

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

4.1 อุปกรณ์ในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

4.1.1 กล้องจุลทรรศน์ แบบ Compound eye พร้อมจอมอนิเตอร์

4.1.2 แผ่นสไลด์ และกระจกบางปิดแผ่นสไลด์

4.1.3 ครอบเปเปอร์

4.1.4 เครื่องชั่งน้ำหนัก ขนาด 2 กิโลกรัม

4.1.5 บีกเกอร์ ขนาด 1000 มิลลิลิตร

4.1.6 เครื่องตรวจวัดความเข้มข้นของตัวอสุจิ (SpermaCue) บริษัท Minitüb Abfüll – und Labortechnik GmbH & Co.KG., Germany

4.1.7 สีอีโอซิน (eosin) สีนิโกรซิน (nigrosin) (บริษัท Sigma Aldrich) และ โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) (บริษัท VWR International Ltd.) สำหรับทำสีย้อม เพื่อตรวจดูตัวเป็นตัวตายของ เซลล์อสุจิและเซลล์อสุจิที่มีความผิดปกติ โดยสีย้อมมีส่วนประกอบดังนี้ สีอีโอซิน 1 กรัม สีนิโกรซิน 5 กรัม และ โซเดียมซิเตรท 3 กรัม น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (ศรีสุวรรณ, 2542ข)

4.2 อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ

4.2.1 เทอร์โมมิเตอร์ ขนาด 0-100 °C

4.2.2 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

4.2.3 เตาทำความร้อน

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเติมฮอร์โมนลงในน้ำเชื้อ

5.1 ไซริงค์ อินซูลิน ขนาด 1 มิลลิลิตร

6. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมเทียม

6.1 อวัยวะเพศผู้เทียม ชนิดหัวเกลียว

6.2 หลอดพลาสติกบรรจุน้ำเชื้อ

6.3 น้ำกลั่น

- 6.4 ทรายชำระ
- 6.5 กรรไกร
- 6.6 กระตักน้ำรักษาอุณหภูมิ
- 6.7 ถังพลาสติกที่ใช้ในการรองรับน้ำเชื้อที่ไหลย้อนกลับขณะผสมเทียม
- 6.8 ไชริงค์พลาสติก ขนาด 10 มิลลิลิตร สำหรับวัดปริมาณน้ำเชื้อที่ไหลย้อนกลับ
- 6.9 น้ำเชื้อเจือจางที่เตรียมพร้อมสำหรับการผสมเทียม

7. สารเจือจางน้ำเชื้อ

7.1 สารเจือจางน้ำเชื้อสูตร Beltsville Thawing Solution (BTS) ประกอบด้วย กลูโคส 37 กรัม อีดีทีเอ 1.25 กรัม โซเดียมซิเตรต 6 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนต 1.25 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.7 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร (ศรีสุวรรณ, 2542ข)

8. ฮอร์โมน

8.1 ฮอร์โมนออกซิโตซิน (OXYTOCIN SYNTH[®] บริษัท Phenix Pharmaceuticals) ความเข้มข้น 10⁶ ไอ.ยู./มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร/ขวด

9. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจการตั้งท้อง

- 9.1 เครื่อง Real time ultrasound (Aloka 500 V)
- 9.2 น้ำมันพืช

วิธีการ

1. การคัดเลือกสุกรสาว

การจัดการสุกรสาวก่อนการเป็นสัด ในช่วงแรกสุกรสาวถูกเลี้ยงในคอกขังรวมของโรงเรือนสุกรขุนพันธุ์ ได้รับน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ (*ad libitum*) เมื่อสุกรอายุได้ 24 สัปดาห์ จะมีการคัดเลือกสุกรสาวทดแทนที่มีรูปร่างลักษณะตรงตามสายพันธุ์ มีความสมบูรณ์ของโครงสร้าง

และกระดูก อวัยวะเพศ จำนวนเต็ม สุขภาพร่างกายมีความสมบูรณ์แข็งแรงดี จะได้รับการคัดเลือกและถูกย้ายมายังหน่วยผสมพันธุ์ จากนั้นสุกรเหล่านี้จะได้รับการกระตุ้นการเป็นสัด ทำวัคซีนตามโปรแกรมที่กำหนด

