การตรวจหาเชื้อโรทาไวรัส ในมูลลูกโคปกติ

มลิวัลย์ ชุนถนอม

บทคัดย่อ

การตรวจหาเชื้อโรทาไวรัส ใช้วิธี Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) และยืนยันผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนโดยตรง (direct electron microscope - EM) หรือ Immune electron microscope (IEM) ตัวอย่างตรวจเก็บทุกเดือนจากมูลลูกโคปกติในฟาร์มเลี้ยงโคนม จังหวัดสระบุรี จำนวนทั้งหมด 360 ตัวอย่าง ทั้งเพศผู้และเพศเมีย อายุตั้งแต่ 1 วัน จนถึง 112 วัน พบเชื้อโรทาไวรัส จำนวน 62 ตัวอย่าง (17.2%) ลูกโคที่พบเชื้ออายุน้อยที่สุด คือ 1 วัน และอายุมากที่สุด 57 วัน ลูกโคที่พบเชื้อแยกเป็นลูกโคกลุ่มอายุสัปดาห์แรก (1-7 วัน) พบ 23.5%, ลูกโคกลุ่มอายุสัปดาห์ที่สอง (8-14 วัน) พบ 33%, ลูกโคกลุ่มอายุสัปดาห์ที่สาม (15-21 วัน) พบ 14.3% และลูกโคกลุ่มอายุสัปดาห์ที่สี่ (22-28 วัน) พบ 8.1% โดยลูกโคอายุ 9 วัน พบเชื้อโรทาไวรัสมากที่สุด (8 ใน 18 ตัวอย่าง, 44.4%) รองลงมาเป็นลูกโคอายุ 8 วัน (9 ใน 21 ตัวอย่าง, 42.8%) เชื่อโรทาไวรัสพบได้ตลอดปี พบมากที่สุดในเดือนสิงหาคม (9 ใน 21 ตัวอย่าง, 30%) และพบน้อยในเดือนพฤศจิกายน (2 ใน 3 ตัวอย่าง, 6.7%) และเดือนธันวาคม (1 ใน 30 ตัวอย่าง, 3.3%)

ข้อจากรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของผู้วิจัยแต่ผู้เดียว

ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เกษตรกลาง จตุจักร กทมง 10900

บทนำ

โรทาไวรัสเป็นเชื้อไวรัสชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดปัญหาโรคท้องร่วงตั้งแต่ในเด็กแรกเกิดจนถึงสัตว์หลายชนิดทั่วไป (มลิวัลย์และเยาวภา, 2529, เยาวภาและคณะ, 2530) โรคติดต่อเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจในสัตว์ด้วย (Straub, 1981) โดยสามารถตรวจพบเชื้อโรทาไวรัสทั้งในยุโรป อเมริกา และเอเชีย เช่น พบเชื้อในลูกม้าในประเทศสหราชอาณาจักร (Flewett et al., 1975) สหรัฐอเมริกา (Conner and Darlingtion 1980) และญี่ปุ่น (Imagawa et al., 1982) พบในลูกโคประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน (Eichhorn et al., 1985) สหราชอาณาจักร (McNulty and Logal 1983) และประเทศต่าง ๆ ในยุโรป ได้แก่ ออสเตรีย ยูโกสลาเวีย เบลเยี่ยม ฝรั่งเศส เป็นต้น (Straub, 1981) แม่โคที่มีระดับภูมิต้านทานต่อเชื้อโรทาไวรัสจะถ่ายทอดผ่านน้ำนมเหลืองไปยังลูกในระยะแรกคลอด (Zaane et al., 1986) ต่อมาเมื่อระดับภูมิต้านทานลดลงจะทำให้ลูกโคมีอัตราการเป็นโรคเพิ่มขึ้น และอาจพบลูกโคเสียชีวิตจากเชื้อนี้ได้ (Hudson, 1981) ซึ่งเป็นผลมาจากสภาพขาดน้ำ หรือการติดเชื้อแทรกซ้อนของแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *E. coli* และ เชื้อไวรัสอื่น เช่น โคโรนาไวรัส (Hofmann and Arends 1981) สภาพร่างกายอ่อนแอ สภาพอากาศหนาวเย็นและความ แออัดของจำนวนสัตว์ในคอกเดียวกัน ก็จะทำให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มมากขึ้น แต่ถ้ามีสภาพร่างกายแข็งแรงจะหายได้ภายใน 3-4 วัน (มลิวัลย์และเยาวภา, 2529)

