



# Diagnosis of Bovine Neosporosis

Jitbanjong Wiengcharoen

Division of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology,  
140 Chueam Samphan Road, Nong Chok, Bangkok 10530, Thailand

## Abstract

**N**eosporosis has emerged as an important reproductive disease in cattle all over the world. Mid-gestation abortion is the primary clinical sign of *N. caninum* infection among cattle. The diagnosis of neosporosis-associated abortion in cattle is difficult. Although histopathological and immunohistochemical tests are considered the gold standard for confirming *N. caninum* infection in cattle, these techniques are disadvantaged by their low sensitivity, due to the irregular distribution of *N. caninum* in host tissues. In addition, finding *N. caninum* in host tissues is insufficient evidence to confirm conclusively that *N. caninum* is the cause of abortion; most *N. caninum* infections in cattle do not result in abortions. PCR techniques have yielded greater sensitivity and specificity than histopathology and immunohistochemistry; however, the detection of *N. caninum* DNA in aborted tissues without any lesions is inconclusive evidence that *N. caninum* was the cause of an abortion. Serological testing is very useful because it is non-invasive and easy to perform. Serodiagnostic screening is useful for bovine neosporosis at herd level, but not as a conclusive diagnostic test at the individual level, because *N. caninum*-specific antibody in aborted cattle cannot distinguish between recent and latent infections. This review presents current diagnostic approaches to bovine neosporosis.

**Keywords:** neosporosis, *Neospora caninum*, abortion, diagnosis, bovine

## บทนำ

เชื้อโปรโตซัว *N. caninum* ถูกรายงานการก่อโรคครั้งแรกในสุนัข ในประเทศนอร์เวย์เมื่อปี ค.ศ. 1984 ต่อมา มีรายงานการเกิดโรค neosporosis ในโคนมและโคเนื้อทั่วโลก โดย neosporosis เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการแท้ง (abortion) ในโค ซึ่งมักเกิดขึ้นในช่วงตั้งท้องเดือนที่ 5-6 นอกจากการแท้งแล้ว โรค neosporosis อาจเป็นสาเหตุให้เกิดการตายของตัวอ่อนในท้อง แล้วเกิดการดูดซึมกลับ (resorption) หรือกลายเป็นมัมมี่ (mummification) หรืออาจตายคลอด (stillborn) หรือลูกโคอาจคลอดออกมาพร้อมกับความผิดปกติตั้งแต่แรกเกิด (born alive with clinical signs) หรือลูกโคอาจติดเชื้อตั้งแต่แรกเกิดแต่ไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ (born clinically normal but

persistently infected)

การแท้งในโคที่เกิดจากโรค neosporosis สามารถเกิดขึ้นได้ในแม่โคทุกช่วงอายุ ทุกการตั้งท้อง โดยรูปแบบของการแท้งอาจแบ่งได้เป็นแบบ epidemic pattern และ endemic pattern

Epidemic Abortion คืออัตราการแท้งของโคนมฟาร์มหรือในพื้นที่ที่เพิ่มขึ้น ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ เช่น ในกรณีที่เกิดการแท้งของโคจำนวน 15% จากจำนวนทั้งหมดในฟาร์มหรือในพื้นที่ ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ หรือ เกิดการแท้งของโคจำนวน 12.5% จากจำนวนทั้งหมดในฟาร์มหรือในพื้นที่ ภายในระยะเวลา 8 สัปดาห์ หรือ เกิดการแท้งของโคจำนวน 10% จากจำนวนทั้งหมดในฟาร์มหรือในพื้นที่ ภายในระยะเวลา 6 สัปดาห์

Endemic Abortion คือการที่อัตราการแท้งของโคนมฟาร์มหรือในพื้นที่ เพิ่มขึ้นมากกว่า 5% ภายในช่วงระยะเวลา 1 ปี

การติดต่อของโรค neosporosis ในโค สามารถเกิดขึ้นได้ 2 ทางคือ

1. การได้รับเชื้อตั้งแต่อยู่ในท้องแม่ หรือการถ่ายทอดเชื้อ

## Correspondence:

Jitbanjong Wiengcharoen,

E-mail: <jitbanjo@yahoo.com>

จากแม่โคไปสู่ลูกโค (Transplacental transmission หรือ vertical transmission) ซึ่งเป็นวิธีการติดต่อหรือแพร่กระจายหลักของโรค

