

ผลของโรคนีโอสปอโรซิสต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนม

Effect of neosporosis on reproductive performance of dairy cattle

จตุรพร ป็องกัน (Jaturaporn Pongkun)* ดร. อรัญ จันท์ลุน (Dr. Aran Chanlun) **

ดร. สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย (Dr. Suneerat Aiumlamai) *** ดร. ขวัญเกศ กนิษฐานนท์ (Dr. Kwankate Kanistanon)****

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาแบบไปข้างหน้าของผลของโรคนีโอสปอโรซิสต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนม จากฟาร์มโคนมขนาดใหญ่ 3 ฟาร์มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย เก็บตัวอย่างน้ำนมจากแม่โค 279 ตัว ทำการตรวจหาภูมิคุ้มกันในน้ำนมต่อเชื้อ *N. caninum* โดยใช้ชุดตรวจ *N. caninum* iscom ELISA kit ศึกษาผลของโรคต่อ วันคลอดถึงผสมเทียมครั้งแรก วันคลอดถึงวันผสมติด จำนวนครั้งของการผสมเทียมต่อการผสมติด ระยะห่างวันตกไข่ จำนวนโคที่มีประวัติการแท้ง และความถี่ของระยะห่างวันเป็นสัด ในภาพรวมโคที่ตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อโรคมียาจำนวน 35.1% (98 ตัวจาก 279 ตัว) และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างโคกลุ่มที่พบและไม่พบภูมิคุ้มกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติของดัชนีความสมบูรณ์พันธุ์ในสองกลุ่ม ($P>0.05$)

ABSTRACT

A Cohort study was conducted to access the effect of neosporosis on reproductive performance in dairy cows from 3 large scale dairy farms in Northeast and Central part of Thailand. Milk samples of 279 cows were collected, an *N. caninum* iscom ELISA kit was used to determine for presence of *N. caninum* antibodies. The effect of neosporosis on calving to first artificial insemination (days), calving to conception interval (days), number of services per conception, calving interval (days), abortion (number of cows) and interoestrous interval (number of frequency). Overall, 35.1% (98 of 279 cows) had positive antibodies to neosporosis. There were no significant different on reproductive parameters in the positive antibodies animals and negative antibodies animals ($P>0.05$).

คำสำคัญ : นีโอสปอโรซิส ความสมบูรณ์พันธุ์ โคนม

Key Words : Neosporosis, reproductive performance, dairy cow

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** อาจารย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาสัตวศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาสัตววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

โรคนีโอสปอโรซิส (Neosporosis) เกิดจากเชื้อโปรโตซัว *Neospora caninum* (*N. caninum*) เป็นเชื้อโปรโตซัวที่อาศัยอยู่ในเซลล์ พบครั้งแรกในสุนัขจากประเทศนอร์เวย์ ในปี 1984 (Bjerkas and Presthus., 1984) และตั้งชื่ออย่างเป็นทางการในปี 1988 นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อในสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น กระบือ แพะ แกะ ม้า สัตว์ป่า รวมทั้งในโค (Dubey et al., 1988) อาการที่สำคัญในสุนัขและโคคือกล้ามเนื้ออ่อนแรง และทำให้เกิดการแท้ง มีรายงานว่า การติดเชื้อ *N. caninum* จึงเป็นสาเหตุสำคัญของการแท้งโคเนื้อและโคนม (Dubey, 2003) ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจ โดยพบการแท้งพบได้ทุกระยะของการตั้งท้อง ส่วนมากพบการแท้งที่อายุการตั้งท้องประมาณ 5-6 เดือน (Anderson et al., 2000; Dubey and Schares, 2006) นอกจากนี้มีบางรายงานพบว่า ไม่มีความแตกต่างของระยะห่างวันตกไข่ จำนวนวันท้องว่างและจำนวนในโคที่พบและไม่พบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *N. caninum* ไม่แตกต่างกัน (Romeo et al., 2005) ในขณะที่บางรายงานกล่าวว่า การติดเชื้อนี้ทำให้วันท้องว่างยาวนาน (Waldner., 2001)

