1. ชุดโครงการวิจัย : สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การผลิตและการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของค็อคซิเดียนโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตสารชีวินทรีย์กำจัดหนู

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Production and methods to store the sporocysts of *Sarcocystis singaporensis* using as stock for production of biological agent control of rodents.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : วิชาญ วรรธนะไกวัล กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ปราสาททอง พรหมเกิด ดาราพร รินทะรักษ์ สมเกียรติ กล้าแข็ง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ : การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองหาเปอร์เซนต์การมีชีวิตและเปอร์เซนต์การตายของหนูทดลองที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 ช่วงเวลา ได้แก่ 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน โดยแบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย ซึ่งการทดลองย่อยที่ 1 เป็นการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ในน้ำดื่มสะอาดเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาในสารละลายเกลือ PBS 1% ที่อุณหภูมิ 4°c พบว่าเมื่อทำการเก็บรักษาระยะเวลานานสองปีขึ้นไป ไม่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ เหมือนกันทั้งสองวิธีและมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ที่เก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% เท่ากับ 97.82, 81.58, 68.62, 67.62, 39.84, 16.48 และ 97.72, 88.18, 79.34, 74.96, 52.74, 30.94 ตามลำดับ และพบว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองย่อยที่ 2 ซึ่งเป็นการเก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่เก็บรักษาโดยวิธีการปั่นล้างน้ำตาล (Sugar flotation) พบว่ามีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 95.57, 80.83, 77.07, 60.07, 53.40 และ 48.27 ตามลำดับ ในขณะที่การทดลองย่อยที่ 3 เป็นการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ในไนโตรเจนเหลว (N_2) พบว่าเมื่อทำการเก็บรักษาระยะเวลานานหนึ่งปีขึ้นไปนั้น ไม่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการศึกษาในครั้งนี้ได้วิธีการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่ทำให้สปอร์โรซีสต์มีชีวิตอยู่ได้และยังคงประสิทธิภาพใน การก่อโรค ทำให้หนูทดลองป่วยและ ตายได้ 100 % ที่ระยะเวลา 1 ปี และประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูทดลองนั้น จะลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเปอร์เซนต์การมีชีวิตของของสปอร์โรซีสต์

6. คำนำ : *Sarcocystis singaporensis* Zamen & Colley (1976) เป็นปรสิตโปรโตซัวที่มีความจำเพาะต่อสัตว์อาศัยได้แก่หนูและงูเหลือม พบแพร่ระบาดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งค้นพบโดยศาสตราจารย์ Zamen เป็นครั้งแรกในประเทศสิงคโปร์ การขยายพันธุ์ของปรสิตชนิดนี้ภายในเซลล์บุผิวลำไส้ของงูเหลือม (*Python reticulatus*) เป็นแบบมีเพศ ภายหลังจากที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแล้วผนังเซลล์จะถูกสร้างขึ้นมาห่อหุ้มไซโกต (Zygote) และพัฒนาเป็นโอโอซีสต์ (Oocyst) ซึ่งในขั้นตอนนี้เป็นการสร้าง 2 สปอร์โรซีสต์ (Sporocysts) ใน 1 โอโอซีสต์ โดยใน 1 สปอร์โรซีสต์นั้นประกอบไปด้วย 4 สปอร์โรซอยด์

(Sporozoites) (Levine, 1986 และ Dubey และคณะ, 1989) ระยะสปอร์โรซอยด์ (Infective sporozoites) เป็นระยะที่พร้อมสำหรับการติดเชื้อ ซึ่งสปอร์โรซีสต์นั้นจะถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมพร้อมกับมูลของงูเหลือม ซึ่งสปอร์โรซีสต์นั้นสามารถทนทานอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในธรรมชาติได้เป็นเวลานาน จนกว่าจะเจอสภาวะที่เหมาะสมจึงพัฒนาเข้าสู่ระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในสัตว์อาศัยตัวกลางต่อไป

เมื่อสัตว์อาศัยตัวกลางของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ได้แก่หนูหลายชนิดในสกุลหนูท้องขาว (*Rattus* spp.) และสกุลหนูพุก (*Bandicota* spp.) กินน้ำหรืออาหารที่ปนเปื้อน สปอร์โรซีสต์จากมูลงูเหลือมเข้าไป ก็ทำให้ได้รับปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้เข้าไปในร่างกาย หลังจากที่ สปอร์โรซีสต์เข้าไปในระบบทางเดินอาหารของสัตว์อาศัยตัวกลางแล้ว สปอร์โรซีสต์จะถูกย่อยสลายและปล่อยสปอร์โรซอยด์ที่อยู่ภายในออกมาในลำไส้ของสัตว์อาศัยตัวกลาง ภายใน 15 นาที (Dubey และคณะ, 1989) เมื่อสปอร์โรซอยด์ถูกปล่อยออกมา จะเริ่มพัฒนาและเติบโตในเยื่อบุผิวลำไส้ และเกิดการพัฒนาครั้งที่ 1 ของระยะ Merogony บริเวณผนังหลอดเลือดแดงเข้าสู่ระยะ Schizonts และเริ่มพัฒนาเป็น Meronts และ Merozoites ตามลำดับ ในการพัฒนาครั้งที่ 2 ของระยะ Merogony เกิดขึ้นในบริเวณผนังหลอดเลือดฝอย และปล่อย Merozoites จาก Schizonts เข้าสู่กระแสเลือด (Dubey และคณะ, 1989) หลังจากนั้นเข้าสู่เนื้อเยื่อประสาท หัวใจและอวัยวะต่างๆ และพัฒนาเป็น Metrozytes ตามลำดับ หลังจากการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนหลายๆครั้งของ Metrozytes จะมีการสร้างซีสต์ (Sarcocysts) ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโต ภายในมี Bradizoites บรรจุอยู่ ในระยะนี้เป็นระยะที่พร้อมเข้าสู่ร่างกายของสัตว์อาศัยสุดท้าย (Gardiner และคณะ, 1985) ซึ่งก็คืองูเหลือมโดยฝังตัวตามอวัยวะต่างๆและกล้ามเนื้อทั่วร่างกายของหนูในสกุลหนูท้องขาวและสกุลหนูพุก เมื่อหนูที่ปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้อาศัยอยู่ ถูกกินเป็นอาหารโดยสัตว์ผู้ล่าตามธรรมชาติ วงจรชีวิตของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ก็กลับมาเริ่มต้นเป็นวงจรชีวิตใหม่อีกครั้ง

การใช้ปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ซึ่งเป็นระยะที่ทำให้หนูติดเชื้อ เพื่อผลิตเป็นเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูนั้น มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้มีความจำเพาะต่อหนูสกุลหนูท้องขาวและหนูพุกเท่านั้น (ยุวลักษณ์ และคณะ 2539a, ยุวลักษณ์ และคณะ 2539b, ยุวลักษณ์ และคณะ 2540 และ Jakel และคณะ, 1996) การผลิตขยายปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ในงูเหลือมติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ทำให้เชื้อโปรโตซัวที่ได้อ่อนแอลง และไม่สามารถทำให้หนูติดเชื้อป่วยตายได้ จึงจำเป็นต้องมีการดักหนูติดเชื้อโปรโตซัวจากธรรมชาติมาให้งูเหลือมกินเป็นอาหาร เพื่อเพิ่มศักยภาพของสปอร์โรซีสต์ในการทำให้เกิดโรคที่รุนแรงต่อหนู ซึ่งทำให้กระบวนการผลิตสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์และเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูที่มีศักยภาพสูงขาดความสม่ำเสมอ ไม่ต่อเนื่อง

นอกจากนี้ยังพบว่าหนูติดเชื้อโปรโตซัวจากธรรมชาติ โดยมากประมาณ 90% มีโปรโตซัวชนิดอื่นๆพบปะปนอยู่ด้วย (ยุวลักษณ์ และคณะ, 2541) ทำให้ได้เชื้อปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคกับหนูทดลองที่ไม่เท่ากัน อย่างไรก็ดีสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์บางหลอดที่ใสสะอาดและเก็บรักษาในตู้เย็นนาน 6 - 7 เดือน และนำมาใช้ผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูนั้น ยังคงมีศักยภาพสูงในการทำให้หนูป่วยตายได้ถึง 100% (ยุวลักษณ์ และคณะ, 2542) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Beaver และ Maleckar, 1981 ได้รายงานว่าในมูลงูเหลือมมิได้มีเฉพาะสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* เพียงอย่างเดียว แต่ยังพบสปอร์โรซีสต์

S. vilivillosi และ *S. zamani* และสปอร์โรซีสต์เหล่านี้ที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ประมาณ 1-2 ปี ยังคงมีชีวิตและความรุนแรงในการทำให้หนูติดเชื้อป่วยและตายได้

ดังนั้นการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่มีศักยภาพสูงในน้ำเปล่าหรือในสารละลายเกลือ PBS 1% นั้นสามารถรักษาการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ได้ระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น ด้วยเหตุนี้เองการศึกษาครั้งนี้ จึงต้องการทราบเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่อหนูสูง สามารถทำให้โปรโตซัวมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานานและยังคงประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูได้ เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. มูลงูเหลือม
2. ชุดสีย้อม Nucleic acid (QIAGEN, Live/Dead backlight viability kit)
3. น้ำตาลซูโครส (Sucrose)
4. เครื่องปั่น (Centrifuge) Hettich รุ่น universal 16A
5. น้ำเกลือ PBS 1% (Phosphate Buffer Saline)
6. Blood counting chamber
7. หลอดปั่นขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร และ Cryotubes
8. สารเคมีได้แก่ NaCl (Sodium chloride), KCl (Potassium chloride), $NaHPO_4$ (Sodium Hydrogen Phosphate), KH_2PO_4 (Potassium dihydrogen Phosphate), Tween80, NaOCl (Sodium Hypochlorite), Trypsin, อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI medium, FBS (Fetal Bovine Serum), DMSO (Dimethyl sulfoxide) และน้ำดื่มบริสุทธิ์
9. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยายสูง (Light microscope)
10. ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด
11. Auto pipette และ Tips
12. หนูท้องขาวทดลอง (*Rattus rattus*)
13. กรงทดสอบหนู
14. ถังไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen tank)
15. ที่ให้อาหารโดยตรงจากปากสู่กระเพาะ (Feeding tube)

