flask. Suspensions were vigorously whirlmix until most of the oocysts were mechanically broken to release sporocysts. Sporocysts were then incubated with 5 ml 1% taurocholic acid (w/v) and 0.25% trypsin (w/v) at 41°C for 90 minutes. Free sporozoites were washed several time with PBS pH 7.4, 7.8 and 8 accordingly to remove taurocholic acid and trypsin and finally suspended in 1 ml PBS plus 1% glucose (PBSG) pH 8. Column separation technique was modified from Schmatz et al. 1984 (5). Suspension of sporozoites was run through 3 ml sterile syringe packed with pre-swollen DEAE-cellulose pH 8 and nylon wool. Pure sporozoites were suspended in MEM pH 7.4.

**Infection and growth of *E.tenella* in cell lines:** BEK and SK-6 cell line were obtained from the veterinary research and development center, upper north-east. Both cell lines were cultured in MEM supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (pH 7.4) at 37° C with 5% CO<sub>2</sub>. 40,000 cells of each cell line were seeded on 24 well tissue culture plate (Nunc, Wiesbaden Biebrich, Germany) containing 13 millimeter diameter of tissue culture coverslips (Nunc, Nalgen Nunc International, USA). 24 h later, 50,000 pure sporozoites in MEM supplemented with 5% FBS (pH 7.4) and 5x penicillin and streptomycin were added to the well. Coverslips were harvested every 24 h from 24 h to 144 h after infection.

**Staining:** Harvested coverslips were washed several time with PBS and then fixed with Bouin solution. PAS staining technique was carry out according to the manufacture recommendation (Sigma-aldrich®)

## Results and Discussion

Sporozoites of *E. tenella* were able to penetrate into both cell lines. However, intracellular development of the parasite was different. For BEK, at 24 h post inoculation (pi), intracellular sporozoites with glycogen and carbohydrate rich regions were found (Fig. 1a) and located in cytoplasmic parasitophorus vacuole. Immature schizonts contained in host cell cytoplasm were demonstrated at 46 hour pi (Fig. 1b). At 71 hours pi, mature schizonts with budding merozoites were shown (Fig. 1c) and extra-cellular merozoites with glycogen and carbohydrate rich regions were observed at 96 h (Fig. 1d).

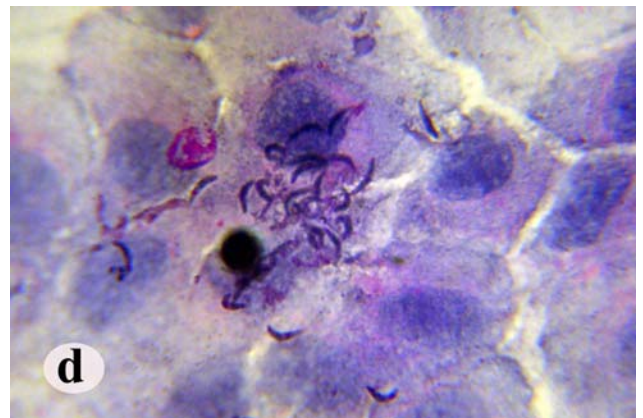
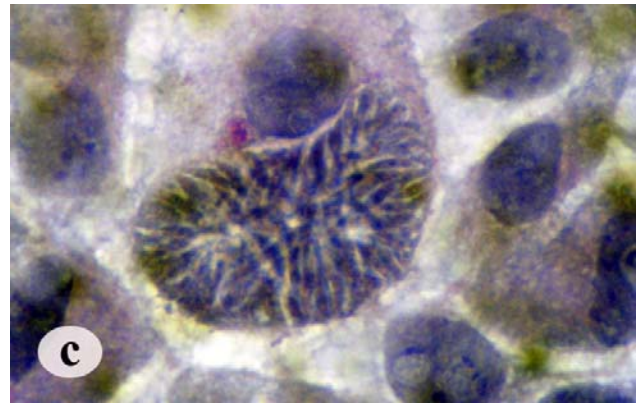
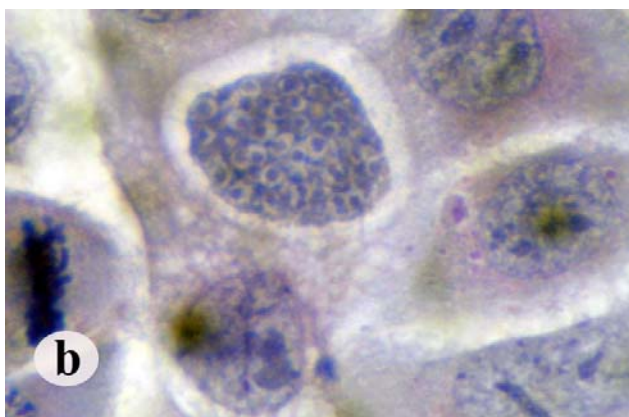
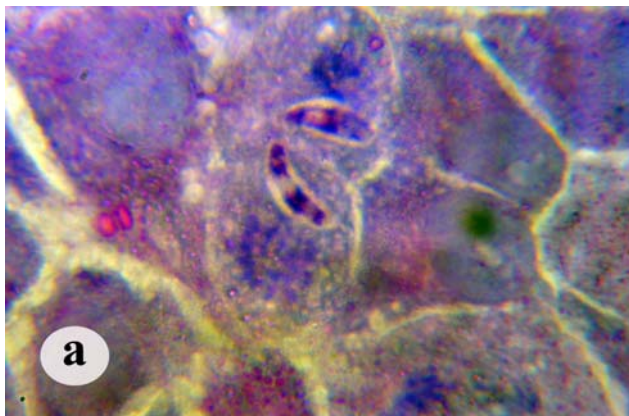
In contrast, the intracellular development was not found in SK-6. This study indicates that BEK but not SK-6 cell line could support the development of *E.tenella*. However, we found only first asexual cycle in life cycle of *E.tenella* which is in agreement with the study of Tierney et al. 2004 on MDBK cell line (6). This result suggest that BEK cell line is an appropriate medel for further study anti-coccidial effect of herbs especially in the first asexual cycle in life cycle of *E.tenella*.

#### Acknowledgement

This work was supported by The Thailand Research Fund.

#### References

1. McDougald, 2003. Diseases of Poultry 973-991.
2. Chapman, 1998. Int J Parasitol 28: 1141-1144.
3. Tierney and Mulcahy, 2003. Parasitol Res 90: 301-304.
4. Augustine, 2001. J Eukaryot Microbiol 48(2): 177-181.
5. Schmatz et al., 1984. J Protozool 31:181-183.
6. Tierney et al., 2004. Vet Parasitol 122: 171-183.
7. Jackson, 1964. Parasitol 54: 87-93.
8. Tomley, 1997. Methods 13: 171-176



**Figure 1:** The developmental stage of *E.tenella* in BEK cell line. a) intracellular sporozoites, b) Immature schizonts c) mature schizonts and d) extra-cellular merozoites