การติดเชื้อ *N. caninum* ในโคเท่าที่มีรายงานเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ vertical และ horizontal transmission ส่วนการติดเชื้อโดยทางอื่นๆ เช่น โดยการผสมพันธุ์ ยังไม่มีรายงานยืนยันแม้ว่าจะพบ DNA ของเชื้อ *N. caninum* ในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งโค (Ortega-Mora et al., 2003)

การตรวจวินิจฉัย *N. caninum* สามารถตรวจได้หลายวิธี โดยวิธีการที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือวิธีการตรวจทางซีรั่มวิทยา indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เนื่องจากมีความสะดวก แม่นยำ สามารถตรวจได้ครั้งละหลายๆ ตัวอย่างในเวลาเดียวกัน (Chanlun et al., 2006)

รายงานการพบภูมิคุ้มกันต่อโรคนี้ในประเทศไทย (Kashowasaki et al., 2001) พบในฟาร์มโคนมรายย่อยโดยการตรวจน้ำนมถึงรวมฟาร์ม ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบภูมิคุ้มกันต่อโรค 46% (102/22 ตัว) (Chanlun et al., 2002) และมีรายงานการตรวจแยกเชื้อนี้จากลูกโคที่แท้ง 1 ตัว จากทั้งหมด 12 ตัว (Kyaw et al., 2003)

การติดเชื้อ *N. caninum* นอกจากทำให้เกิดการแท้งแล้ว ยังพบว่าอาจเกิดปัญหาต่อความสมบูรณ์พันธุ์ได้ ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานของโรคผลกระทบของโรคต่อประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ที่ชัดเจน วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อศึกษา ผลของโรคนีโอสปอโรซิสต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนม โดยมีสมมุติฐานว่าโคที่พบโคที่พบภูมิคุ้มกันต่อโรค (ผลบวก) มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำกว่าโคที่ไม่พบภูมิคุ้มกัน (ผลลบ)

อุปกรณ์และระเบียบวิธีการวิจัย

แผนการทดลอง

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบไปข้างหน้า (Cohort study) ทำการศึกษาโคนมในฟาร์มขนาดใหญ่จำนวน 3 ฟาร์ม ที่ตั้งอยู่ในเขตพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ด นครราชสีมาและสระบุรี แม่โครีดนมลูกผสมพันธุ์ไฮสโตนีฟรีเซียน สายเลือดมากกว่า 87.5% จำนวน 279 ตัว ติดตามข้อมูลทางการสืบพันธุ์ ในแม่โคทุกตัวที่เข้าศึกษา เป็นระยะเวลา 2 ปี ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2549 ถึง กันยายน พ.ศ. 2551

การเก็บตัวอย่าง

เก็บน้ำนมถึงรวมฟาร์ม (Bulk milk) ของฟาร์มที่อยู่ในการศึกษานี้ เพื่อตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *N. caninum* เมื่อพบว่าภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ เก็บน้ำนมจากแม่โครีดนมทุกตัวในฟาร์มในวันที่เข้าฟาร์มครั้งแรก โดยเป็นตัวอย่างน้ำนมที่เก็บภายหลังการรีดนมเสร็จ (post-milking sample) ในม็อดรีดนมเย็น ประมาณ 20 มล./ตัว เก็บตัวอย่างในกล่องโฟมใส่น้ำแข็งรักษา

อุณหภูมิ 4-8°C นำตัวอย่างทั้งหมดเข้าห้องปฏิบัติการภายในวันที่ทำการเก็บ ทำการปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000×g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดเก็บตัวอย่างน้ำนมส่วนที่เป็นหางนม (skim milk) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

การตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *N. caninum*

ตัวอย่างน้ำนมทั้งหมดวิเคราะห์หาแอนติบอดีโดยชุดตรวจ *N. caninum* iscom ELISA kit (SVANOVIR® Neospora-AB iscom ELISA, Svanova Biotech AB, Uppsala, Sweden) เจือจางตัวอย่างน้ำนม 1:2 ใน PBS-Tween ก่อนทำการวิเคราะห์ ใช้ซีรัมของลูกโคที่ติดเชื้อ ทำการอุ่นตัวอย่างทั้งหมดโดยตั้งที่อุณหภูมิห้องเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำนม เจือจางซีรัมของลูกโคติดเชื้อ 1:100 เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมบวก P (positive control) ตรวจวิเคราะห์ทุกตัวอย่าง 2 ซ้ำ จากนั้นวัดค่าความขุ่น (OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร คำนวณค่าเฉลี่ยของทุกตัวอย่างจากการวัด 2 ซ้ำ จากนั้นคำนวณ percent positivity (PP=[mean OD of sample/mean OD of positive control]X100) ตัวอย่างที่ค่า PP ≥ 20 ถือว่าให้ผลบวกต่อการติดเชื้อ *N. caninum*

การเก็บข้อมูลการสืบพันธุ์

ทำการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับบันทึกประวัติการผสมเทียม และประวัติการแท้ง วิเคราะห์ดัชนีทางการสืบพันธุ์ ได้แก่ ระยะห่างวันคลอดถึงผสมเทียมครั้งแรก (calving to first artificial insemination interval: days) ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมติด (calving to conception interval: days) จำนวนครั้งการผสมเทียมต่อการผสมติด (number of services per conception) ระยะห่างวันตกไข่ (calving interval: days) ประวัติการแท้ง (abortion: number of cow) ความถี่ระยะห่างวันเป็นสัด (interoestrous interval: number of frequency) ที่มากกว่า 60 วัน 90 วัน 120 วัน และ 150 วัน

การวิเคราะห์ข้อมูลหาความแตกต่างของแม่โคกลุ่มที่พบและไม่พบภูมิคุ้มกัน ในดัชนีวันคลอดถึง

ผสมเทียมครั้งแรก วันคลอดถึงวันผสมติด จำนวนครั้งการผสมเทียมต่อการผสมติด และ ระยะห่างวันตกไข่ ใช้วิธี Mann-Whitney U Test ส่วนการวิเคราะห์ประวัติการแท้งใช้ Fisher's Exact Test จากโปรแกรมสำเร็จรูป และจำนวนความถี่ความถี่ระยะห่างวันเป็นสัดเป็นเปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ผลการศึกษาจากการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *N. caninum* ในฟาร์มโคนมขนาดใหญ่ 3 ฟาร์ม ให้ผลดังนี้ ภาพรวมแม่โคทั้งหมดที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *N. caninum* จำนวน 35.12% (98/279 ตัว) โดยมีระยะห่างวันคลอดถึงผสมเทียมครั้งแรกไม่แตกต่างกับแม่โคที่ให้ผลลบต่อเชื้อคือ 86±59 และ 91±54 วัน (P>0.05) ตามลำดับ ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมติดในแม่โคที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไม่แตกต่างกับแม่โคที่ให้ผลลบต่อเชื้อเท่ากับ 153±96 และ 155±97 วัน (P>0.05) ตามลำดับ จำนวนครั้งการผสมเทียมต่อการผสมติด ในแม่โคที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไม่แตกต่างกับแม่โคที่ให้ผลลบต่อเชื้อเท่ากับ 2.7±1.5 และ 2.6±1.6 ครั้ง (P>0.05) ตามลำดับ ระยะห่างวันตกไข่ในแม่โคที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไม่แตกต่างกับแม่โคที่ให้ผลลบต่อเชื้อเท่ากับ 434±92 และ 435±99 วัน (P>0.05) ตามลำดับ และประวัติการแท้งในแม่โคที่ให้ผลบวกต่อเชื้อไม่แตกต่างกับแม่โคที่ให้ผลลบต่อเชื้อเท่ากับ 5 และ 3 ตัว (P>0.05) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ทั้งนี้ในภาพรวมของความสมบูรณ์พันธุ์ของโคทั้งหมดในการศึกษานี้ไม่แตกต่างจากรายงานความสมบูรณ์พันธุ์โคนมไทยที่เคยมีรายงาน (สุณิรัตน์, 2547)

