Thesis Title *In vitro* cultivation of *Dirofilaria immitis*

Author Miss Narissara Suwan

M.Sc. Parasitology

Examining Committee:

Assoc. prof. Wej Choochote Chairman

Assoc. prof. Dr.Charin Chesdapan Member

Assoc. prof. Dr.Yupha Rongsriyam Member

Abstract

The purposes of this study were to search for the suitable medium and technique for *in vitro* cultivation of *Dirofilaria immitis*, and to study the *in vitro* development and survival of *D. immitis* in the invertebrate and vertebrate phase. The materials and methods that were used to conduct this study were modified from the methods described previously, especially, by Nayar and others in 1991 for the invertebrate phase and by Riberu and others in 1990 for the vertebrate phase.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In the invertebrate phase, 8-day-old larvae within Malpighian tubules and 9-day-old larvae (early second stage larvae) were removed from mosquitoes surface sterilized by using 70% alcohol. Before putting into the media, they were centrifuged 2 times in Hanks' balanced salt solution (HBSS) with a mixture of antimicrobial agents. The larvae could survive, grow and develop into third stage larvae in a flask containing culture medium. The optimal culture medium were either a 1:1 (v/v) mixture of Grace's insect cell culture medium (G) and Schneider's *Drosophila* medium (S) supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (FBS), 2x mixture of antimicrobial agents, and 25 Mm HEPES with pH adjusted to 7.0, or a 1:1 (v/v) mixture of NCTC-135 (N) and Iscove's modified Dulbecco's medium (I) supplemented with 5% FBS, 2x mixture of antimicrobial agents, and 25 mM HEPES with pH adjusted to 7.0. Morphology and development of third stage larvae *in vitro* was similar to that seen in third stage larvae in mosquitoes. The mean length and mean width of third stage larvae in the mosquito were 957 μm and 26.40 μm, respectively. The mean length of living third stage larvae in GS supplemented with 5% FBS and NI supplemented with 20% FBS were 1041.21 μm and 1057.58 μm, respectively. The mean width of living third stage larvae in GS supplemented with 5% FBS and NI supplemented with 20% FBS were 27.91 μm and 28.45 μm, respectively. Comparison between *in vitro* and *in vivo* third

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

stage larvae showed that the mean length and width of the living third stage larvae in both media were significantly greater than the third stage larvae from mosquitoes ($P < 0.05$).

In the vertebrate phase, third stage larvae of *D. immitis* obtained from laboratory-infected mosquitoes grew and molted to the fourth stage, but did not molted to the fifth stage *in vitro* when cultures were terminated at day 20. The culture medium which supported growth and development consisted of a 1:1 (v/v) mixture of N and I medium supplemented with 20% FBS, 2x mixture of antimicrobial agents, and 25 mM HEPES with pH adjusted to 7.0 at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 in air. After 72 hours of culture, 70% of larvae had developed to the fourth stage within the third stage cuticle and begun to molt. After 96 hours 95% of larvae had complete ecdysis with morphology and development similar to that seen in *D. immitis* in the dog. The mean length of fourth stage larvae grown to 20 days postincubation increased 1.51 times from that of the third stage larvae from the mosquito.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

These results suggested that in the invertebrate phase, early second stage *D. immitis* larvae developed to the third stage larvae under optimal condition in a culture medium and can be utilized for the study of the physiology, biology, biochemistry and pharmacology of this stage. In the vertebrate phase, this culture system will provide an important tool for biochemical, immunological, physiological and biological studies.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนหนอนพยาธิ ไดโรฟิลาเรีย อิมมิติส (Dirofilaria immitis)

ชื่อผู้เขียน นางสาวนริศรา สุวรรณ
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาปรสิตวิทยา
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :
รองศาสตราจารย์ เวช ชูโชติ
รองศาสตราจารย์ ดร. ชรินทร์ เจษฎาพันธ์
รองศาสตราจารย์ ดร. ยุพา รองศรีแย้ม

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อหาอาหารเพาะเลี้ยงและเทคนิคสำหรับการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนหนอนพยาธิ ไดโรฟิลาเรีย อิมมิติส (Dirofilaria immitis) และศึกษาถึงการเจริญและการรอดชีวิตของหนอนพยาธิในหลอดทดลอง ทั้งในช่วงที่เกี่ยวกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate phase) และในช่วงที่เกี่ยวกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate phase) อุปกรณ์และวิธีทดลองในช่วงที่เกี่ยวกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังดัดแปลงจากวิธีที่อธิบายโดย Nayar และคณะ ในปี 1991 และในช่วงที่เกี่ยวกับสัตว์มี กระดูกสันหลังได้ดัดแปลงจากวิธีที่อธิบายโดย Riberu และคณะ ในปี 1990

