MAHIDOL UNIVERSITY

DEVELOPMENT OF THE DETECTION OF BABESIA BOVIS IN CATTLE BY POLYMERASE CHAIN REACTION

KLAOKWAN SAENGSOMBUT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

Copyright by Mahidol University

TH
K63d
1996

ชื่อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Babesia bovis* ในโค โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
ผู้วิจัย	กล่าวขวัญ แสงสมบัติ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	
	วิชัย บุญแสง, Ph.D
	ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D
วันที่สำเร็จการศึกษา	22 กุมภาพันธ์ พ.ศ 2539

บทคัดย่อ

Babesia bovis เป็นเชื้อปาราสิตชนิดหนึ่งซึ่งอาศัยอยู่ในกระแสเลือดของสัตว์ สามารถแพร่กระจายโดยเห็บ (tick) และเนื่องจากโรคที่เกิดจากเชื้อนี้มีความรุนแรงและทำให้โคที่อาศัยอยู่ในแหล่งที่มีการระบาดของโรคตาย มีผลกระทบต่อการพัฒนาทางด้านปศุสัตว์ของประเทศไทย ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อเพื่อการวินิจฉัยโรคนี้จึงมีความจำเป็น เพื่อเลือกวิธีการรักษาที่เหมาะสมและเพื่อการศึกษาทางด้านระบาดวิทยา

ชิ้นดีเอ็นเอของ *B.bovis* ขนาด 6.0 กิโลคู่เบสที่สอดแทรกอยู่ในตัวตรวจ pMU-B1ถูกตัดให้มีขนาดเล็กลงและเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ Bluescribe M13(-)มีโคลนลูกผสม16 โคลนที่ให้สัญญาณจากการทำโคโลนีไฮบริไดเซชั่นกับโครโมโซมของ B.bovis จากผลที่ได้คัดเลือกโคลน pMU-BS7 เพื่อใช้เป็นเป้าหมายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *B.bovis* ในหลอดทดลองเนื่องจากโคลนนี้ให้ความเข้มของสัญญาณต่อขนาดความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสูงที่สุด

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งมีอยู่ในตัวตรวจ pMU-BS7มีขนาด 329 คู่เบสและมีค่า G+C content เท่ากับ 49.5% ได้มีการออกแบบไพรเมอร์ BV2 และ BV3 เพื่อขยายยีนของเชื้อ *B.bovis* ขนาด 182 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ BV1 และ BV2 ขยายยีนขนาด 155 คู่เบส วิธีการนี้มีความจำเพาะต่อการตรวจหาเชื้อ *B.bovis* เนื่องจากไม่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ *Babesia bigemina*, *Trypanosoma evansi*, *Anaplasma marginale*, *Theileria spp.* และโควิธีการตรวจสอบโดยวิธี semi-nestedPCR สามารถตรวจหาเชื้อ *B.bovis* จำนวน 10 ตัวในเลือด 10 ไมโครลิตรได้และการตรวจหาเชื้อในโคทดลองซึ่งทำให้ติดเชื้อพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อได้ในวันที่ 8 หลังการ

ติดเชื้อซึ่งเร็วกว่าการตรวจพบโดยกล้องจุลทรรศน์และไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้หลังจากการให้ยาเบเรนิล (3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1กิโลกรัม) เป็นเวลา 3 วัน

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Development of the Detection of *Babesia bovis* in Cattle by Polymerase Chain Reaction

Name Klaokwan Saengsombut

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Vichai Boonsaeng, Ph.D.

Prapon Wilairat, Ph.D.

Date of Graduation 22 February B.E 2539 (1996)

Abstract

Babesia bovis is a tick-transmitted protozoan parasite causing babesiosis in cattle. Because of its lethal pathogenicity to cattle, endemicity of babesiosis affects livestock industry in Thailand. Thus, development of procedures for detection the parasite is essential for appropriate therapeutic purposes and epidemiology studies.

A specific DNA probe for *B. bovis* detection, pMU-B1, has already been cloned. The 6.0 kb insert was subcloned into Bluescribe M13(-) vector at *Sau*3AI site. Sixteen clones which gave positive signals when probed with labeled *B.bovis* DNA were obtained from colony hybridization. pMU-BS7 was selected as a candidate because of its highest signal per insert size. pMU-BS7 contained 329 bp with 49.5 % G+C content. The amplification primers were designed from 329 bp fragment for the semi-nested PCR in order to enhance the specificity and sensitivity of *B.bovis* detection. The amplification product of outer (BV2 and BV3) and inner pairs (BV1 and BV2) were 182 bp and 155 bp, respectively. The assay was specific for *B.bovis* since no amplification was detected with *Babesia bigemina, Trypanosoma evansi, Anaplasma marginale, Theileria sp.*, or bovine leukocyte DNA. Using this semi-nested PCR method, the limit of sensitivity

of detection of *B.bovis*-infected blood in ethidium bromide stained agarose gel was 0.0002% parasitemia, and using DNA hybridization was down to 0.00002 % parasitemia, which is equivalent to 10 parasites in 10 μl blood. In an experimentally infected cow, parasites were detected by the semi-nested PCR method (ethidium bromide stained agarose gel) at days 8 post-infection, 2 days earlier than microscope examination, and could not be detected 3 days after treatment of the cow with Berenil (3 mg/Kg body weight).

Copyright by Mahidol University