PLASMODIUM VIVAX CRYOPRESERVATION TO PRESERVE GAMETOCYTE INFECTIVITY

NONGNUCH YIMAMNUAYCHOKE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(ENVIRONMENTAL BIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATED STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2009

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

PLASMODIUM VIVAX CRYOPRESERVATION TO PRESERVE GAMETOCYTE INFECTIVITY

NONGNUCH YIMAMNUAYCHOKE 4836416 SCEB/M

M.Sc. (ENVIRONMENTAL BIOLOGY)

THESIS ADVISORY COMITTEE: SANGVORN KITTHAWEE, Ph.D. (ENTOMOLOGY), THANAPORN RUNGRUANG, Ph.D. (MEDICAL SCIENCES), JETSUMON PRACHUMSRI, Ph.D. (BIOLOGY)

ABSTRACT

The establishment of a *Plasmodium vivax* isolate that can be continuously cultured is critical for research on parasite biology; however, this type of continuous culture has not yet been performed. Drugs and molecular studies of this parasite have to rely on parasite cryopreservation or experiments need to be done at the areas where *P. vivax* is endemic. This study investigated a method of cryopreservation with the parasite using 5 different cryoprotectants: Glycerolyte57, Cell Banker, Cryo-SFM, Cell Banker-glycerol and Cryo-SFM-glycerol. These cryoprotectants were used in controlled and un-controlled freezing temperatures using BioCool freezer and dry ice. Fifty-nine cases of patients' blood were collected. Each blood sample was divided into 2 parts: for feeding to mosquitoes and for cryopreservation. In total, 50 out of 59 cases were frozen, thawed and cultured for 6 hrs then fed to mosquitoes. The infectivity of the gametocytes for the mosquitoes was examined on day 9 post blood feeding. Percent hemolysis was checked and recorded for all cases. The other 9 cases were cultured and parasite growth and development was observed daily. Glycerolyte57 yielded the lowest percent of hemolysis and mostly ring and gametocyte stages were detected after thawing whereas trophozoite and schizont stages were detected when Cell Banker and Cryo-SFM were used as cryoprotectant. Gametocytes from 5 out of 50 cases of blood that were cryopreserved with Glycerolyte57 were able to infect *Anopheles dirus* mosquitoes. The maximum number of oocysts produced in mosquitoes of this batch was 87 (size range 7.5-37.0 µm) as compared to 165 oocysts (size range 17.5 - 42.5 µm) produced when mosquitoes fed on fresh gametocytes from the same patient's blood. There was no difference in parasite viability when BioCool freezer or dry ice was used to freeze the samples. The parasites were able to grow in medium McCoy's 5A supplemented with 25% human AB serum after freezing and thawing. Among the 5 cryoprotectants used in this study, Glycerolyte57 and Cryo-SFM were able to preserve the viability of different stages of the parasites.

KEY WORDS: CRYOPRESERVED / *PLASMODIUM VIVAX* / GAMETOCYTE INFECTIVITY / GLYCEROLYTE57 / CELL BANKER / CRYO-SFM

135 pages

Copyright by Mahidol University

การเก็บรักษาเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ ด้วยวิธีการแช่แข็งเพื่อรักษาคุณสมบัติในการก่อโรคของเชื้อระยะมีเพศ
PLASMODIUM VIVAX CRYOPRESERVATION TO PRESERVE GAMETOCYTE INFECTIVITY

น้องนุช ยิ้มอำนวยโชค 4836416 SCEB/M

วท.ม. (ชีววิทยาสภาวะแวดล้อม)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: สังวรณ์ กิจทวี, ปร.ด. (กีฏวิทยา), ธนาภรณ์ รุ่งเรือง, ปร.ด. (วิทยาศาสตร์-การแพทย์), เจตสุมน ประจำศรี, ปร.ด. (ชีววิทยา)