- วิธีการ การศึกษาครั้งนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองย่อย ดังนี้

<u>การทดลองย่อยที่ 1</u> เปรียบเทียบการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS

วางแผนการทดลองแบบ 2x5 factorial in CRD มี 5 ซ้ำ (5 เชื้อ) ซ้ำละ 3 หลอด แต่ละหลอดมีสปอร์โรซีสต์แขวนลอยอยู่ $1x10^6$ ซีสต์ ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 คือ สารละลายในการเก็บรักษามี 2 ระดับ คือ

1. น้ำดื่มสะอาด
2. สารละลายเกลือ PBS

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์มี 6 ระดับ คือ

1. 6 เดือน
2. 1 ปี
3. 2 ปี
4. 2 ปี 6 เดือน
5. 3 ปี
6. 3 ปี 6 เดือน

ทำการตรวจสอบการมีชีวิตของโปรโตซัวทั้งสองปัจจัยโดยการใช้สีย้อม Nucleic acid และศึกษาภาพความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อโปรโตซัวโดยวิธี Bioassay กับหนูท้องขาวที่ 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน

การบันทึกข้อมูล

1. เปอร์เซนต์การมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัว
2. เปอร์เซ็นต์การตายของหนู

<u>การทดลองย่อยที่ 2</u> การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวโดยวิธี Sugar flotation

วางแผนการทดลอง แบบ CRD มี 3 ซ้ำ (3 เชื้อ) ซ้ำละ 3 หลอด หลอดละ 1 ul 6 กรรมวิธี คือ

1. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 6 เดือน
2. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 1 ปี
3. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 2 ปี
4. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 2 ปี 6 เดือน
5. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 3 ปี
6. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10°C นาน 3 ปี 6 เดือน

การเตรียมสารละลาย

สารละลาย A: Sheather's solution: PBS +1% tween 80 (1:4)

สารละลาย B: Sheather's solution: PBS +1% tween 80 (1:2)

ทำการเตรียมตัวอย่างโดยการปั่นล้างมูลงูเหลือมจนได้สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์และนับจำนวนสปอร์โรซีสต์ที่ได้ ใส่สารละลาย B 15 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดปั่นขนาด 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นใส่สารละลาย A 10 มิลลิลิตร และใส่สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ไว้ด้านบนสุดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการปั่นตกตะกอนที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ถ่ายรินส่วนชั้นของสปอร์โรซีสต์ที่อยู่เหนือตะกอน ลงในหลอดปั่นหลอดใหม่ขนาดเดียวกัน 2 หลอด ในปริมาตรที่เท่ากัน ปั่นตกตะกอนอีกครั้ง หลังจากนั้นดูดสารละลายที่อยู่เหนือตะกอน

ออกช้าๆ ให้แต่ละหลอดเหลือสารละลายประมาณ 12.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารแขวนลอยทั้งสองผสมลงในหลอดเดียวกันและนับจำนวนสปอร์โรซีสต์ที่ได้เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่เก็บเกี่ยวได้ ที่อุณหภูมิ 4-10 °C ทำการตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ โดยการใช้สีย้อม Nucleic acid ทุก 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน

การบันทึกข้อมูล

เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัว

<u>การทดลองย่อยที่ 3</u> การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวในไนโตรเจนเหลว

ทำการทดลองโดยสลายผนังเซลล์ของสปอร์โรซีสต์จำนวน 200,000 ซีสต์ เพื่อแยกแต่ละเซลล์โปรโตซัว (Sporozoits) ออกมา แล้วนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน จากนั้นนำเซลล์โปรโตซัวออกมาทดสอบการสร้างซีสต์ในกล้ามเนื้อลำตัวหนูท้องขาว

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ซ้ำ (4 เชื้อ) ซ้ำละ 1 ตัว 6 กรรมวิธี (ระยะเวลาการเก็บรักษา) คือ

1. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 6 เดือน
2. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 1 ปี
3. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 2 ปี
4. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 2 ปี 6 เดือน
5. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 3 ปี
6. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 3 ปี 6 เดือน

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ ลงในหลอดปั่น 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย NaOCL 8% 5 มิลลิลิตร (น้ำกลั่น 4.6 มิลลิลิตร และ NaOCL 0.4 มิลลิลิตร) และเขย่าสารละลายทันทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 4 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น ละลายตะกอนเซลล์ใน RPMI medium แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย Pepsin ลงไปในตะกอนเซลล์ แล้วเขย่าทันที แล้วทำการย่อยที่ 37°c เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และเติมสารละลาย trypsin ลงไปในตะกอนเซลล์ แล้วเขย่าทันที ทำการย่อยที่ 37°c เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง จากนั้นทำการเช็คลักษณะสปอร์โรซอยด์โดยกล้องจุลทรรศน์และนำไปปั่นเหวี่ยงอีก 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ด้วย RPMI medium และนำไป ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ด้วย FBS ตามลำดับ แล้วทำการนับจำนวนสปอร์โรซอยด์ใน Hemocytometerโดยกล้องจุลทรรศน์ แล้วนำสปอร์โรซอยด์แช่น้ำแข็ง สำหรับการเก็บ Freezing ผสม RPMI 840 มิลลิลิตร , DMSO (10%) 120 ไมโครลิตร และ FBS (20%) 240 ไมโครลิตร แล้วทำการเก็บเซลล์ที่ได้ลงใน Cryotubes หลังจากนั้นเก็บลงใน Liquid nitrogen