แม่โคทั้งสองกลุ่มมีความถี่ระยะห่างวันเป็นสัดยาว (prolong interoestrous interval) ในจำนวนความถี่สูงทั้งสองกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2 ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากการตายของลูกในท้อง ทำให้แม่โคมีระยะห่างวันเป็นสัดยาว โดยที่ผู้เลี้ยงตรวจไม่พบการแท้ง

การศึกษานี้ไม่สามารถนำตัวอย่างลูกโคที่แท้งมาตรวจหาเชื้อ *N.caninum* ในห้องปฏิบัติการ ดังเช่นรายงานของ Jardine and Last (1995) ที่พบเชื้อ *N. caninum* ในลูกโคนมที่แท้งออกมา 2 ตัว จากตัวอย่างแท้ง 105 ตัว (19%) ซึ่งเป็นการยืนยันการแท้งที่เกิดจากโรคนีโอสปอโรซิส

Table1 Reproductive performance index

Reproductive	Total N=279	P N=98	N N=181	P value
calving to first artificial insemination interval (days) N=266	89±55	86±59	91±54	0.696
calving to conception interval (days) N=237	54±96	153±96	155±97	0.477
number of services per conception N=230	2.6±1.5	2.7±1.5	2.6±1.6	0.999
calving interval (days) N=238	435±96	434±92	435±99	0.516
Abortion (number of cows) N=271	8	5	3	0.134

P = โคที่พบภูมิคุ้มกัน
N = โคที่ไม่พบภูมิคุ้มกัน

Table2 Distribution of interoestrous interval showed in percentage (number of frequency)

Interoestrous interval (days)	Total %(n)	P %(n)	N %(n)
>60	20.79(58)	21.42(21)	20.44(37)
>90	10.39(29)	11.22(11)	9.94(18)
>120	6.81(19)	7.14(7)	6.62(12)
>150	5.38(15)	6.12(6)	4.97(9)

P = โคที่พบภูมิคุ้มกัน
N = โคที่ไม่พบภูมิคุ้มกัน

การเกิดปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ในแม่โคนมส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการสืบพันธุ์และโปรโตชีว ยังเป็นปัญหาใหญ่ และทำให้มีจำนวนโคป่วยเพิ่มมากขึ้น

หากไม่ได้รับการดูแลอย่างเหมาะสม ขณะเดียวกัน *N. caninum* อาจเป็นปัญหาสำคัญต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในอนาคต เพราะไม่เพียงแต่เป็นสาเหตุของการแท้งเท่านั้น หากยังทำให้ปริมาณการผลิตน้ำนมลดลงด้วย (Thurmond and Hietala, 1997) และทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในการการผลิตรายโค ดังนั้นในประเทศไทยควรมีการควบคุมโรคโดยการตรวจวินิจฉัยโรคในฟาร์มโคนมเพื่อให้ทราบโคที่มีแอนติบอดี อาจพิจารณาประกอบการคัดออกจากฝูงเพื่อลดจำนวนโคติดเชื้อในฝูง และการควบคุมและป้องกันสุนัขในฟาร์มและนอกฟาร์มไม่ให้เข้าไปกินรกหรือลูกที่แท้ง นอกจากนี้ควรมีการควบคุมการเคลื่อนย้ายโคที่มีเชื้อหรือตรวจพบแอนติบอดีไปยังโคฝูงอื่นๆ ที่ปลอดโรค

สรุป

การศึกษานี้พบว่าโรคนีโอสปอโรซิสไม่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมในฟาร์มขนาดใหญ่ 3 ฟาร์ม แม้จะพบประวัติการแท้งในกลุ่มโคที่พบภูมิคุ้มกันต่อโรคสูงกว่า อย่างไรก็ตามการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของอุบัติการณ์ของโรคนีโอสปอโรซิส ในพื้นที่ศึกษาและประเทศไทย และนำมาใช้ประกอบการเฝ้าระวังโรคนีโอสปอโรซิส เพื่อลดผลกระทบต่อการสืบทอดพันธุ์และการผลิตน้ำนมในโคนมในประเทศไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ บริษัทอินเตอร์เวท (ประเทศไทย) จำกัด และคณะสัตวแพทยศาสตรมหาวิทาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สุณิรัตน์ เอี่ยมละมัย. 2547. ความสำคัญของ

ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ต่อการผลิตโค:
การสืบพันธุ์ในโค. คณะสัตวแพทยศาสตร์
ม.ขอนแก่น. หน้า 395-450.

Anderson, M. L., Andrianarivo, A. G., and Conrad, P.

A. 2000. Neosporosis in cattle. Anim.
Reprod. Sci. 60-61: 417-431.

Bjerkas, I., Mohn, S.F., and Presthus, J. 1984.

Unidentified cyst-forming sporozoon causing
encephalomyelitis and myositis in dogs. Z.
Parasite. 70: 271-4.

Chanlun, A., Emanuelson, U., Chunlun, S.,

Aiumlamai, S., and Bjorman, C. 2006.
Application of repeated bulk milk testing
for identification of infection dynamics of
Neospora caninum in thai dairy herds. Vet.
Parasitol. 136: 243-250.

Chanlun, A., Naslund, K., Aiumlamai, S.,

Bjorkman, C., 2002. Use of bulk milk for
detection of *Neospora caninum* infection in
dairy herds in Thailand. Vet. Parasitol. 110:
35-44.

Dubey, J.P., 2003. Review of *Neospora caninum* and
neosporosis in animals. Korean. J Parasitol
41, 1-16.

Dubey, J. P., and Schares, G. 2006. Diagonosis of
bovine neosporosis. Vet. Parasitol. 141: 1-
34.

Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Oppen, M.
T., and Ugglia, A. 1988. Newly recognized
fetal protozoan of dogs. J. Anim. Vet. Med.
Assoc. 192: 1269-1285.

Jardine, J.E. and Last, R.D. 1995. The prevalence

of neosporosis in aborted bovine fetuses

submitted to the Allerton Regional
Veterinary Laboratory. Onderstepoort J. of
Vet. 62: 207-209.

Kashiwaki, Y., Pholpark, S., Charoenchai, A.,

Polsar, C., Teeverapanya, S., and Pholpark,
M. 2001. Postnatal neosporosis in dairy
cattle in northeast Thailand. Vet Parasitol
94, 217-220. Kyaw, T., Virakul, P.,
Mungyai, M., and Banlunara, W. 2003.
First identification of *Neospora caninum* in
Thailand. Thai. J. Vet. Med. 33: 97-102.

Kyaw, T., Virakul, P., Mungyai, M., and Banlunara,
W. 2003. First identification of *Neospora*
caninum in Thailand. Thai. J. Vet. Med. 33:
97-102.

Ortega-Mora, L., Ferre, I., Del-Pozo, I., Caetano-da-
Silva, A., Collantes-Fernandez, E., Regidor-
Cerrillo, J., Garagalza, C and Aduriz, G.
2003. Detection of *Neosporora caninum* in
semen of bulls. Vet. Parasitol. 117: 301-
308.

Romero, J. J., S. Van Breda, B. Vargas, G. Dolz,
and K. Frankena. 2005. Effect of
neosporosis on productive and reproductive
performance of dairy cattle in Costa Rica.
Theriogenology. 64: 1928-1939.

Thurmond, MC., Hietala SK. 1997. Effect of
congenitally acquired *Neospora caninum*
infection on risk of abortion and subsequent
abortions in dairy cattle. Anim. J. Vet. Res.
58: 1381-5.

Waldner, C. L., Henderson, J., John T. Y. Wu.,
Breker, K., and Chow, E. Y. 2001.
Reproductive performance of a doe-calf
herd following a *Neospora caninum*-
associated abortion epidemic. Can. Vet. J.
42: 355-60. infection. Int. J. Parasitol. 33:
1059-65.