บทคัดย่อ

การสร้างเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ที่มีความสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเชื้ออย่างต่อเนื่องในหลอดทดลองนั้นมีความสำคัญและจำเป็นต่อการศึกษาชีววิทยาของเชื้อปรสิตนี้ ซึ่งขณะนี้ยังไม่สามารถทำได้ การ ศึกษาด้านยาและชีววิทยาระดับโมเลกุลของเชื้อ ทั้งหมดนี้ยังต้องพึ่งพาเชื้อที่ได้จากการเก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็งเชื้อจากเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ หรือทำการทดลองในพื้นที่มีการระบาดของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ ในการศึกษานี้ได้มุ่งทำการทดสอบการเก็บรักษาโดยการแช่แข็งเชื้อพลาสโมเดียม-ไวแวกซ์โดยใช้สารเพื่อทำการแช่แข็งเชื้อที่แตกต่างกัน 5 ชนิดได้แก่ กลีเซอรอลไลต์57 , เซลล์ แบงค์เกอร์ , ไครโอ-เอสเอฟเอ็ม, เซลล์ แบ็งคเกอร์-กลีเซอรอล และ ไครโอ-เอสเอฟเอ็ม-กลีเซอรอล โดยแช่แข็งด้วยวิธีการควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องBioCool freezer และไม่ควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิโดยแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง ในการศึกษานี้ได้เก็บตัวอย่างเลือดคนไข้ทั้งหมด 59 ตัวอย่างทุกตัวอย่างเลือดจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน เพื่อใช้สำหรับให้ยุงกินและสำหรับการเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีการแช่แข็ง 50 ตัวอย่างเลือดจากทั้งหมด 59 ตัวอย่างที่ได้ทำการแช่แข็ง, ทำให้ละลายและทำการเพาะเลี้ยงต่ออีก 6 ชั่วโมงในหลอดทดลองแล้วจึงนำไปให้ยุงกิน และทำการตรวจสอบการทำให้ก่อโรคได้ในยุงของเชื้อระยะมีเพศในวันที่ 9 หลังยุงกินเลือด ได้ทำการตรวจวัดและทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์การแตกของเม็ดเลือดแดง อีก 9 ตัวอย่างเลือดที่เหลือได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองและมีการติดตามเจริญเติบโตและพัฒนาการของเชื้อปรสิตในแต่ละวัน กลีเซอรอลไลต์57 ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกน้อยที่สุดและหลังการละลายเชื้อแช่แข็งจะพบเชื้อระยะวงแหวนและระยะมีเพศตรวจหามากที่สุด ส่วนระยะโทรโฟซอยด์และไชซอนต์ตรวจพบได้เมื่อใช้เซลล์ แบ็งค์เกอร์และไครโอ-เอสเอฟเอ็มเป็นสารที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อแช่แข็ง เชื้อระยะมีเพศ 5ใน 50 ของตัวอย่างเลือดที่ทำการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งด้วยกลีเซอรอลไลต์57 ยังคงความสามารถในการก่อโรคได้ในยุงก้นปล่องชนิดไดรัสได้ จำนวนโอโอซีสที่มากที่สุดที่ผลิตในยุงที่กินเลือดหลังจากเก็บแช่แข็งมีจำนวน 87 โอโอซีส (ขนาดอยู่ระหว่าง 7.5 - 37.0 ไมโครเมตร)เปรียบเทียบกับ165 โอโอซีส (ขนาดอยู่ระหว่าง 17.5 - 42.5 ไมโครเมตร) ที่ผลิตในยุงที่กินเลือดมีเชื้อระยะมีเพศจากผู้ป่วยคนเดียวกันก่อนที่จะถูกเก็บแช่แข็ง ไม่พบความแตกต่างของการมีชีวิตรอดของเชื้อพลาสโมเดียมไวแวกซ์ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีการการควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิด้วยเครื่องBioCool freezer หรือใช้น้ำแข็งแห้งในการแช่แข็งตัวอย่างเลือด เชื้อปรสิตสามารถเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแมคคอลล์5เอที่เพิ่มเติมซีรั่มจากคนกลุ่มเลือดเอบีเข้าไป 25 เปอร์เซ็นต์หลังการแช่แข็งและละลาย ใน5ชนิดของสารแช่แข็งที่ใช้ในการศึกษานี้กลีเซอรอลไลต์57 และไครโอ-เอสเอฟเอ็มมีความสามารถในการเก็บรักษาความมีชีวิตของระยะต่างๆของเชื้อปรสิต

135 หน้า

Copyright by Mahidol University