การบันทึกข้อมูล

เปอร์เซ็นต์การตายของหนู

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้นตุลาคม 2553 สิ้นสุดกันยายน 2557

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

<u>การทดลองย่อยที่ 1</u> เปรียบเทียบการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน ในน้ำดื่มสะอาดมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 97.82, 81.58, 68.62, 67.62, 39.84, 16.48 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ระยะเวลา 1 ปี, 2 ปี และ 2 ปี 6 เดือน ไม่แตกต่างกันทางสถิติซึ่งน้อยกว่าและแตกต่างกับค่าเฉลี่ยที่ระยะเวลา 6 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% อีกทั้งค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ระยะเวลา 1 ปี, 2 ปี และ 2 ปี 6 เดือน มากกว่าและแตกต่างกับค่าเฉลี่ยที่ระยะเวลา 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ส่วนการเก็บรักษาในสารละลายเกลือ PBS 1% มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 97.72, 88.18, 79.34, 74.96, 52.74, 30.94 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ระยะเวลา 6 เดือน, 1 ปี และ 2 ปี นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ระยะเวลา 6 เดือนและ 1 ปี มากกว่าและแตกต่างกับค่าเฉลี่ยที่ระยะเวลา 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ในขณะที่การเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% ที่ระยะเวลานานสองปีขึ้นไปนั้น ไม่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้เช่นเดียวกันในทั้งสองวิธี โดยค่าเฉลี่ยในการทำให้หนูทดลองป่วยตายที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี และ 2 ปี นั้นเท่ากับ 100, 100, 45 และ 100, 70, 35 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาดังนี้

Baver และ Maleckar, 1981 รายงานว่า ความแข็งแรงและความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคโดยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* นั้นขึ้นกับการเก็บรักษา โดยปกติแล้วสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* สามารถเก็บรักษาในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4-10°c ได้นาน 2 ปีและยังสามารถทำให้หนูที่ได้รับสปอร์โรซีสต์เข้าไปเป็นโรคได้

Haefner, 1984 รายงานว่า จำนวนสปอร์โรซีสต์ที่เก็บรักษาไม่เกิน 4 อาทิตย์ จำนวนสปอร์โรซีสต์เพียง 200-300 สปอร์โรซีสต์และ 350-500 สปอร์โรซีสต์ สามารถทำให้หนูนอร์เวและหนูพุกใหญ่ติดเชื้อได้ตามลำดับ แต่ถ้าเก็บรักษานาน 4-6 เดือนไปใช้ พบว่าความแข็งแรงและความรุนแรงในการก่อโรคกับหนูจะลดลง ทำให้ต้องใช้สปอร์โรซีสต์มากขึ้นจึงจะทำให้หนูนอร์เวและหนูพุกใหญ่ติดเชื้อได้

Elsheikha และคณะ, 2004 ได้ทำการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ตั้งแต่ปี 1996-2002 ที่อุณหภูมิ 4 °c และนำมาทดสอบการมีชีวิตโดยการย้อมด้วย Propidium iodide (PI) พบว่า แม้ว่าสามารถเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ให้ยังคงมีชีวิตได้ที่อุณหภูมิ 4 °c เป็นเวลานาน 7 ปี แต่ไม่สามารถทำให้เกิดซีสต์ในหนูทดลองที่สัตว์อาศัยตัวกลางได้ ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ในโปรโตซัวสกุลนี้ไม่ได้สัมพันธ์กับการสร้างซีสต์ ในหนูทดลองที่เป็นสัตว์อาศัยตัวกลาง แต่ระยะเวลาและอายุของสปอร์โรซีสต์ เป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างซีสต์ในสัตว์อาศัยตัวกลาง ซึ่งเมื่อระยะเวลาและอายุของสปอร์โรซีสต์มากขึ้นส่งผลให้การสร้างซีสต์ในสัตว์อาศัยตัวกลาง ลดลงตามอายุของสปอร์โรซีสต์ที่มากขึ้น

จากรายงานผลงานวิจัยทั้ง 3 เรื่องนั้นแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูทดลองของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* และ *S. singaporensis* นั้นจะค่อยๆลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มมากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในการศึกษาครั้งนี้ และการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ไม่ได้สัมพันธ์กับการสร้างซีสต์ในหนูทดลองที่เป็นสัตว์อาศัยตัวกลาง อีกทั้งการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% ที่อุณหภูมิ 4-10 °c ซึ่งนับว่าเป็นระยะเวลาที่ค่อนข้างสั้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีที่มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานกว่ามาก ดังนั้นในการทดลองย่อยที่ 1 จึงสามารถสรุปได้ว่าสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์สามารถเก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% ได้นาน 2 ปี โดยที่ภายในระยะเวลา 1 ปี สปอร์โรซีสต์มีชีวิตอยู่ได้และยังคงประสิทธิภาพในการก่อโรค ทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ 100 % หากเก็บรักษามากกว่า 2 ปีขึ้นไป ไม่สามารถทำให้หนูติดเชื้อป่วยและตายได้