2. การได้รับเชื้อภายหลัง (Post-natal transmission หรือ horizontal transmission) อาจเกิดจากการกิน sporulated oocysts ที่ออกมาพร้อมกับอุจจาระของสุนัขที่ติดเชื้อ แล้วปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมเข้าไป [1-3]

## การวินิจฉัยโรคในโค

เนื่องจากโคที่ติดเชื้อ *N. caninum* ส่วนใหญ่ยังไม่แสดงอาการใดๆ ดังนั้นเมื่อแม่โคแสดงอาการแท้งแล้วการที่สัตวแพทย์จะวินิจฉัยว่า neosporosis เป็นสาเหตุของการแท้งในโคตัวนั้นๆ จะต้องอาศัยผลทางห้องปฏิบัติการยืนยัน ซึ่งโดยมากจำเป็นต้องอาศัยผลทางห้องปฏิบัติการมากกว่า 1 อย่างในการสรุปหรือยืนยันว่า neosporosis เป็นสาเหตุของการแท้งนั้นๆ โดยสัตวแพทย์ควรส่งเนื้อเยื่อของตัวอ่อนที่แท้งออกมา (aborted fetuses) พร้อมทั้งรกและซีรัมของแม่โคที่แท้งไปยังห้องปฏิบัติการ [4] เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคโดยวิธีดังต่อไปนี้

## 1. จุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

คือการตรวจหารอยโรคหรือการ (lesion) ในเนื้อเยื่อที่เกิดจาก *N. caninum* ร่วมกับการตรวจหา tachyzoite หรือ cyst ของ *N. caninum* ซึ่งวิธีนี้ถือว่าเป็น gold standard ในการยืนยันการติดเชื้อ *N. caninum* แต่ก็มีข้อจำกัดเนื่องจากการกระจายตัวของเชื้อ *N. caninum* ในเนื้อเยื่อต่างๆ นั้นมักจะไม่ทั่วทั้งทั้งหมด เช่น บางตำแหน่งอาจจะมีเชื้อกระจายอยู่มาก บางตำแหน่งอาจจะมีเชื้อกระจายอยู่น้อยหรือไม่มีเลย

### 1.1 ลักษณะรอยโรค

#### 1.1.1 Fetuses and stillborn calves

อาจพบลักษณะรอยโรคเสื่อมสลาย (degenerative lesion) หรืออักเสบ (inflammation) ได้ในหลายเนื้อเยื่อของตัวอ่อน ซึ่งจะพบได้มากในเนื้อเยื่อระบบประสาทส่วนกลาง หัวใจ และตับ ลักษณะของรอยโรคที่พบได้ใน CNS มักจะประกอบด้วย mononuclear cell เข้าไปล้อมรอบบริเวณเนื้อตาย (necrosis) ที่อยู่ตรงกลาง นอกจากนั้นในรกที่แท้งออกมาก็อาจพบรอยโรคได้ โดยมีลักษณะอยู่บริเวณ cotyledon โดยอาจจะเป็นเนื้อตาย (a focal area of necrosis) หรือเป็น non-suppurative inflammation และจะพบ tachyzoites ได้ในเซลล์ trophoblasts ส่วนรอยโรคที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (gross lesion) นั้นมักไม่ค่อยพบ แต่ก็อาจพบจุดเล็กสีขาวได้บนกล้ามเนื้อลายและหัวใจ หรืออาจพบจุดเนื้อตายเล็กสีขาวหรือสีเข้มในบริเวณสมองและ cotyledon ของรก

#### 1.1.2 Neonatal calves

เนื่องจากลูกโคที่ติดเชื้อตั้งแต่อยู่ในท้องแม่ เมื่อคลอดออกมาแล้วส่วนมากมักจะไม่มีแสดงอาการผิดปกติใดๆ ดังนั้นการตรวจหารอยโรคในเนื้อเยื่อของลูกโคแรกคลอดที่

