ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E42198

PREVALENCE OF *NEOSPORA CANINUM* INFECTION IN SWAMP BUFFALOES IN NORTHEAST THAILAND AND ITS EFFECTS ON REPRODUCTIVE PERFORMANCE

MR. NGUYEN HOAI NAM

A THESIS FOR DEGREE OF MASTER OF THERIOGENOLOGY

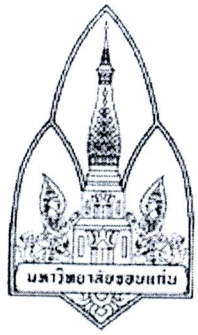
KHON KAEN UNIVERSITY

2010

6000259013

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

E42198



PREVALENCE OF *NEOSPORA CANINUM* INFECTION IN SWAMP BUFFALOES IN NORTHEAST THAILAND AND ITS EFFECTS ON REPRODUCTIVE PERFORMANCE

MR. NGUYEN HOAI NAM

A THESIS FOR DEGREE OF MASTER OF THERIOGENOLOGY

KHON KAEN UNIVERSITY

2010

PREVALENCE OF *NEOSPORA CANINUM* INFECTION IN SWAMP BUFFALOES IN NORTHEAST THAILAND AND ITS EFFECTS ON REPRODUCTIVE PERFORMANCE

MR. NGUYEN HOAI NAM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN THERIOGENOLOGY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY
2010

THESIS APPROVAL

KHON KAEN UNIVERSITY

FOR

MASTER OF SCIENCE

IN THERIOGENOLOGY

Thesis Title: Prevalence of *Neospora caninum* infection in swamp buffaloes in Northeast Thailand and its effects on reproductive performance.

Author: Nguyen Hoai Nam

Thesis Examination Committee		
	Assoc. Prof. Dr. Prachin Virakul	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Suneerat Aiumlamai	Member
	Assoc. Prof. Dr. Somboon Sangmaneedet	Member
	Dr. Aran Chanlun	Member
	Assist. Prof. Dr. Kwankate Kanistanon	Member

Thesis Advisors:

.....Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Suneerat Aiumlamai)

.....Co-advisor
(Dr. Aran Chanlun)

.....Co-advisor
(Assist. Prof. Dr. Kwankate Kanistanon)

.....
(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)
Dean, Graduate School

.....
(Assoc. Prof. Dr. Suneerat Aiumlamai)
Dean, Faculty of Veterinary Medicine

Copyright of Khon Kaen University

Nguyen Hoai Nam. 2010. **ความชุกของการติดเชื้อ *Neospora caninum* ในกระบือปลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย และผลต่อประสิทธิภาพการสืบพันธุ์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร. สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย,
อ.ดร. อรัญ จันทร์ลุน,
ผศ.ดร. ขวัญเกศ กนิษฐานนท์

บทคัดย่อ

E42198

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) หาความชุกของการติดเชื้อ *Neospora caninum* ในกระบือปลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 2) ศึกษาผลของการติดเชื้อ *N. caninum* ต่อประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ในกระบือปลัก 3) ศึกษาความชุกของการติดเชื้อ *N. caninum* ในกระบือปลักและโคเนื้อที่อาศัยในพื้นที่เดียวกัน 4) ตรวจหา DNA ของเชื้อ *N. caninum* จากเลือดของกระบือปลัก โดยทำการศึกษาเป็น 4 โครงการย่อย ใช้กระบือปลัก 532 ตัวจาก 5 จังหวัดในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ได้แก่ ขอนแก่น มหาสารคาม หนองคาย สกลนคร และอุดรธานี) ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาแอนติบอดี้ต่อเชื้อ *N. caninum* ด้วยชุดตรวจ Iscom ELISA พบว่าความชุกโดยรวมของการติดเชื้อเท่ากับ 4.5% (24/532) และอยู่ในช่วง 0.0% ถึง 6.4% โดยไม่พบความแตกต่างของแต่ละจังหวัด

จากกระบือทั้งหมด 532 ตัวนั้น มีกระบือเพศเมีย 115 ตัว ที่ถูกเหนี่ยวนำการเป็นสัดและได้รับการผสมเทียม จากนั้นตรวจการตั้งท้องในวันที่ 45 หรือ 60 หลังผสมเทียม ผลการตรวจท้องและตรวจหาแอนติบอดี้ต่อเชื้อ *N. caninum* พบว่า อัตราการตั้งท้องเท่ากับ 16.7% (1/6) และ 9.2% (10/109) ในกระบือที่ให้ผลตรวจเลือดเป็นบวกและลบ ตามลำดับ การศึกษานี้ไม่พบผลการติดเชื้อ *N. caninum* ต่อการตั้งท้องระยะแรก

เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดจากกระบือปลัก 187 ตัวที่อยู่ในเขตจังหวัดขอนแก่น และจากโคเนื้อ 78 ตัวที่เลี้ยงในพื้นที่เดียวกัน เพื่อตรวจหาแอนติบอดี้ต่อเชื้อ *N. caninum* พบว่าความชุกในกระบือเท่ากับ 6.4% ซึ่งต่ำกว่าความชุกในโคเนื้อ (43.6%) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) นอกจากนี้ ทำการเก็บ ตัวอย่างเลือดจากกระบือปลัก 81 ตัวจาก 9 ฝูง ซึ่งในฝูงมีกระบืออย่างน้อย 1 ตัวมีการติดเชื้อ *N. caninum* ทำการตรวจหา DNA ของเชื้อด้วยวิธี Nested-PCR ไม่พบ DNA จากการตรวจหาด้วยวิธีดังกล่าวในตัวอย่างที่ศึกษา

E 42198

จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่าความชุกของการติดเชื้อ *N. caninum* ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนืออยู่ในระดับต่ำ และได้แสดงว่าความไวต่อการติดเชื้อนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ โดยพบว่าโคเนื้อไวต่อการติดเชื้อนี้มากกว่ากระบือปลัก และถึงแม้ว่าการศึกษานี้จะไม่พบผลของการติดเชื้อต่อการตั้งท้องระยะแรกในกระบือปลัก ไม่ควรสรุปว่าการติดเชื้อนี้ไม่ใช่สาเหตุของการผสมไม่ติดหรือการแท้งในกระบือ การใช้ตัวอย่างเลือดจากสัตว์ปกติเพื่อตรวจหา DNA อาจไม่เหมาะสม จึงควรใช้ตัวอย่างเลือดจากสัตว์ที่แสดงอาการป่วย เก็บตัวอย่างจากซากลูกที่แท้งออกมา หรือจากแม่กระบือที่มีการแท้ง และอาจต้องเก็บตัวอย่างซ้ำหลายครั้งเพื่อเพิ่มโอกาสการตรวจหา DNA ของเชื้อ การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการติดเชื้อ *N. caninum* ครั้งแรกที่ทำในกระบือปลักของประเทศไทย

Nguyen Hoai Nam. 2010. **Prevalence of *Neospora caninum* Infection in Swamp Buffaloes in Northeast Thailand and its Effects on Reproductive Performance.** Master of Science Thesis in Theriogenology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Suneerat Aiumlamai,
Dr. Aran Chanlun,
Assist. Prof. Dr. Kwankate Kanistanon

ABSTRACT

E 42198

The aims of this thesis were: 1) To investigate the prevalence of *Neospora caninum* infection in swamp buffaloes in Northeast Thailand 2) To study the effects of the *N. caninum* infection on the fertility of the swamp buffaloes 3) To study the prevalence of *N. caninum* infection in swamp buffaloes and beef cattle living in the same area 4) To demonstrate *N. caninum* DNA from the swamp buffalo whole blood. The thesis was based on four separate studies.

Sera of 532 swamp buffaloes from five provinces (i.e. Khon Kaen, Maha Sarakham, Nong Khai, Sakon Nakhon and Udon Thani) in Northeast Thailand were collected. Presence of *N. caninum* antibodies in all sera was demonstrated by using an *N. caninum* iscom ELISA test kit. The overall prevalence of *N. caninum* infection in swamp buffaloes was 4.5% (24/532). The proportions of positive animals from these five provinces ranged from 0.0% to 6.4% with no significant difference.

Of 532 swamp buffaloes included in the previous study, 115 female animals were synchronized to induce estrous, and artificially inseminated. All were diagnosed for pregnancy by using the ultrasound scanning at day either 45 or 60 after insemination. The pregnancy rates of seropositive and seronegative buffaloes were 16.7% (1/6) and 9.2% (10/109), respectively. There was no significant difference in early pregnancy status of swamp buffaloes between seropositive and seronegative groups.

E42198

When sera from 187 swamp buffaloes and 78 beef cattle living in the same area in Khon Kaen province were analyzed for the presence of *N. caninum* antibodies, the prevalence of seropositive swamp buffaloes (6.4%) was significantly ($P<0.05$) lower than that in beef cattle (43.6%). Furthermore, whole blood samples were collected from 81 swamp buffaloes in 9 buffalo herds that harbored ≥1 seropositive buffalo. The *N. caninum* DNA in whole blood samples were demonstrated by using the Nested-PCR but all were negative to the test.

It was concluded that the *N. caninum* infection in the swamp buffalo in Northeast Thailand was low prevalent. The results also suggested that swamp buffaloes were less susceptible to *N. caninum* infection than beef cattle. This finding could be the result of species-depended susceptibility to *N. caninum* infection. Although the results of this study showed that *N. caninum* infection had no significant effects on the early pregnancy rate of Thai swamp buffaloes, it could not be ruled out as the possible cause of infertility or abortion in this species. Whole blood sample from normal animals might not be sufficient for the success of the *N. caninum* DNA amplification. Samples from the clinically infected animals, aborted fetuses or repeated blood collection can be used as the alternative materials to increase the possibility to detect the *N. caninum* DNA. This is the first study on the *N. caninum* infection in swamp buffaloes in Thailand.

ACKNOWLEDGMENT

This study was conducted at the Department of Surgery and Theriogenology, and Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University. The study was financially supported by the Teaching and Researching Innovation Grant held by Vietnamese Government, and by Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Thailand.

I wish to express my deepest gratitude to Associate Professor Suneerat Aiumlamai, my supervisor, for giving me the opportunity and resources to perform my work, for her vision on the study, eternal encouragements, for taking great interest in my work, for always making me feel welcome, and for her sentimental care of my living. I would like to gratefully thank Dr. Aran Chanlun, my co-supervisor, for his supportive discussions, sharing of the hardest jobs and for his valuable teaching in the laboratory techniques. I am thankful to Dr. Kwankate Kanistanon, my co-supervisor, for her nice advices and valuable help in statistical analysis.

My special thank to Dr. Sarthorn Porntrakulpipat, for his helpful advices and technical assistance in PCR technique, Dr. Sarinya Rerkyusuke and Mrs. Suthida Chanlun, for their technical help, collection of data and samples. Dr. Adisak Sangkeaw, Dr. Suwalak Srisupa, Mr. Suban Chansen, Dr. Thanapol Nongbua, Ms. Uthaiwan Singha, Mr. Chalermpon Mahamart, Ms. Jintana Susereedumrong, Mr. Nirattisai Chaisan, Mr. Souk Phomhaksa, for their support in the study. Mr. Supuksorn Butriang, Mr. Praiboon Surakot, Ms. Pailin Trakoonsuntirut, Ms. Jantra Sawisai, for their technical help in PCR technique. Mr. Surapong Yowarach, for his skillful help in poster preparation.

I am in debt to all of the lovely teachers and staffs at the Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, for their willing help and permanent smiles. Greatest gratitude to Dr. Apirak Utha and staffs at Khon Kaen Artificial Insemination Research Center, Department of Livestock Development, Thailand, for their kindly provision of pregnancy diagnosis records of swamp buffaloes, and also for their helpful activities in samples collection. Finally, the most special thank to my grandparents, parents, younger brother and my wife, for their endless love.

Nguyen Hoai Nam

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iii
ACKNOWLEDGEMENT	v
TABLE OF CONTENTS	vi
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
ABBREVIATIONS	xi
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1. Background	1
2. Objectives of the study	3
3. Anticipated outcome	3
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	4
1. Biology and life cycle of *N. caninum*	4
2. Transmission	7
3. Prevalence	9
4. Clinical signs	12
5. Pathogenesis of abortion in animals	14
6. Risk factors of neosporosis	16
6.1 Risks of infection	16
6.2 Risks of abortion	17
7. Diagnosis of neosporosis	18
7.1 Cell culture and bioassay	18
7.2 Histopathology and immunohistochemistry	19
7.3 Polymerase chain reaction	20
7.4 Serological methods	22
7.4.1 Enzyme linked immunosorbent assays	22