การตรวจหาเชื้อโรทาไวรัสในมูลลูกโคปกตินี้ เพื่อดูอัตราการพบเชื้อในระดับอายุต่าง ๆ ของลูกโค ซึ่งต่อไปจะได้ติดตามดูพฤติกรรมในการก่อปัญหา และนำเชื้อไปศึกษาคุณสมบัติรวมทั้งแยกชนิด (typing) อันจะเป็นประโยชน์ในแง่ระบาดวิทยา และการป้องกันต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บมูลลูกโคอายุตั้งแต่ 1 วันขึ้นไป ล้วงโดยตรงจากทางทวารหนักใส่หลอดเก็บตัวอย่าง ฟาร์มที่เก็บมูลโคเป็นฟาร์มเลี้ยงโคนมหลายฟาร์มในจังหวัดสระบุรี เริ่มจากเดือนมกราคม ถึงเดือนธันวาคม จำนวนเดือนละ 30 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 360 ตัวอย่าง

มูลลูกโค นำตรวจตามรายงาน วิธีการตรวจ ขององค์การอนามัยโลก (Almeida et al., 1979) คือ Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) ผลที่ไม่ชัดเจนจะนำมาตรวจซ้ำด้วยกล้องจุลทรรศ์อิเลคตรอนโดยตรง (direct electron microscope-EM) หรือ Immune electron microscope (IEM)

นำมูลลูกโคมาทำ 30% suspension ใน minimum essential medium - Eagle with Earle's salts (MEM) ซึ่งผสมยาปฏิชีวนะป้องกันเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อรา นำส่วนใสจากการปั่น 3,000 รอบต่อนาที ที่ 8 ^{0}C นาน 30 นาที มาปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่ 4 ^{0}C ในระบบสูญอากาศ นาน 10 นาที แยกส่วนใสนำตรวจด้วยวิธี ELISA โดยใช้วิธีการตรวจและ test kit ของ Dakopatts การยืนยันผลตัวอย่างตรวจที่ไม่ชัดเจนโดยนำส่วนใสจากการปั่นแล้ว 2 ครั้งแรกมาปั่น 30,000 รอบต่อนาที ที่ 4 ^{0}C ในระบบสูญญากาศนาน 1 ชั่วโมง 30 นาที นำส่วนตะกอนที่ได้มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศ์อิเลคตรอน โดยผสมตะกอน 1 หยดกับน้ำกลั่น 1 หยด บนแผ่นพาราฟิล์มใช้กริดทองแดง (400 mesh - copper grid) ซึ่งเคลือบด้วยฟอร์มวาร์ (formvar) และเคลือบทับด้วยคาร์บอน (carbon) แตะผิวของตะกอนผสมน้ำกลั่น ย้อมด้วยกรดฟอสฟอทังสติก (phosphortungstic acid - PTA) 1.5% ph 6 ซับน้ำบริเวณขอบกริดทิ้งไว้จนแห้ง แล้วนำมาตรวจโดยกล้องจุลทรรศ์อิเลคตรอนเพื่อหาเชื้อโรทาไวรัส

สำหรับการตรวจ IEM ใช้ส่วนใสก่อนปั่น 30,000 รอบต่อนาที ผสมกับแอนติซีรั่มจำเพาะต่อเชื้อโรทาไวรัส (ใช้ในกรณีที่มีจำนวนเชื้อน้อย) วางไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ปั่นด้วยความเร็ว 30,000 รอบต่อนาที ที่ 4 ^{0}C ที่ระบบสูญอากาศนาน 1 ชั่วโมง 30 นาที เก็บส่วนตะกอนที่ได้มาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนตามวิธีการข้างต้น

ผล

มูลลูกโคปกติ จำนวน 360 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อโรทาไวรัสจำนวน 62 ตัวอย่าง (17.2%) ตามตารางที่ 1 แบ่งแยกตามอายุ ตั้งแต่ 1 วัน จนถึง 3 เดือน 22 วัน (112 วัน) พบอัตราการติดเชื้อสูงสุดในลูกโคที่อายุ 8-14 วัน หรือสัปดาห์ที่ 2 รองลงมาเป็นช่วงอายุ 1-7 วัน หรือสัปดาห์แรกหลังคลอด ตารางที่ 2 พบเชื้อไวรัส 8 ตัวอย่าง ในจำนวน 18 ตัวอย่าง (44.4%) ของลูกโคอายุ 9 วัน และพบเชื้อ 9 ตัวอย่างในจำนวน 21 ตัวอย่าง (42.8%) ของลูกโคอายุ 8 วัน ส่วนอุบัติการณ์ของการพบเชื้อโรทาไวรัสมีตลอดปี จำนวนแตกต่างกันเล็กน้อยในแต่ละเดือน พบมากในช่วงฤดูฝนเฉพาะเดือนสิงหาคม และพบน้อยในช่วงที่มีอุณหภูมิต่ำคือ เดือนพฤศจิกายน และธันวาคม ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 1 กลุ่มอายุลูกโคปกติที่ตรวจมูลพบเชื้อโรทาไวรัส