ติดเชื่อนั้นทำได้ยาก แม้แต่ในลูกโคแรกคลอดที่แสดงอาการผิดปกติทางระบบประสาทด้วยก็ตาม แต่ก็เคยมีหลายรายงานพบการ encephalomyelitis ในลูกโคที่แสดงอาการของโรคตั้งแต่แรกคลอดและลูกโค ที่แสดงอาการของโรคหลังจากคลอดออกมาได้ 2 สัปดาห์

#### 1.1.3 Adult cattle

แม้ว่าจะมีรายงานพบการอักเสบและเนื้อตาย ในระบบประสาทและกล้ามเนื้อหัวใจของโค ที่สงสัยว่าติดเชื้อ *N. caninum* เนื่องจากตรวจพบ DNA ของเชื้อโดยวิธีการตรวจวินิจฉัยอื่น เช่น PCR แต่ก็ยังไม่เคยมีรายงานการตรวจพบ tachyzoite ของ *N. caninum* ในบริเวณการในเนื้อเยื่อของโคที่อายุมากกว่า 2 เดือนเลย

### 1.2 การตรวจหา *N. caninum* ในเนื้อเยื่อที่ข้อมสีย H & E

ในการตรวจหาเชื้อ *N. caninum* ระยะ tachyzoite ในเนื้อเยื่อของตัวอ่อน ลูกโคหรือแม่โคที่ข้อมด้วยสีย H & E นั้นค่อนข้างจะทำได้ยาก เนื่องจาก tachyzoite มีขนาดเล็กและอยู่กันกระจายมาก

Dubey *et al* [5] รายงานลักษณะของเชื้อระยะ tachyzoite ในเนื้อเยื่อ ว่ามักจะมีรูปร่างกลม หรืออาจจะเรียวยาว ไม่ค่อยเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยวเพราะมีโอกาสน้อยที่จะถูกตัดตามยาว (longitudinal section) นอกจากนั้นรูปร่างของมันจะคล้ายกันมากจนแยกไม่ออกกับ *Toxoplasma gondii* และ *Sarcocystis*

Dubey *et al* [6] รายงานลักษณะของ tissue cyst ของเชื้อในเนื้อเยื่อโคว่า จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 5-50 ไมโครเมตร ส่วนผนังของ cyst จะมีความหนาแตกต่างกันไปตั้งแต่ < 1 ถึง 2.5 ไมโครเมตร ขึ้นอยู่กับขนาดของ cyst

### 1.3 การย้อม immunohistochemistry

การย้อม immunohistochemistry จะทำให้สามารถตรวจหาเชื้อ *N. caninum* ในเนื้อเยื่อได้ง่ายกว่าการย้อมสีย H & E เนื่องจากเราสามารถใช้อแอนติบอดีทั้งชนิดที่เป็น polyclonal หรือ monoclonal ที่จำเพาะต่อเชื้อ *N. caninum* นำมาย้อมเนื้อเยื่อเพื่อให้เข้าไปจับกับแอนติเจนของเชื้อที่อยู่ในเนื้อเยื่อ ทำให้การตรวจหาเชื้อในเนื้อเยื่อทำได้ง่ายขึ้น จากการศึกษาที่ผ่านมา เชื้อส่วนมากมักจะพบได้ในสมองและหัวใจ แต่จะมีโอกาสพบได้บ้างไม่มากนักในอวัยวะอื่นๆ และที่รกของตัวอ่อน

Wouda *et al* [7] รายงานการตรวจหาเชื้อในเนื้อเยื่อของตัวอ่อน 80 ตัวอย่าง โดยการย้อม immunohistochemistry ว่าพบเชื้อ *N. caninum* ในสมอง 71 ตัวอย่าง (89%) ในหัวใจ 11 ตัวอย่าง (14%) ในตับ 21 ตัวอย่าง (26%)