<u>การทดลองย่อยที่ 2</u> การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวโดยวิธี Sugar flotation

ผลจากการทดลองเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S.singaporensis* โดยวิธีการปั่นล้างน้ำตาล (Sugar flotation) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 95.57, 80.83, 77.07, 60.07, 53.40 และ 48.27 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ระยะเวลา 6 เดือน และ 1 ปี นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติซึ่งมากกว่าและแตกต่างกับค่าเฉลี่ยที่ระยะเวลา 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของ สปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่ทำการเก็บรักษาโดยวิธี Sugar flotation นั้นเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ค่อยๆลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่มากขึ้นเช่นเดียวกับวิธีการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ในการทดลองย่อยที่ 1 แม้ว่าการล้างน้ำตาลในการทดลองนี้สามารถทำให้สปอร์โรซีสต์ที่ได้นั้นมีความบริสุทธิ์สูงกว่าการปั่นล้างแบบธรรมดา แต่ก็ทำให้ปริมาณสปอร์โรซีสต์ที่สูญเสียไปกับการล้างมากด้วยเช่นกัน ทำให้ปริมาณความเข้มข้นของสปอร์โรซีสต์ไม่เพียงพอต่อระดับที่ทำให้หนูทดลองติดเชื้อป่วยและตายได้ (Lethal dose) 200,000 สปอร์โรซีสต์ สำหรับการหยอดลงในเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู 1 ก้อน

<u>การทดลองย่อยที่ 3</u> การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวในไนโตรเจนเหลว

ผลจากการทดลองเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen, N_2) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน พบว่า ในระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน และ 1 ปี สามารถทำให้หนูทดลองป่วยตายได้ทั้งหมด (100%) แต่เมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลามากกว่า 1 ปี นั้นไม่สามารถทำให้หนูทดลองที่ติดเชื้อป่วยและตายได้ ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยของ Fayer และ Nerod, 1996 ที่พบว่า ในน้ำที่ผ่านการเป็นน้ำแข็งแล้ว โอโอซีสต์ของโปรโตซัว *Cryptosporidium pavum* สามารถมีชีวิตและยังทำให้เกิดโรคได้และโอโอซีสต์จะมีชีวิตและมี Infectivity ที่ยาวนานขึ้น ถ้าอยู่ในสภาพอุณหภูมิต่ำมาก แต่เนื่องจากการทดลองในครั้งไม่ได้ทำการทดลองหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ที่มีสภาพทำให้น้ำเป็นน้ำแข็งเช่นเดียวกับการทดลองของ Fayer และ Nerod เนื่องจากการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ในไนโตรเจนเหลวนั้นต้องสลายสปอร์โรซีสต์ให้แตกออกมาเป็นสปอร์โรซอยด์ก่อน ดังนั้นเมื่อทำการย้อมสีเพื่อดูการมีชีวิตจึงไม่สามารถคำนวณกลับมาเป็นจำนวนสปอร์โรซีสต์ที่แท้จริงได้ อีกทั้งอาจเป็นไปได้ว่าโปรโตซัวที่ทำการทดลองนั้นเป็นคนละชนิดกันแม้ว่าจะเป็นโปรโตซัวในกลุ่ม Apicomplexa กลุ่มเดียวกัน (Hikosaki และคณะ, 2010) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารประกอบต่างๆภายในสปอร์โรซีสต์อาจแตกต่างกัน อีกทั้งการทดลองของ Fayer และ Nerod ไม่ได้เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ด้วยสาเหตุเหล่านี้จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่สอดคล้องกันก็อาจเป็นได้

ดังนั้นการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งเป็นวิธีการที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก ในการเติมไนโตรเจนเหลวลงถังเก็บทุก 2 เดือน อีกทั้งยังไม่สามารถทำให้สปอร์โรซีสต์คงประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูทดลองในระยะเวลานานมากกว่า 1 ปี ได้ จึงเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมในการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ให้คงประสิทธิภาพการก่อโรคในหนูได้

ด้วยเหตุนี้เองจึงกล่าวโดยสรุปได้ว่าการศึกษาในครั้งนี้ได้วิธีการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่ทำให้สปอร์โรซีสต์มีชีวิตอยู่ได้และยังคงประสิทธิภาพในการก่อโรค ทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ 100 % ที่ระยะเวลา 1 ปี แม้ว่าระยะเวลาการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ระยะเวลา 2 ปี นั้นสามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้แต่ประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูทดลองนั้น จะลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับเปอร์เซนต์การมีชีวิตของของสปอร์โรซีสต์

การเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอรีโรซีสต์ในน้ำดื่มสะอาดหรือในสารละลายเกลือ PBS 1% ซึ่งเป็นวิธีที่ทางกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตรฯ ใช้ในการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์อยู่ในปัจจุบันนี้ เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่ายและไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในมากนัก จึงเหมาะสำหรับใช้ในการเก็บรักษาเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่ทำเป็นงานประจำ ในการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู

อย่างไรก็ดีแม้ว่าการศึกษาครั้งนี้จะสิ้นสุดลงแต่ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ควรที่จะนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับงานวิจัย ต่อยอดสำหรับการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ต่อไป เพื่อทำให้สามารถเก็บรักษาหัวเชื้อสปอร์โรซีสต์ได้เป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้สามารถผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูที่มีประสิทธิภาพสูง นำไปสู่การควบคุมและลดปริมาณหนูศัตรูพืชแบบบูรณาการ

ร่วมกับวิธีการอื่นๆที่ไม่ใช้สารเคมี ทำให้สามารถป้องกันและกำจัดหนูศัตรูพืชรวมไปถึงหนูที่สร้างปัญหาในด้านต่างๆได้อย่างยั่งยืนและมีประสิทธิภาพ ไม่มีพิษตกค้างสู่สิ่งแวดล้อมเพื่อความปลอดภัยของมนุษย์และสิ่งแวดล้อมต่อไป

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ : การเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน เท่ากับ 97.82, 81.58, 68.62, 67.62, 39.84, 16.48 และ 97.72, 88.18, 79.34, 74.96, 52.74, 30.94 ตามลำดับ และเมื่อทำการเก็บรักษาระยะเวลานานสองปีขึ้นไปนั้น ไม่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้เหมือนกันทั้งสองวิธี

ส่วนการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* โดยวิธี Sugar flotation ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 95.57, 80.83, 77.07, 60.07, 53.40 และ 48.27 ตามลำดับ

ในขณะที่สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ระยะเวลานานหนึ่งปีขึ้นไปนั้นไม่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : นำไปประยุกต์ใช้ในการเก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ในการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู

11. คำขอบคุณ : ขอขอบคุณ คุณยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ที่เป็นผู้คิดงานวิจัยนี้ขึ้นมา อีกทั้งช่วยถ่ายทอดความรู้และเทคนิคต่างๆเกี่ยวกับปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* รวมถึงการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตรฯ ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด. 2539**a**. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูพุกใหญ่. รายงายผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 255-256.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด. 2539**b**. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูนอร์เวย์. รายงายผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 257.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ปราสาททอง พรหมเกิด กรแก้ว เสือสะอาด เสริมศักดิ์ หงส์นาค และทรงทัพ แก้วตา. 2540. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูนาใหญ่. รายงายผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 10-16.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ปราสาททอง พรหมเกิด เสริมศักดิ์ หงส์นาค ปิยาณี หนูกาฬ และ ทรงทัพ แก้วตา. 2541. การศึกษาโปรโตซัวที่เป็นปรสิตในหนูพุกศัตรูพืช. รายงายผลการวิจัย ปี 2541. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 102-103.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค T. Jaekel กรแก้ว เสือสะอาด ปราสาททอง พรหมเกิด และ ชูวิทย์ สุขปราการ. 2542. การใช้โปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ชีวินทรีย์กำจัดหนู ชนิดใหม่ เพื่อควบคุมหนูในประเทศไทย. 43 หน้า.

Beaver, P.C. and J.R.Maleckar. 1981. *Sarcocystis singaporensis* Zaman & Colley (1975) 1976. *Sarcocystis villivillosi* sp.p, and *Sarcocystis zamani* sp.n.: Development, morphology and persistence in the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. Journal of Parasitology. 67: 241-256.

Dubey, J. P., C.A. Speer and R. Fayer. 1989. Sarcocystosis of animals and man. Boca Raton, Florida: CRC Press. United States of America.

Elsheikha, H.M., A.J. Murphy and L.S. Mansfiled. 2004. Viability of *Sarcocystis neurona* sporocyst after long-term storage. Veterinary Parasitology. 123: 257-264.

Fayer, R. and T. Nerad. 1996. Effect of low Temperatures on Viability of *Cryptosporidium pavum* oocysts. Applied and Environmental Microbiology. 62: 1431-1433.

Gardiner, C.H., R. Fayer and J.P. Dubey. 1985. An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues. Agriculture Handbook number 651. United States Department of Agriculture.

Haefner, U and W. Frank. 1984. Host specificity and host range of the genus *Sarcocystis* in three snake-rodent life cycles. Zbl Bak Parasit Infec Hyg Orig. A 256, 296-299.

Hikosaka, K., N. Tsuji, Y. Watanabe, H. Kishine, T. Horii, I. Igarashi, K. Kita, K. Tanabe, N. Arisue, N.M. Palacpac, S. Kawazu and H. Sawai. 2010. Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. Molecular Biology. 27: 1107–1116.

Jaekel, T., H. Burgstaller and W. Frank. 1996. *Sarcocystis singaporensis* : Studies on host specificity, pathogenicity, and potential use as a biocontrol agent of wild rats. Journal of Parasitology. 82: 280-287.

Levine, N.D. 1986. The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) species. Journal of Parasitology. 72: 372-382.