2. การกระตุ้นการเป็นสัดและตรวจสัดสุกรสาว

สุกรสาวอายุ 24 สัปดาห์เมื่อย้ายเข้ามายังหน่วยผสมพันธุ์ ยังคงถูกเลี้ยงในคอกขังรวมโดยด้านหน้าคอกติดทางเดินมีลักษณะเป็นแผงเหล็กกั้นสุกรสาวสามารถมองเห็นและสัมผัสกับพ่อสุกรที่เดินตรวจสัดได้ สุกรสาวจะได้รับการกระตุ้นการเป็นสัดจากพ่อสุกรที่มีความกำหนัดสูงร่วมกับคน วันละ 2 ครั้ง เวลา 6.00-8.00 น. และ 15.00-17.00 น. เพื่อจะได้ทราบถึงช่วงระยะเวลาการเป็นสัดที่แน่นอน ขณะที่กระตุ้นการเป็นสัดเมื่อพบสุกรสาวที่แสดงอาการเป็นสัดจะทำการบันทึกข้อมูลคือ อายุและวันที่สุกรสาวเป็นสัดครั้งแรก

จากการที่ทราบว่าสุกรสาวแสดงอาการเป็นสัดครั้งแรกแล้วก็สามารถที่จะทราบช่วงเวลาที่สุกรสาวตัวนั้น ๆ จะแสดงการเป็นสัดรอบที่ 2 และ 3 ได้อย่างแม่นยำ โดยสุกรสาวที่ถูกจัดเข้ากลุ่มทดลองต้องผ่านรอบการเป็นสัดอย่างน้อย 2 ครั้ง มีอายุไม่ต่ำกว่า 8 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 135 กิโลกรัม สุขภาพร่างกายแข็งแรง ผ่านการทำวัคซีนครบตามโปรแกรมที่กำหนด และมีวงรอบการเป็นสัดที่ตรงรอบ

3. การจัดกลุ่มทดลองของสุกรสาว

แบ่งสุกรสาวออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 50 ตัว สุกรสาวแต่ละกลุ่มมีอายุและน้ำหนักดังตาราง

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยของอายุ และน้ำหนักของสุกรที่ผสมพันธุ์ในแต่ละกลุ่มทดลอง

กลุ่มทดลอง	อายุ (สัปดาห์)	น้ำหนัก (กิโลกรัม)
1	36.5	138.3
2	36.1	137.8
3	36.8	138.9
4	36.6	138.9

โดยสุกรสาวแต่ละกลุ่มทดลองจะได้รับการผสมเทียมดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 สุกรสาวได้รับการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อเจือจางที่ไม่ได้เติมฮอร์โมน ออกซีโทซิน

กลุ่มทดลองที่ 2 สุกรสาวได้รับการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อเจือจางที่เติมฮอร์โมน ออกซีโทซิน 2.5 ไอ.ยู./โด๊ส

กลุ่มทดลองที่ 3 สุกรสาวได้รับการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อเจือจางที่เติมฮอร์โมน ออกซีโทซิน 5.0 ไอ.ยู./โด๊ส

กลุ่มทดลองที่ 4 สุกรสาวได้รับการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อเจือจางที่เติมฮอร์โมน ออกซีโทซิน 7.5 ไอ.ยู./โด๊ส

ในการฉีดน้ำเชื้อให้กับสุกรสาวที่เป็นสัตว์จะมีการเติมฮอร์โมนออกซีโทซินลงในน้ำเชื้อทุกครั้ง น้ำเชื้อเจือจางที่ฉีดให้กับสุกรสาวแต่ละตัวจะมีตัวอสุจิมีชีวิตเฉลี่ย 4×10^9 ตัว และมีปริมาตรเท่ากับ 90 มิลลิลิตร สุกรสาวจะได้รับการผสมเทียมอย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการผสมติด และผสมครั้งที่ 3 อีกครั้งในกรณีที่สุกรสาวยังมีอาการยืนนิ่งอยู่ เพื่อให้ครอบคลุมระยะตกไข่ให้มากที่สุด

4. การรีดเก็บน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์

ก่อนที่จะทำการรีดน้ำเชื้อ ทำการอาบน้ำพ่อสุกรก่อนรีดน้ำเชื้อทุกครั้ง การรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อสุกรแต่ละตัวจะทำในช่วงเช้าเวลา 5.30-7.00น. และช่วงเย็น เวลา 14.30-16.00น. ของแต่ละวันที่ทำการทดลอง ใช้วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อปฏิบัติตามคู่มือปฏิบัติการผสมเทียมในสุกร (ศรีสุวรรณ, 2542) เมื่อรีดเก็บได้แล้วนำน้ำเชื้อใส่กระติกโดยควบคุมอุณหภูมินำมายังห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อต่อไป

5. การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อสุกร

ลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อที่ตรวจ ประกอบด้วย

5.1 วัดปริมาตร ชั่งน้ำหนักของน้ำเชื้อ โดยใช้เครื่องชั่ง จากนั้นคำนวณกลับเป็นปริมาตร โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ปริมาตร (มิลลิลิตร)} = \text{น้ำหนักของน้ำเชื้อ (กรัม)} \times 0.95$$

5.2 การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ ตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

5.3 ตรวจสอบความผิดปกติของรูปร่างตัวอสุจิ ตัวเป็นและตัวตาย โดยสีย้อมนิโกร- อีโอซิน

5.4 ความเข้มข้นของตัวอสุจิ ตรวจวัดความเข้มข้นโดยใช้เครื่องวัดความเข้มข้น

SpermaCue Photometer

6. การกำหนดคุณภาพน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อสดที่นำมาใช้ในการทดลองต้องผ่านมาตรฐานที่กำหนดไว้ดังต่อไปนี้

6.1 คะแนนการเคลื่อนไหวแบบกลุ่ม ระดับ 3 ขึ้นไป

6.2 การเคลื่อนไหวไปข้างหน้าไม่ต่ำกว่าร้อยละ 70

6.3 การมีชีวิตของอสุจิไม่ต่ำกว่าร้อยละ 80

6.4 เซลล์อสุจิผิดปกติไม่เกินร้อยละ 20

น้ำเชื้อที่ผ่านมาตรฐานที่กำหนดจะถูกเจือจางเป็นขั้นตอนต่อไป

7. การเจือจางน้ำเชื้อและการบรรจุน้ำเชื้อสด

นำน้ำเชื้อสุกรที่ได้มาเจือจางโดยใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อสูตร บีทีเอส ทำการเจือจางน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส น้ำเชื้อที่เจือจางแล้วมีความเข้มข้นของตัวอสุจิมีชีวิตเฉลี่ย 4×10^9 ตัว/มิลลิลิตร นำน้ำเชื้อเจือจางมาบรรจุลงในภาชนะบรรจุน้ำเชื้อแบบหลอด

พลาสติกโดยให้มีปริมาตร 90 มิลลิลิตร น้ำเชื้อที่บรรจุลงในหลอดพลาสติกเรียบร้อยแล้วจะถูกนำไปใช้ในการผสมเทียมทันที

8. การผสมเทียมให้กับสุกรสาว

พยายามจัดให้สุกรสาวเป็นสัดพร้อมกันในเวลาเดียวกันให้มากที่สุด และสุ่มสุกรสาวที่เป็นสัดยืนนิ่งเพื่อเข้าผสมเทียมในแต่ละกลุ่มให้พร้อมกัน และใช้น้ำเชื้อจากพ่อสุกรตัวเดียวกัน สุกรสาวที่ผสมจะเป็นสัดรอบที่ 3 การผสมเทียมครั้งแรกจะผสมหลังจากสุกรสาวมีอาการยืนนิ่งกับพ่อสุกร 8-12 ชั่วโมง หรือผสมเทียมทันทีเมื่อมีอาการยืนนิ่งกับคน ผสมครั้งที่ 2 8-12 ชั่วโมงถัดมา หรือถ้าสุกรยังนิ่งอยู่จะผสมครั้งที่ 3 ห่างจากผสมครั้งที่ 2 8-12 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำน้ำเชื้อเจือจางไปฉีดให้กับสุกรสาวที่เป็นสัดแต่ละตัวจะทำการเติมฮอร์โมนออกซิโทซินลงในน้ำเชื้อ โดยใช้ไซริงค์อินซูลินขนาด 1 มิลลิลิตรดูดฮอร์โมนออกซิโทซินที่มีความเข้มข้นตามการจัดสุกรเข้ากลุ่มการทดลองที่มี 4 กลุ่ม และด้อนพ่อสุกรมาขังไว้ด้านหน้ากรงสุกรสาว เพื่อกระตุ้นให้สุกรสาวยืนนิ่งและยอมรับน้ำเชื้อมากขึ้นพร้อมกับการสอดทวารวางทับบนหลังสุกรสาว ทำการผสมเทียมโดยใช้อุปกรณ์อวัยวะเพศผู้เทียมแบบหัวเกลียว (spirette catheter) นำถุงพลาสติกใสใช้เป็นภาชนะสำหรับรองรับน้ำเชื้อที่อาจไหลย้อนกลับขณะผสมเทียม ในระหว่างผสมเทียมผู้ผสมจะใช้มือดึงสี่ข้างและถูไปมาบริเวณราวนมจนกว่าน้ำเชื้อในหลอดพลาสติกจะไหลเข้าไปในมดลูกจนหมด เมื่อสุกรสาวแต่ละตัวได้รับการผสมเทียมครั้งสุดท้ายแล้วจะถูกแยกขังไว้เพื่อรอผลการตั้งท้อง ทำการตรวจสัดหลังจากผสมเทียม 21 ± 3 วัน เช้าและเย็น เวลา 6.00-8.00 น. และ 15.00-17.00 น. โดยใช้พ่อสุกรตรวจสัดร่วมกับคน บันทึกข้อมูลการกลับสัดของสุกร และหลังผสมเทียมได้ 35 วันจะทำการตรวจการตั้งท้องอีกครั้งด้วยเครื่อง Real time ultrasound