## 2. Bioassay หรือ Cell culture

คือการแยกเชื้อ *N. caninum* (isolation) ที่ยังมีชีวิตอยู่ในเนื้อเยื่อ โดยการนำเนื้อเยื่อที่สงสัยว่ามีเชื้อ *N. caninum* มาบดและย่อยด้วยเอนไซม์ แล้วฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลองเช่นหนู หรือใส่ลงในไปในเซลล์เพาะเลี้ยงเช่น VERO cell (ตารางที่ 1) วิธีนี้ไม่ค่อยเป็นที่นิยมและประสบความสำเร็จได้ยาก เนื่องจากเชื้อที่อยู่

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการตรวจแยกหาเชื้อ *N. caninum* จากโค (ดัดแปลงจาก [4])

| ประเทศ     | สายพันธุ์ | ที่มา               | การตรวจแยกหาเชื้อ |             | เอกสารอ้างอิง |
|------------|-----------|---------------------|-------------------|-------------|---------------|
|            |           |                     | เซลล์เพาะเลี้ยง   | หนู         |               |
| ออสเตรเลีย | NC-Nowra  | ลูกโคอายุ 7 วัน     | VERO              | KO          | 28            |
| ญี่ปุ่น    | JPA-1     | ลูกโคอายุ 2 สัปดาห์ | CPAE              | Nude        | 29            |
| มาเลเซีย   | Nc-MalB1  | ลูกโคอายุ 1 วัน     | -                 | BALB/c      | 30            |
| นิวซีแลนด์ | NcNZ1     | แม่โค               | VERO              | -           | 31            |
| อังกฤษ     | NC-LivB1  | ลูกโคตายคลอด        | VERO              | -           | 32            |
| บราซิล     | BCN/PR3   | ตัวอ่อน             | VERO              | SW, gerbils | 33            |

ในเนื้อเยื่อของตัวอ่อนที่แท้งมักจะตายแล้ว เนื่องจากโคระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ทำลาย

Conrad *et al* [8] สามารถแยกเชื้อ *N. caninum* ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้จากเนื้อเยื่อของตัวอ่อนที่แท้งเพียง 2 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 49 ตัวอย่าง แม้ว่าในตัวอย่างทั้งหมดนั้นพบวิธีการที่มีขนาดเล็ก ซึ่งยืนยันได้ชัดเจนว่ามีการติดเชื้อ *N. caninum*

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การแยกเชื้อ *N. caninum* ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยฉีดเข้าไปในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน จะมีความไวมากกว่าการใส่ลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยง

Lindsay and Dubey [9] รายงานการตรวจแยกหาเชื้อ *N. caninum* ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ในหนู outbred mice ที่ถูกกดภูมิคุ้มกันโดยการฉีด methylprednisolone acetate หรือ cortisone acetate หรือโดยการกิน dexamethasone โดยพบว่าหนูจะตายภายใน 2-4 สัปดาห์ หลังจากที่ถูกฉีดเชื้อเข้าไป และจะพบเชื้อได้ในตับ ปอด และหัวใจ

Lindsay *et al* [10]; Long and Baszler [11]; Long *et al* [12] รายงานว่า หนู inbred mice เช่น BALB/c มีความไวต่อการใช้เพาะแยกเชื้อ *N. caninum* มากกว่าหนู outbred mice

Dubey *et al* [13] รายงานว่าหนู GKO mice มีความไวต่อการใช้เพาะแยกเชื้อ *N. caninum* มากกว่าหนู nude mice

### 3. ซีรัมวิทยา (Serology)

คือการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *N. caninum* ซึ่งมีอยู่หลายวิธี วิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือ ELISA และ IFAT (Indirect fluorescence antibody test) เนื่องจากทั้งลูกโคและแม่โคนั้นจะสร้างแอนติบอดี IgM และ IgG ที่จำเพาะต่อเชื้อ *N. caninum* ขึ้นมาภายในเวลาไม่กี่วัน หลังจากที่ได้สัมผัสเชื้อครั้งแรก ระดับของแอนติบอดี IgM จะขึ้นสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 2 หลังจากได้รับเชื้อจากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งตรวจไม่พบในช่วงสัปดาห์ที่ 4 หลังจากได้รับเชื้อ [14] ส่วนแอนติบอดี

IgG จะเริ่มตรวจพบได้ตั้งแต่สัปดาห์แรกหลังจากได้รับเชื้อไปจนกระทั่งเดือนที่ 3-6 หลังจากได้รับเชื้อ [15,16]

Wiengcharoen *et al* [17] รายงานการตรวจพบแอนติบอดี IgG ที่จำเพาะต่อเชื้อ *N. caninum* ในโคครั้งแรกหลังจากที่ถูกทดลองฉีดเชื้อ *N. caninum* เข้าชั้นใต้ผิวหนัง 7 วัน ไปจนกระทั่งวันที่ 119 หลังจากถูกฉีดเชื้อ ซึ่งพบว่าระดับแอนติบอดี IgG ก็ยังค่อนข้างสูงอยู่

#### 3.1 การตรวจซีรัมวิทยาในแม่โคที่แท้งหรือลูกตายคลอด

ผลการตรวจทางซีรัมวิทยาในแม่โคที่แท้งหรือให้ลูกที่ตายคลอด จะช่วยบอกได้ว่าแม่โคตัวนั้นติดเชื้อ *N. caninum* หรือไม่ หากผลซีรัมวิทยาเป็นลบ ก็มีความเป็นไปได้น้อยที่เชื้อ *N. caninum* จะเป็นสาเหตุของการแท้งหรือการตายของลูกโค เนื่องจากมีหลายรายงานแสดงว่าแม่โคที่ติดเชื้อ *N. caninum* จะเป็น seropositive ในช่วงเวลาที่แท้ง [18-20] แต่ก็มีหลายรายงานเช่นกัน ที่แสดงว่าระดับแอนติบอดีของแม่โคที่ติดเชื้อ *N. caninum* มักจะแกว่งขึ้น ๆ ลง ๆ จนบางครั้งถึงกับตรวจไม่พบแอนติบอดี ในช่วงที่เกิดการแท้ง ทำให้ผลการตรวจเป็น false negative [21-23]

หากผลการตรวจทางซีรัมวิทยาในแม่โคที่แท้ง หรือให้ลูกที่ตายคลอดเป็นบวก สิ่งที่ต้องคำนึงถึงต่อไปก็คือ การติดเชื้อดังกล่าวนี้เกิดจากแม่โคเพียงจะได้รับเชื้อ *N. caninum* มาเมื่อเร็ว ๆ นี้หรือเคยติดเชื้อมานานแล้ว อย่างไรก็ตามการตรวจพบแอนติบอดีในแม่โคที่แท้งเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถที่จะสรุปได้ว่าแม่โคตัวดังกล่าวแท้งเนื่องจากการติดเชื้อ neosporosis การวินิจฉัยยืนยันควรทำโดยการตรวจหาเชื้อหรือ DNA ของเชื้อจากเนื้อเยื่อของตัวอ่อนที่แท้งด้วย

#### 3.2 การตรวจซีรัมวิทยาของ foetal body fluid

ของเหลวในร่างกายของตัวอ่อนที่แท้งออกมา เช่น เลือดของเหลวในช่องอก (pleural fluid) ของเหลวในช่องท้อง (peritoneal fluid) และของเหลวในกระเพาะ (abomasal

ตารางที่ 2 ตัวอย่างปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *N. caninum* ในโค (ดัดแปลงจาก [4])

| DNA เป้าหมาย | Primer             | ชนิดของปฏิกิริยา | ความไว                            | เอกสารอ้างอิง |
|--------------|--------------------|------------------|-----------------------------------|---------------|
| 18S rDNA     | COC-1, COC-2       | One step PCR     | 5 tachyzoites ในเลือด หรือน้ำคร่ำ | 34            |
| ITS1         | NS1, SR1           | One step PCR     | ไม่ได้รายงาน                      | 26            |
| ITS1         | NN1, NN2, NP1, NP2 | Nested PCR       | ไม่ได้รายงาน                      | 35            |
| pNc5 gene    | Np1, Np2           | One step PCR     | DNA 100 pg                        | 36            |
| pNc5 gene    | Np6, Np21          | One step PCR     | 1 tachyzoite จากสมอง<br>1 mg      | 37            |

content) สามารถที่จะนำมาเพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *N. caninum* ได้เช่นกัน แต่ว่าจะมีความไว (sensitivity) ค่อนข้างต่ำ