13. **ภาคผนวก** :

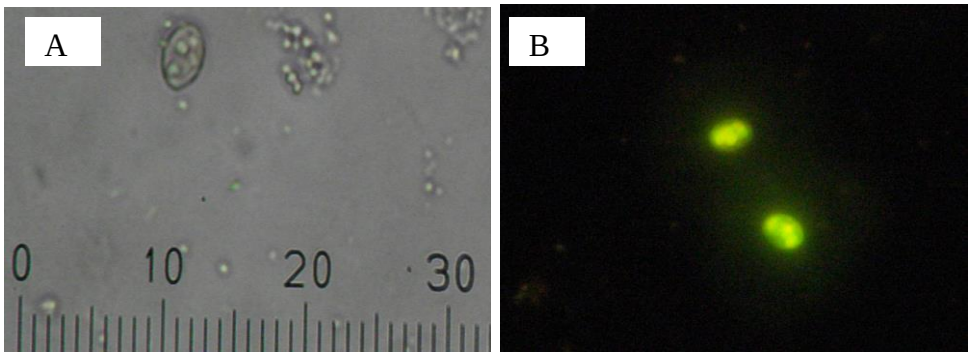

Figure 1 Sporocyst characterized of *S. singaporensis* at magnification 40x and figure (1A). The sporocyst of *S. singaporensis* stain with nucleic stain at magnification 40x was used to differentiate between unstained sporocysts; viable and stained; death (1B).

Table 1 The table showing the percentage of viable sporocysts of *S. singaporensis* maintained in clean drinking water.

Sporocyst samples	The percentage of viable sporocysts in clean drinking water							CV (%)
	0 day	6 month	1 Year	2 Year	2 Year 6 Month	3 Year	3 Year 6 Month	
S16	100	96.9	78.6	64.3	83.5	42.9	26.7	15.6
S162	100	99	69.2	50	66.7	28.6	15.9	
S54	100	100	80	81.3	84	36.4	7.6	
SM1	98.4	100	93.3	62.9	65.8	52.9	17.9	
SM2	100	93.2	86.8	84.6	38.1	38.4	14.3	
Means	99.68[a]	97.82[a]	81.58[b]	68.62[b]	67.62[b]	39.84[c]	16.48[d]	

[1/] = Means in column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT (Duncan's multiple new rang test).

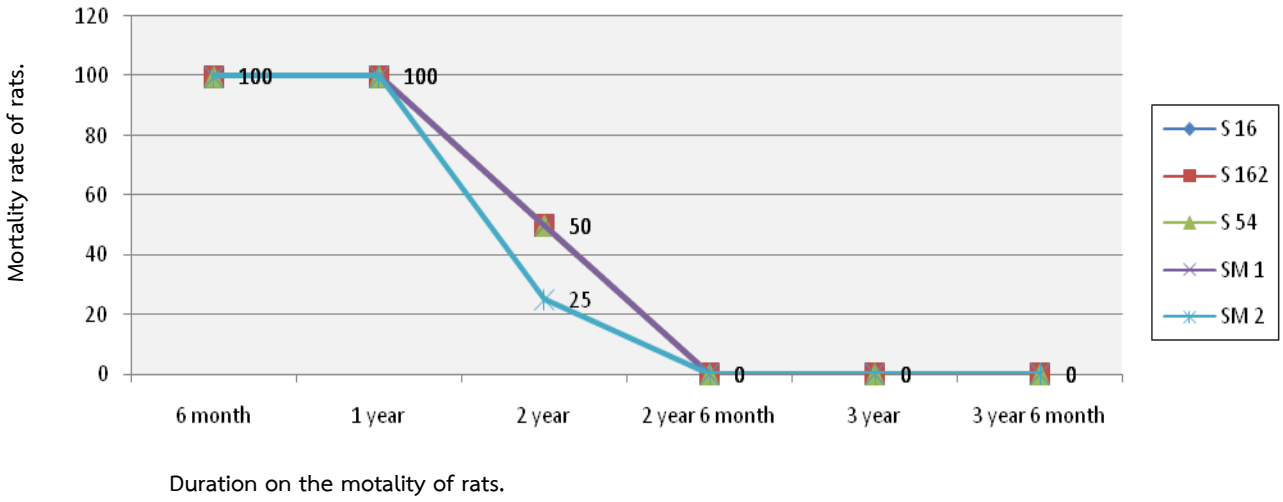

Figure 2 The graph showing the mortality rates of rats from sporocyst suspension of *S. singaporensis* maintained in clean drinking water.

Table 2 The table showing the percentage of viable sporocysts of *S. singaporensis* maintained in 1% PBS.

Sporocyst samples	The percentage of viable sporocysts in 1% PBS							CV (%)
	0 day	6 month	1 Year	2 Year	2 Year 6 Month	3 Year	3 Year 6 Month	
S16	100	93.8	80	82.4	68.8	76.5	45.3	12.9
S162	99.1	100	89.3	84.6	82.4	65.2	25.4	
S54	100	100	100	89.6	86.8	42.9	22.5	
SM1	100	96.4	88.2	78.1	66.7	33.6	28.1	
SM2	98	98.4	83.4	62	70.1	45.5	33.4	
Means	99.42[a]	97.72[a]	88.18[ab]	79.34[bc]	74.96[c]	52.74[d]	30.94[e]	

[1/] = Means in column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT (Duncan's multiple new rang test).