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

Page

7.4.2 Indirect fluorescent antibody test 23

7.4.3 Direct agglutination test 24

7.4.4 Immunoblot and Rapid immuno-chromatographic test 24

8. Economic losses 25

9. Prevention and control of neosporosis 27

10. Neosporosis in Thailand 29

11. Buffalo raising in Thailand 30

CHAPTER III MATERIALS AND METHODS 33

1. Investigation of the prevalence of *N. caninum* infection in swamp buffaloes in Northeast, Thailand 33

1.1 Animals 33

1.2 Sample collection and storage 33

1.3 *N. caninum* antibodies demonstration

1.4 Statistical analysis

2. Study of effects of *N. caninum* infection on the fertility of artificially inseminated swamp buffaloes 35

2.1 Synchronization and pregnancy diagnosis 35

2.2 Statistical analysis 36

3. Prevalence of *N. caninum* infection in swamp buffaloes and beef cattle reared in the same area 36

4. Demonstration of the *N. caninum* DNA in the swamp buffalo whole blood 36

4.1 DNA extraction for PCR 36

4.2 DNA amplification 37

4.3 Electrophoresis and gene bands detection 37

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

Page

CHAPTER IV RESULTS

1. Investigation of prevalence of *N. caninum* infection in swamp buffaloes in Northeast Thailand 39
2. Investigation of the effects of *N. caninum* infection on fertility of artificially inseminated swamp buffaloes 41
3. Prevalence of *N. caninum* infection in swamp buffaloes and beef cattle in Phu Wiang, Khon Kaen 42
4. Demonstration of *N. caninum* DNA in swamp buffalo whole blood 44

CHAPTER V DISCUSSION 45

1. Investigation of prevalence of *N. caninum* infection in swamp buffaloes in five provinces in Northeast Thailand
2. Study of effects of *N. caninum* infection on the fertility of artificially inseminated swamp buffaloes 50
3. Prevalence of *N. caninum* infection in swamp buffaloes and beef cattle in Phu Wiang, Khon Kaen 53
4. Demonstration of *N. caninum* DNA in swamp buffaloes whole blood by Nested- PCR 56

CHAPTER VI SUMMARY AND CONCLUSION 59

CHAPTER VII FUTURE RESEARCH DIRECTION 61

REFERENCES 63

APPENDICES 108

CURRICULUM VITAE 121

LIST OF TABLES

		Page
Table 1	Prevalence of *N. caninum* infection in swamp buffaloes in 5 provinces in Northeast Thailand	39
Table 2	Distribution of *N. caninum* positive swamp buffaloes in different groups of age	40
Table 3	Distribution of antibodies to *N. caninum* in different age groups of swamp buffaloes in Khon Kaen and Udon Thani	40
Table 4	Prevalence *N. caninum* infection in female and male swamp buffaloes	41
Table 5	Conception rate of swamp buffaloes in different hormone programs, location and serostatus	42
Table 6	Prevalence of *N. caninum* infection in different age groups of beef cattle	43
Table 7	Prevalence of *N. caninum* infection in male and female beef cattle	43
Table 8	Comparison of prevalences of *N. caninum* infection in swamp buffaloes and beef cattle in Phu Wiang, Khon Kaen	43
Table 9	Serological and Nested-PCR results in swamp buffaloes from the second collection in Phuveang, Khon Kaen	44

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	Three stages of *Neospora caninum*	4
Figure 2	Life cycle of *N. caninum*	8
Figure 3	Neosporosis map in water buffaloes	11
Figure 4	*Neospora caninum* oocysts shed by a coyote	18
Figure 5	*N. caninum* cyst in the brain of an aborted foetus	20
Figure 6	PCR product of Nc-5 fragment amplified with primer pair Np21+ and Np6+	21
Figure 7	Swamp buffaloes population map in Thailand	31
Figure 8	Map of Northeast Thailand and five provinces from which blood samples of swamp buffaloes were collected	33
Figure 9	PCR products amplified using primer pairs $Np21^{+}/Np6^{+}$ and Np9/Np10	44

ABBREVIATIONS

CIDR-B	Controlled internal drug release-bovine
CMI	Cell-mediated immune
DAT	Direct agglutination test
DNA	Deoxyribonucleic acid
d-NTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
GnRH	Gonadotrophin releasing hormone
HRP	Horseradish peroxidase
H_2O_2	Hydrogen peroxide
IgA	Immunoglobulin A
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IFAT	Indirect fluorescent antibody test
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-1α	Interleukin-1 alpha
IL-1β	Interleukin-1 beta
IL-1γ	Interleukin-1 gamma
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
Iscom-ELISA	Immuno stimulating complex enzyme linked immuno sorbent assay
ITS1	Internal transcribed spacer 1
NaOH	Sodium hydroxide

ABBREVIATIONS (Cont.)

OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
$PGF_2\alpha$	Prostaglandine F 2 alpha
PP	Percent positivity
TBE	Tris-borate-EDTA
Th1	T- helper 1
Th2	T-helper 2
UV	Ultra violet