### 3.3 การตรวจในลูกโคแรกเกิด

ลูกโคที่ติดเชื้อมาจากแม่ตั้งแต่อยู่ในท้องนั้น ส่วนมากมักจะคลอดออกมามีอาการปกติ การตรวจแยกลูกโคที่ติดเชื้อมาตั้งแต่เกิด (congenitally infected calf) นั้น ทำได้โดยการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะในซีรัมของลูกโค ซึ่งจะต้องเก็บซีรัมของลูกโคตั้งแต่คลอดออกมาใหม่ๆ ก่อนที่ลูกโคจะได้น้ำนมแม่เหลือง (colostrum) จากแม่ เพราะในน้ำนมจะมีแอนติบอดีอยู่มาก อาจทำให้ได้ผลการตรวจเป็น false positive

## 4. ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

ปฏิกิริยา PCR มีบทบาทสำคัญมากในการวินิจฉัยยืนยันการติดเชื้อ *N. caninum* เนื่องจากมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) มากที่สุด เมื่อเทียบกับวิธีวินิจฉัยอย่างอื่น ๆ ซึ่งปฏิกิริยา PCR จะเป็นการตรวจหา DNA ของ *N. caninum* ในเนื้อเยื่อของตัวอ่อนที่แท้งออกมา โดยที่มีหลายรายงานยืนยันว่ารกและสมองของตัวอ่อนที่แท้งเป็นอวัยวะที่มีโอกาสที่จะตรวจพบ DNA ของ *N. caninum* ได้มากที่สุด นอกจากนั้นยังมีโอกาสที่จะตรวจพบ DNA ของเชื้อได้ในตัวอย่างอื่น ๆ เช่น amniotic fluid, cerebrospinal fluid [1,2,24,25]

Baszler *et al* [25] รายงานว่าปฏิกิริยา PCR มีความไวเหนือกว่าการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา และการย้อม immunohistochemistry เนื่องจาก PCR สามารถตรวจพบ DNA ของ *N. caninum* ในเนื้อเยื่อของโคที่แท้ง 6 ตัวอย่าง จาก 8 ตัวอย่าง (75%) ซึ่งทั้ง 8 ตัวอย่างนั้นตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry แล้วไม่พบเชื้อ *N. caninum* นอกจากนั้นอัตราการตรวจพบเชื้อ *N. caninum* โดยปฏิกิริยา PCR นั้นจะมีอัตราการตรวจพบเชื้อได้สูงสุดถึง 100% จากการตรวจเนื้อเยื่อ

สมองของโคที่แท้ง ในขณะที่อัตราการตรวจพบเชื้อในเนื้อเยื่ออวัยวะอื่นได้แก่ รก ปอด ตับ ไต หัวใจ และม้ามนั้นแปรผันตั้งแต่ 17-50%

Sager *et al* [26] รายงานว่าปฏิกิริยา PCR สามารถตรวจพบ DNA ของ *N. caninum* ได้ในเนื้อเยื่อสมอง 42 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 47 ตัวอย่างซึ่งมีรอยโรคเนื้อตายในเนื้อเยื่อ และยังคงตรวจพบ DNA ในเนื้อเยื่อสมอง 8 ตัวอย่างจากทั้งหมด 91 ตัวอย่างซึ่งไม่มีรอยโรคเนื้อตายในเนื้อเยื่อ ในขณะที่การตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry ไม่พบเชื้อ *N. caninum* เลยในเนื้อเยื่อทั้งหมด

Gottstein *et al* [27] รายงานว่าปฏิกิริยา PCR สามารถตรวจพบ DNA ของ *N. caninum* ได้ในเนื้อเยื่อสมองของตัวอ่อนที่แท้ง 24 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 83 ตัวอย่าง (29%) ซึ่งตัวอย่างที่เป็นบวกทั้งหมด 24 ตัวอย่างนี้ มีเพียงแค่ 18 ตัวอย่างที่ตรวจพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของปฏิกิริยา PCR คือการที่เชื้อ *N. caninum* มักจะอยู่กระจ่ายกันมากในเนื้อเยื่อต่างๆ ดังนั้นจึงมีโอกาสและความเป็นไปได้มาก ที่เนื้อเยื่อบริเวณที่ถูกเลือกมาตรวจ อาจจะไม่มีเชื้ออยู่ นอกจากนั้น ความไวและความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR ยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ตั้งแต่การเลือก DNA เป้าหมาย (target DNA) ที่เหมาะสม คู่ primer ที่เหมาะสม ชนิดหรือบริเวณของเนื้อเยื่อที่จะนำมาตรวจ การเก็บรักษาเนื้อเยื่อก่อนที่จะทำการตรวจ วิธีการสกัด DNA สารต่างๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการทำ PCR ตลอดจนวิธีการตรวจเช็ค amplicon (ตารางที่ 2)

## สรุป

ในกรณีที่สัตวแพทย์ต้องการวินิจฉัยว่า *N. caninum* เป็นสาเหตุของการแท้งของโคในพื้นที่หรือไม่ สัตวแพทย์ควรเก็บตัวอย่างตัวอ่อนที่แท้ง รก และซีรัมของแม่โคที่แท้ง ส่งห้องปฏิบัติการ สำหรับการแปลผลจากห้องปฏิบัติการนั้น ค่อนข้างซับซ้อน

เนื่องจากการตรวจพบ tachyzoite ของ *N. caninum* อยู่ในรอยโรคที่มีลักษณะรุนแรงของเนื้อเยื่อของตัวอ่อนที่แท้ง ร่วมกับการที่ไม่พบว่ามีโรคติดเชื้อโรคอื่น ๆ ที่อาจเป็นสาเหตุของการแท้งได้นั้น จึงสรุปได้ว่า *N. caninum* เป็นสาเหตุของการแท้งครั้งนี้ แต่หากลักษณะรอยโรคของเนื้อเยื่อของตัวอ่อนที่แท้งออกมานั้นเป็นแบบไม่รุนแรงหรือไม่พบ tachyzoite ของ *N. caninum* แม้ว่าจะตรวจพบ DNA ของเชื้อด้วยวิธี PCR ในเนื้อเยื่อดังกล่าว หรือตรวจพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *N. caninum* ในแม่โคที่แท้ง ก็กล่าวได้เพียงว่า *N. caninum* อาจเป็นสาเหตุของการแท้งในครั้งนั้น นอกเสียจากจะตรวจวินิจฉัยยืนยันได้ว่าแม่โคไม่มีการติดเชื้อโรคอื่น ๆ ที่เป็นสาเหตุของการแท้งเลย จึงจะสรุปได้ว่า *N. caninum* เป็นสาเหตุของการแท้ง

### เอกสารอ้างอิง

- Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:417-31.
- Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol.* 2003;41:1-16.
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:323-67.
- Dubey JP, Schares D. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol.* 2006;140:1-34.
- Dubey JP, Buxton D, Wouda W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol.* 2006;134:267-89.
- Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkas I, Björkman C, Blagburn BL, *et al.* Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol.* 2002;32:929-46.
- Wouda W, Moen AR, Visser IJR, van Knapen F. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J Vet Diagn Invest.* 1997;9:180-5.
- Conrad PA, Barr BC, Sverlow KW, Anderson M, Daft B, Kinde H, *et al.* *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitology.* 1993;106:239-49.
- Lindsay DS, Dubey JP. *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *J Parasitol.* 1989;75:772-9.
- Lindsay DS, Lenz SD, Cole RA, Dubey JP, Blagburn BL. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. *J Parasitol.* 1995;81:313-5.
- Long MT, Baszler TV. Fetal loss in Balb/c mice infected with *Neospora caninum*. *J Parasitol.* 1996;82: 608-11.
- Long MT, Baszler TV, Mathison BA. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *J Parasitol.* 1998;84:316-20.
- Dubey JP, Dorough KR, Jenkins MC, Liddell S, Speer CA, Kwok OC, *et al.* Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int J Parasitol.* 1998;28:1293-304.
- De Marez T, Liddell S, Dubey JP, Jenkins MC, Gasbarre L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int J Parasitol.* 1999;29:1647-57.
- Uggla A, Stenlund S, Holmdahl OJM, Jakubek EB, Thebo P, Kindahl H, *et al.* Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int J Parasitol.* 1998;28:1467-72.
- Wiengcharoen J, Thompson RC, Nakthong C, Rattanakorn P, Sukthana Y. Transplacental transmission in cattle: is *Toxoplasma gondii* less potent than *Neospora caninum*? *Parasitol Res.* 2011;108:1235-41.
- Williams DJL, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, *et al.* *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology.* 2000;121:347-58.
- De Meerschman F, Speybroeck N, Berkvens D, Rettigner C, Focant C, Leclipteux T, *et al.* Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. *Theriogenology.* 2002;58:933-45.
- Otter A, Jeffrey M, Scholes SFE, Helmick B, Wilesmith JW, Trees AJ. Comparison of histology with maternal and fetal serology