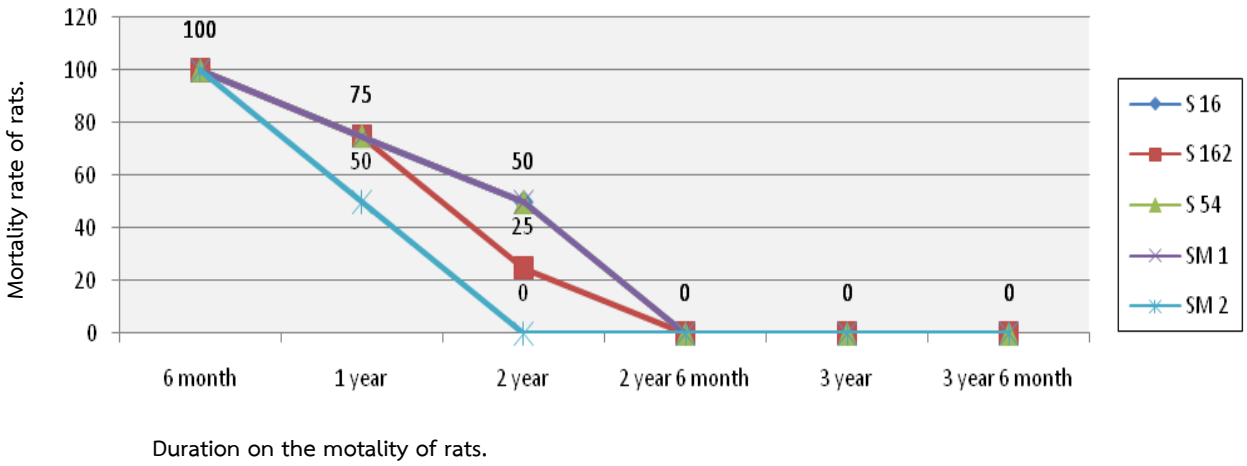

Figure 3 The Graph showing the mortality rates of rats from sporocyst suspension of *S. singaporensis* maintained in 1% PBS.

Table 3 The table showing the percentage of viable sporocysts of *S. singaporensis* maintained by sugar flotation method.

Sporocyst samples	The percentage of viable sporocysts maintained by sugar flotation method							CV (%)
	0 day	6 month	1 Year	2 Year	2 Year 6 Month	3 Year	3 Year 6 Month	
S42	100	98.2	90	85.6	76.1	71.2	53	14.1
S15	98.2	90.7	72.3	73.3	62.2	48.7	49.8	
S4	94.4	97.8	80.2	72.3	41.9	40.3	42	
Means	97.53[a]	95.57[ab]	80.83[ab]	77.07[bc]	60.07[cd]	53.4[d]	48.27[d]	

[1/] = Means in column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT (Duncan's multiple new rang test).

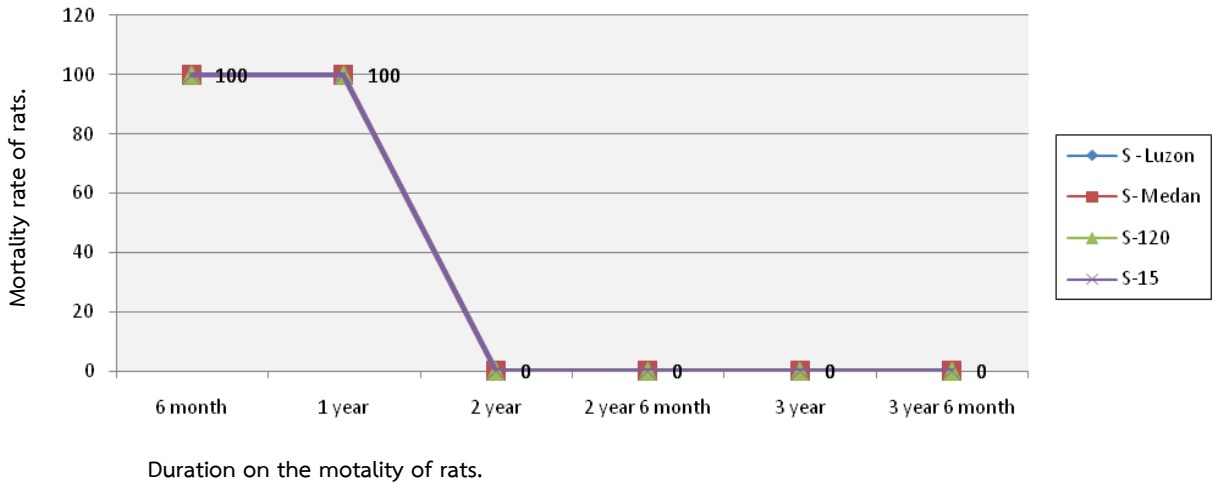

Figure 4 The graph showing the mortality rates of rats from sporocyst suspension of *S. singaporensis* stored in liquid nitrogen (N_2).