ในช่วงที่เกี่ยวกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ตัวอ่อนอายุ 8 วัน ที่อยู่ในมัลปิเกียน ทิวบูล (Malpighian tubules) และตัวอ่อนอายุ 9 วัน (ตัวอ่อนระยะที่ 2 เริ่มแรก) ถูกเก็บจากยุงซึ่งผิวของยุงได้รับการทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้อัลกอฮอล์ 70% จากนั้นนำตัวอ่อนมาปั่นล้าง 2 ครั้ง ในสารละลาย Hank's balanced salt solution (HBSS) ซึ่งมีส่วนผสมของยาต้านจุลชีพก่อนที่จะใส่ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง ตัวอ่อนสามารถมีชีวิตอยู่เจริญและพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 ได้ในขวดแก้วก้นโป่ง (flask) ซึ่งบรรจุอาหารเพาะเลี้ยงอยู่ อาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ได้แก่ ส่วนผสม 1:1 โดยปริมาตร ของ Grace's insect cell culture medium(G) กับ Schneider's Drosophila medium(S) เสริมด้วย Fetal bovine serum (FBS) 5% ซึ่งมีส่วนผสมของยาต้านจุลชีพ 2 เท่าและ HEPES 25 มิลลิโมล (mM) ซึ่งปรับ pH เท่ากับ 7.0 และอีกอันหนึ่งได้แก่ ส่วนผสม 1:1 โดยปริมาตรของ NCTC-135 medium(N)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กับ Iscove's modified Dulbecco's medium(I) เสริมด้วย FBS 20% ซึ่งมีส่วนผสมของยาต้านจุลชีพ 2 เท่าและ HEPES 25 มิลลิโมล (mM) ซึ่งปรับ pH เท่ากับ 7.0 ตัวอ่อนระยะที่ 3 ในหลอดทดลองมีรูปร่างและการพัฒนาเหมือนตัวอ่อนระยะที่ 3 ในตัวยุง ความยาวเฉลี่ยและความกว้างเฉลี่ยของตัวอ่อนระยะที่ 3 ในยุงเท่ากับ 957 ไมโครเมตร (μm) และ 26.40 ไมโครเมตร (μm) ตามลำดับ ความยาวเฉลี่ยของตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่มีชีวิตอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง GS เสริมด้วย FBS 5% และ NI เสริมด้วย FBS 20% เท่ากับ 1,041.21 ไมโครเมตร (μm) และ 1,057.58 ไมโครเมตร (μm) ตามลำดับ ความกว้างเฉลี่ยของตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่มีชีวิตอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง GS เสริมด้วย FBS 5% และ NI เสริมด้วย FBS 20% เท่ากับ 27.91 ไมโครเมตร (μm) และ 28.45 ไมโครเมตร (μm) ตามลำดับ

สำหรับช่วงที่เกี่ยวกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง ตัวอ่อนระยะที่ 3 ของหนอนพยาธิ ไดโรฟิลาเรีย อิมมิติส จากยุงที่ได้รับการเพาะเลี้ยงหนอนพยาธิในห้องทดลอง เจริญและลอกคราบไปสู่ระยะที่ 4 ได้ แต่ไม่ลอกคราบไปสู่ระยะที่ 5 ในหลอดทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง อาหารเพาะเลี้ยงที่ทำให้ตัวอ่อนหนอนพยาธิฟิลาเรียชนิดนี้เจริญได้แก่ ส่วนผสม 1:1 โดยปริมาตรของ N medium กับ I medium เสริมด้วย FBS 20% 2 เท่าของส่วนผสมของยาต้านจุลชีพและ 25 mM HEPES ซึ่งปรับ pH เท่ากับ 7.0 ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศ CO_2 5% ผสมกับอากาศ หลังจากเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง พบว่ามีตัวอ่อนระยะที่ 4 ซึ่งอยู่ในคราบของระยะที่ 3 อยู่ 70% และเริ่มมีการลอกคราบ เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 96 ชั่วโมง พบว่ามีตัวอ่อนลอกคราบสมบูรณ์เป็นระยะที่ 4 อยู่ 95% ซึ่งมีรูปร่างและการเจริญเหมือนในสุนัข ความยาวเฉลี่ยของตัวอ่อนระยะที่ 4 ในวันที่ 20 หลังการเพาะเลี้ยง เพิ่มขึ้นเป็น 1.51 เท่าของตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่ได้จากยุง

จากผลการทดลองที่ได้นี้เสนอว่า ในช่วงที่เกี่ยวกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งตัวอ่อนหนอนพยาธิไดโรฟิลาเรีย อิมมิติสระยะที่ 2 เริ่มแรก พัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในอาหารเพาะเลี้ยง จะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาด้านสรีรวิทยา ชีววิทยา ชีวเคมีและเภสัชวิทยาของตัวอ่อนระยะนี้ ส่วนในช่วงที่เกี่ยวกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง ระบบการเพาะเลี้ยงนี้จะเป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับการศึกษาทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา สรีรวิทยาและชีววิทยาของหนอนพยาธิชนิดนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved