



**ESTABLISHMENT OF SHORT-TERM *IN VITRO* CULTIVATION  
OF THAI ISOLATE *THEILERIA* SP. FOR SCREENING  
OF ANTI-THEILERIAL SUBSTANCES**

**Lt. CHANUTREE KERDMANEE, RTN**

อธิบดีมหาวิทยาลัย  
จาก  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2000  
ISBN 974-665-122-6  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

TH  
CA592  
2000  
C.2

b10104185  
.j12942807

4036434 SCMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY ; M.Sc. (MICROBIOLOGY)

KEY WORDS : *IN VITRO* CULTURE / THEILERIA PARASITE

ANTI-THEILERIALS

CHANUTREE KERDMANEE : ESTABLISHMENT OF SHORT-TERM *IN VITRO* CULTIVATION OF THAI ISOLATE *THEILERIA* SP. FOR SCREENING OF ANTI-THEILERIAL SUBSTANCES. THESIS ADVISORS: PEERAPAN TAN-ARIYA, Ph.D., NOPPORN SARATAPHAN, D.V.M., KOSUM CHANSIRI, Ph.D., WITAYA THAMAVIT, D.V.M., 146 p. ISBN 974-665-122-6

The purpose of this study was successful short-term *in vitro* cultivation of erythrocytic stage of Thai isolate *Theileria* parasite.

Of the four types of culture media used in the experiment, M199 supplemented with 40% fetal bovine serum (FBS) was proved to be the best culture medium for this purpose. The mean percentage of living parasites obtained by using this medium was significantly higher than in other culture media, i.e., M199+fetal calf serum (FCS), RPMI 1640+FBS and RPMI 1640+FCS ( $p < 0.05$ ). In addition, all forms of parasites, i.e., ring, match, 2 piroplasm, 3 piroplasm and 4 piroplasm (quadruplet form) were present in significant number in this type of medium after 72 hours of cultivation. However, the optimal growth and development of parasite indicated by the mean percentage of parasitized cells with living parasite and multiplied piroplasm form were observed during H24 to H48. The optimal percentage of starting parasitemia and cell suspensions was found to be ranged from 4.5%-18% and 10%-12.5%, respectively. Under these optimal growth conditions, the short-term *in vitro* cultivation was applied for assessment of anti-theilerial activities of four anti-hemosporozoal drugs and seven medicinal plant extracts using both microscopic and radioisotopic methods. Only chloroquine (CQ), quinine (QN) and *Vernonia cinerea* stems extract were demonstrated to possess an inhibitory effect against Thai isolate *Theileria* parasite, though their 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) values were much higher than those previously reported with Japanese isolates. There was no significant difference between the  $IC_{50}$  values of CQ, QN and *V. cinerea* stems extract from both methods (CQ: 13.09 vs 12.00  $\mu$ M; QN: 285.96 vs 260.00  $\mu$ M; *V. cinerea* stems extract: 888.61 vs 745.00  $\mu$ g/ml) ( $p = 0.256$ ;  $p = 0.065$ ;  $p = 0.175$ ).

Based on these results, this established a short-term *in vitro* culture method as being very meaningful for further studies, e.g., screening of anti-theilerial agents or ongoing research involving the erythrocytic stage of *Theileria* parasite.

4036434 SCMI/M: สาขาวิชา : จุลชีววิทยา ; วท.ม. (จุลชีววิทยา)

เรือเอกหญิง ชนตรี เกิดมณี: ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อไรเลเรีย เพื่อการตรวจกรองหาสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ (ESTABLISHMENT OF SHORT-TERM *IN VITRO* CULTIVATION OF THAI ISOLATE *THEILERIA* SP. FOR SCREENING OF ANTI-THEILERIAL SUBSTANCES) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พิรพรรณ ดันอารีย์, ป.ร.ค., นพพร ศรราชพันธุ์, D.V.M., โกสม จันทศิริ, Ph.D., วิทยา ธรรมวิทย์, D.V.M., 146 หน้า. ISBN 974-665-122-6

จากการศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบระยะสั้นของไรเลเรียระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงสายพันธุ์ไทยในห้องปฏิบัติการเป็นครั้งแรก ผลจากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ RPMI 1640+fetal calf serum (FCS), RPMI 1640+fetal bovine serum (FBS), M199+FCS และ M199+FBS พบว่าเปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่มีชีวิตใน M199+FBS มีค่าสูงกว่าผลที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น และหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม. สามารถตรวจพบเชื้อได้ครบทุกระยะ ซึ่งได้แก่ ระยะวงแหวน, ไม้ขีดไฟ, 2 จุด, 3 จุด และ 4 จุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยเพิ่มเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อและติดตามผลเป็นเวลา 120 ชม. พบว่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อที่มีชีวิตมีค่ามากที่สุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 24-48 ชม. และเมื่อทำการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ parasitemia และเปอร์เซ็นต์ cell suspension ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่าอยู่ในช่วง 4.5% - 18% และ 10% - 12.5% ตามลำดับ จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเหมาะสมดังกล่าว ทำให้ปริมาณของเชื้อที่มีชีวิตมากขึ้น และมีเชื้ออยู่ครบทุกระยะ ในการศึกษาตรวจกรองหาสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไรเลเรียของยาด้านสไปโรซัวในเลือด 4 ชนิดและสารสกัดจากสมุนไพร 7 ชนิด โดยใช้เชื้อไรเลเรียสายพันธุ์ไทยที่เพาะเลี้ยงได้ และทำการตรวจสอบโดยวิธีนับเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์และวิธี radioisotope พบว่า คลอโรควิน, ควินินและสารสกัดจากต้นหญ้าดอกขาวเท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไรเลเรีย แม้ว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อไรเลเรียได้ 50% ( $IC_{50}$ ) ของคลอโรควิน, ควินินและสารสกัดจากต้นหญ้าดอกขาว สูงกว่ารายงานที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์ญี่ปุ่น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่า  $IC_{50}$  ของสารทั้ง 3 ชนิด จาก 2 วิธีพบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (คลอโรควิน: 13.09 vs 12.00  $\mu$ M; ควินิน: 285.96 vs 260.00  $\mu$ M; สารสกัดจากต้นหญ้าดอกขาว : 888.61 vs 745.00  $\mu$ g/ml) ( $p=0.256$ ;  $p=0.065$ ;  $p=0.175$ )

จากการศึกษาครั้งนี้ชี้บ่งว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อไรเลเรียแบบระยะสั้นในห้องปฏิบัติการสามารถนำไปใช้ในการศึกษาหายาด้านเชื้อไรเลเรียสายพันธุ์ไทยได้และยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อไรเลเรียที่ต้องใช้เชื้อระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดงอีกด้วย