กลุ่มอายุ		จำนวนตรวจ (ตัวอย่าง)	จำนวนพบเชื้อโรทาไวรัส (ตัวอย่าง)	อัตราพบเชื้อฯ (%)
สัปดาห์ที่	ช่วงอายุ (วัน)			
1	1 - 7	68	16	23.5
2	8 - 14	97	32	33
3	15 - 21	56	8	14.3
4	22 - 28	37	3	8.1
5	29 - 35	33	-	-
6	36 - 42	23	1[1]	4.3
7	43 - 49	12	1[2]	8.3
8	50 - 56	8	-	-
9	57 - 63	12	1[3]	8.3
10	64 - 112	14	-	-
	รวม	360	62	17.2

1. ลูกโคตรวจพบเชื้อโรทาไวรัส อายุ 1 เดือน 7 วัน
2. ลูกโคตรวจพบเชื้อโรทาไวรัส อายุ 1 เดือน 17 วัน
3. ลูกโคตรวจพบเชื้อโรทาไวรัส อายุ 1 เดือน 27 วัน

ตารางที่ 2 ข้อมูลรายละเอียดกลุ่มอายุ 3 สัปดาห์แรกจากตารางที่ 1

อายุ (วัน)	จำนวนตรวจ (ตัวอย่าง)	จำนวนพบเชื้อโรคทางไวรัส (ตัวอย่าง)	อัตราพบเชื้อฯ (%)
1	4	1	25
2	7	-	-
3	13	1	7.7
4	6	1	16.7
5	9	3	33.3
6	10	3	30
7	19	7	36.8
8	21	9	42.8
9	18	8	44.4
10	11	4	36.4
11	15	5	33.3
12	14	4	28.6
13	8	1	12.5
14	10	1	10
15	14	4	28.6
16	10	2	20
17	9	1	11.1
18	7	-	-
19	4	1	25
20	4	-	-
21	8	-	-
รวม	221	56	25.3

ตารางที่ 3 การตรวจเชื้อโรทาไวรัสในมูลลูกโคปกติตลอดปี

เดือน	จำนวนตรวจ (ตัวอย่าง)	จำนวนพบเชื้อโรทาไวรัส (ตัวอย่าง)	อัตราพบเชื้อฯ (%)
มกราคม	30	8	26.7
กุมภาพันธ์	30	4	13.3
มีนาคม	30	4	13.3
เมษายน	30	5	16.7
พฤษภาคม	30	6	20
มิถุนายน	30	5	16.7
กรกฎาคม	30	7	23.3
สิงหาคม	30	9	30
กันยายน	30	6	20
ตุลาคม	30	5	16.7
พฤศจิกายน	30	2	6.7
ธันวาคม	30	1	3.3

วิจารณ์

จากรายงานอาการท้องร่วงมีสาเหตุจากเชื้อโรทาไวรัส โคโรนาไวรัส และ *E. coli* เชื้อโรทาไวรัสจะพบในส่วนของเซลล์บุผิวส่วนปลายวิลไล (villi) ของลำไส้เล็ก ทำให้วิลไลหดสั้นมีผลเสียต่อการดูดซึมอาหารและน้ำในลำไส้ (Straub, 1981) เชื้อโคโรนาไวรัสพบในลำไส้ใหญ่ส่วน colon การติดเชื้อโรทาไวรัสสามารถทำให้เกิดอาการท้องร่วงได้ในวันแรกหลังคลอด โดยที่เชื้อโรคโรทาไวรัสทำให้ลูกโคแสดงอาการในวันที่ 5 หลังคลอด และแสดงความรุนแรงมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 (Bürki et al., 1983) สำหรับ *E. coli* พบโดยปกติในลำไส้ใหญ่อยู่แล้วและพร้อมที่จะเพิ่มจำนวนสร้าง enterotoxin ได้ตลอดเวลา ทำให้เกิดอาการท้องร่วงได้อย่างรวดเร็ว (mayr et al., 1984) จึงมีผู้ทำวัคซีนผสมระหว่างโรทาไวรัสและโคโรทาไวรัส (Freitag et al., 1984) รวมทั้งวัคซีนผสมระหว่างโรทาไวรัสและ *E. coli* K 99 (Eichhorn et al., 1982)

การตรวจพบเชื้อโรทาไวรัสในมูลลูกโคปกติถึง 17.2% (62 ตัวอย่าง จาก 360 ตัวอย่างตรวจ) เป็นเรื่องที่น่าสนใจมาก เนื่องจากลูกโคเหล่านี้ถ้าเป็นเพศเมีย ต่อไปจะกลายเป็นแม่โคที่ใช้เลี้ยงเพื่อกิจการผลิตภัณฑ์นมและเป็นแม่พันธุ์ด้วย การตรวจพบเชื้อนี้ในลูกโคอายุตั้งแต่ 1 วัน แสดงว่าเชื้ออาจแฝงอยู่ในแม่โคและแพร่ต่อมายังลูกที่ฟาร์มเลี้ยงโคนมที่ใช้เก็บตัวอย่างนี้ ลูกโคได้รับการเลี้ยงดูอย่างดีหลังคลอดโดยให้น้ำนมเหลืองจากแม่โค และต่อด้วยนมผงละลายน้ำที่มีการควบคุมคุณภาพ ทำให้สภาพร่างกายทั่วไปสมบูรณ์ แข็งแรง ปัญหาเรื่องโรคจึงมีน้อยมาก ฉะนั้นเชื้อโรทาไวรัสที่ตรวจพบในมูลจึงไม่ก่อให้เกิดอาการท้องร่วงให้เห็น แต่ในทางระบาดวิทยาลูกโคเหล่านี้จะเป็นแหล่งสะสมและแพร่เชื้อไวรัสไปสู่ลูกหลานไม่มีที่สิ้นสุด

เชื้อโรทาไวรัสมีการตรวจพบในลูกโคตลอดทั้งปี แสดงให้เห็นว่าภูมิอากาศในประเทศไทย เหมาะต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อได้เป็นอย่างดี ส่วนเดือนพฤศจิกายนและธันวาคม สภาพอากาศค่อนข้างเย็น จึงทำให้พบเชื้อในปริมาณน้อย เมื่อเทียบกับระยะเวลาอื่น ในคอกโคทั่วไปมีกลิ่นมูลและอาหารสัตว์ ทำให้มีแมลงจำนวนมาก เชื้อจากมูลสัตว์อาจติดไปกับแมลงเมื่อไปตอมอาหาร จึงเป็นการติดต่ออีกวิธีหนึ่ง แมลงทั่วไปจะพบมากในช่วงอากาศอบอุ่นและฤดูฝน แต่จะเบาบางในช่วงอากาศเย็น

ฉะนั้นเมื่อตรวจพบเชื้อไวรัสในมูลสัตว์ทั้งที่ไม่แสดงอาการท้องร่วง ก็ควรแยกสัตว์และทำลายมูลสัตว์ด้วยการฝังดินหรือใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ประจำคอก สิ่งที่ควรทำต่อไปคือการนำเชื้อโรทาไวรัสมาศึกษาถึงคุณสมบัติและแยกชนิดของเชื้อ (Typing) อันจะเป็นประโยชน์ในด้านการควบคุม ป้องกันการแพร่กระจาย และการทำวัคซีนในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

มลิวัลย์ ชุนถนอม และเยาวภา พงษ์สุวรรณ 2529 การศึกษาเชื้อโรทาไวรัสที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคท้องเสียในสุกร สัตวแพทยสาร 3(4) : 179-184

เยาวภา พงษ์สุวรรณ, วันเพ็ญ บุญวานิช และ ชื่นฤดี ไชยวสุ 2530 การศึกษาระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของโรทาไวรัส ช่วงฤดูหนาว พ.ศ. 2529-2530 วารสารสัตวแพทย์ 8(3) : 193-201

Almeida, J. D., Atanasu, P., Bradley, D. W., Gardner, P. S., Maynard, J., Schuurs, A. W., Voller, A. and Yolken, R. H. 1979 Manual for rapid laboratory viral diagnosis. WHO offset Publication 47 : 9-10

Burki, F., Schusser, G., Szekely, H. 1983. Clinical virological and serological evaluation of efficacy of per oral live Rota virus vaccination in calves under normal husbandry conditions. Zbl. Vet. Med. B. 30 : 237-250.

Conner, M. E. and Darlington, R. W. 1980. Rotavirus infection in foals. Am. J. Vet. Res. 4 : 1699-1703.

Danner, K. 1983. Virusbedingte Enteritiden beim Rind. Tierärztl. Prax. 11 : 149-161.

Eichhorn, W., Bachmann, P. A., Baljer, Go, Plank, P. und Schneider, P. 1982. Vakzinierung hochträchtiger Rinder mit einem kombinierten Rotavirus/E. coli K 99-Impfstoff zur Prophylaxe von Durchfallerkrankungen bei neugeborenen Kälbern. Tierärztl. Umschau 37 : 599-604.

Eichhorn, W., Krauss, M., Bachmann, P. A. and Mayr, A. 1985. Vorkommen und Verbreitung atypischer Rotaviren bei Kälbern in Deutschland. Tierärztl. Umschau 40(6) : 435-436.

Flewett T. H., Bryden, A. S. and Davies, H. 1975. Virus diarrhoea in foals and other animals. Vet. Rec. 96 : 477-478.

Freitag, H., Wetzel, H. und Espenkoetter, E. 1984. Zur Prophylaxe der Rota - Corona - Virusbedingten Kälberdiarrhoea. Tierärztl. Umschau 39 : 731-736.

Hofmann, W. und Arens, M. 1981. Corona -, Rota - und Parvovirusinfektionen beim Kalb aus Klinischer Sicht. Dtsch. Tierärztl. Wshr. 88 : 316-321.

Hudson, D. 1981. Rota / Corona virus vaccination of pregnant cows. Modern Vet. Pract. p. 626-628.

Imagawa, H, Hirasawa, K., Akiyama, Y. and Omori, T. 1982. A sero - epizootiological survey on rotavirus infection in foals. Jpn. J. Vet. Sci, 44 : 819-821.

Jayavasu; C. Hooniwat, Y., Sagaunwong, S., Jayavasu, J. and Chatiyanonda, K. 1982. A long term study of rotavirus infection in in Thai infants and children with diarrhea. Southeast Asian J. Trop. Med. Pulb. Hlth. Vol. 13(3) : 373-376

Mayr, A., EiBner, G. und Mayr - Bibrack, B. 1984. Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin. Paul Parey Verlag. Berlin - Hamburg.

McNulty, M. S. and Logal, E. P. 1983. Longitudinal survey of Rota virus infection in calves. Vet. Rec. 113 : 333-335.

Report of a WHO Scientific Group 1981. Rapid laboratory technique for the diagnosis of viral infections. Technical Report Series, 661 : 8-10.

Straub, O. C. 1981. Die Reovirusinfektion beim Rind. Tierärztl. Umschau 36 : 758-763.

Zaane, D. V., Ijzerman, J. and de Leeuw, P. W. 1986. Intestinal antibody response after vaccination and infection with rotavirus of calves fed colostrum with or without rotavirus antibody. Vet. Im. and Impath. 11 : 45-63.

Detection of Rotavirus in Normal Calf Feces

Maliwan Choontanom

Abstract

Rotavirus from the feces was detected by enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) and confirmed by direct electron microscopy (EM) or an immune electron microscopy (IEM). The fecal samples from dairy farms in Saraburi were collected monthly throughout the year for identification of the rotavirus. The normal three hundred and sixty calves both male and female ranging in age from 1 day to 112 days were included in this investigation. Sixty - two out of these samples (17.2%) were found positive for rotavirus. The youngest calf giving one of these positive samples was one-day-old and the oldest one was fiftyseven days old. In consideration of the positive samples from various age groups : 23.5% were from the one-week-old calf group (15-21 days) and 8.1% were from the four-week-old calf group (22-28 days). Among these positive samples, the high incidence of rotavirus was found in 9 day-old calves (8 of 18 samples : 44.4%X and in 8 day-old calves (9 of 21 samples; 42.8%). Rotavirus could be isolated from the fecal samples of the calves throughout the year. The highest rate of isolation was in August (9 of 30 samples : 30%), the lowest rate were in November (2 of 30 samples : 6.7%) and December (1 of 30 samples; 3.3%).

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University Bangkok Thailand.