- for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. *Vet Rec.* 1997;141:487-9.
20. Wouda W, Moen AR, Schukken YH. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology.* 1998;49:1311-6.
  21. Dannatt L. *Neospora caninum* antibody levels in an endemically-infected dairy herd. *Irish Vet J.* 1998;51:200-1.
  22. Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Beiboer ML, Wouda W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet Parasitol.* 2003;110:161-9.
  23. Wouda W, Brinkhof J, van Maanen C, de Gee ALW, Moen AR. Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds: a comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5:711-6.
  24. Buxton D, McAllister MM, Dubey JP. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trend Parasitol.* 2002;18:546-52.
  25. Baszler TV, Gay LJ, Long MT, Mathison BA. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J Clin Microbiol.* 1999;37:4059-64.
  26. Sager H, Fischer I, Furrer K, Strasser M, Waldvogel A, Boerlin P, *et al.* A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet Parasitol.* 2001;102:1-15.
  27. Gottstein B, Hentrich B, Wyss R, Thur B, Busato A, Stark KD, *et al.* Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int J Parasitol.* 1998;28:679-91.
  28. Miller CMD, Quinn HE, Windsor PA, Ellis JT. Characterization of the first Australian isolate of *Neospora caninum* from cattle. *Aust Vet J.* 2002;80:620-5.
  29. Yamane I, Kokuho T, Shimura K, Eto M, Shibahara T, Haritani M, *et al.* *In vitro* isolation and characterisation of a bovine *Neospora* species in Japan. *Res Vet Sci.* 1997;63:77-80.
  30. Cheah TS, Mattsson JG, Zaini M, Sani RA, Jakubek EB, Ugglä A, *et al.* Isolation of *Neospora caninum* from a calf in Malaysia. *Vet Parasitol.* 2004;126:263-9.
  31. Okeoma CM, Williamson NB, Pomroy WE, Stowell KM, Gillespie LM. Isolation and molecular characterisation of *Neospora caninum* in cattle in New Zealand. *NZ Vet J.* 2004;52:364-70.
  32. Davison HC, Guy F, Trees AJ, Ryce C, Ellis JT, Otter A, *et al.* *In vitro* isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK. *Res Vet Sci.* 1999;67:103-5.
  33. Locatelli-Dittrich R, Thomaz-Soccol V, Richartz RRTB, Gasino-Joineau ME, van der Vinne R, Pinckney RD. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. *Rev Brasil Parasitol Vet.* 2004;13:103-9.
  34. Ho MSY, Barr BC, Marsh AE, Anderson ML, Rowe JD, Tarantal AF, *et al.* Identification of bovine *Neospora* parasites by PCR amplification and specific small subunit rRNA sequence probe hybridization. *J Clin Microbiol.* 1996;34:1203-8.
  35. Buxton D, Maley SW, Wright S, Thomson KM, Rae AG, Innes EA. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J Comp Pathol.* 1998;118:267-79.
  36. Kaufmann H, Yamage M, Roditi I, Dobbelaere D, Dubey JP, Holmdahl OJ, *et al.* Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Mol Cell Probes.* 1996;10:289-97.
  37. Yamage M, Flechtner O, Gottstein B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally-infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J Parasitol.* 1996;82:272-9.