9. การบันทึกข้อมูลขณะที่มีการผสมเทียมสุกรสาว

- 9.1 เบอร์สุกรสาวที่ได้รับการผสมเทียม
- 9.2 ช่วงเวลาที่ได้รับการผสมเทียม (เช้า-เย็น)
- 9.3 ระยะเวลาในการฉีดน้ำเชื้อ (นาที)
- 9.4 ความยาวของท่อผสมเทียมที่สอดเข้าไปในมดลูกได้ (เซ็นติเมตร)
- 9.5 จำนวนครั้งที่ผสม
- 9.6 ปริมาตรน้ำเชื้อที่ไหลย้อนกลับขณะผสม (มิลลิลิตร)

9.7 ชื่อคนที่ฉีดน้ำเชื้อ

10. การให้น้ำและอาหาร

10.1 การให้อาหารพ่อสุกร ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 1.2 กิโลกรัม/ตัว/วัน

10.2 การให้อาหารแม่สุกรสาวก่อนเป็นสัด 10-14 วัน วันละ 5 ครั้ง คือ 06.00 น. 9.00น. 11.00น. 14.00น. และ 16.00 น. โดยให้กินอย่างเต็มที่

10.3 สุกรสาวที่ผสมเทียมแล้วจะได้รับอาหารตามที่กำหนดและน้ำอย่างเต็มที่ โดยช่วง 4 สัปดาห์แรกหลังผสมเทียมได้รับอาหารวันละ 1.2-1.5 กิโลกรัม/วัน จากนั้นอายุตั้งท้องได้ 4-12 สัปดาห์ จะได้รับอาหารวันละ 1.8-2.5 กิโลกรัม/วัน และอายุตั้งท้อง 12 สัปดาห์ขึ้นไป ได้รับอาหารวันละ 2.8-3.0 กิโลกรัม/วัน การให้อาหารจะพิจารณาเป็นรายตัวซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับหุ่นของแม่สุกร จนกระทั่งสุกรมีระยะอู่มท้อง 111 วัน ลดปริมาณอาหารลงวันละ 0.5 กิโลกรัม จากอาหารที่ได้รับปกติ เมื่อแม่สุกรใกล้คลอด

11. การบันทึกข้อมูลหลังการผสมเทียม

11.1 จำนวนสุกรสาวที่กลับสัด 21 ± 3 วัน

11.2 จำนวนสุกรสาวที่กลับสัด 35 วัน

11.3 จำนวนสุกรสาวที่ผสมติด

11.4 จำนวนสุกรสาวที่แท้ง

11.5 จำนวนสุกรสาวที่เข้าคลอด

12. การบันทึกข้อมูลหลังแม่สุกรคลอดลูก

12.1 จำนวนลูกสุกรแรกคลอดทั้งหมดต่อครอก

12.2 จำนวนลูกสุกรมีชีวิตแรกคลอดต่อครอก

12.3 จำนวนลูกสุกรตายแรกคลอดต่อครอก

12.3 จำนวนลูกกรอก

12.4 จำนวนลูกพิการ (ลูกสุกรพิการตั้งแต่กำเนิด เช่น ขางาง ไม่มีรูทวาร เป็นต้น)

13. แผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) มีแบบ
หุ่นจำลองทางสถิติดังนี้

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

โดยที่ Y_{ij} = ค่าสังเกตที่ได้จากกลุ่มทดลองที่ $i = (1, 2, 3, 4)$ ซ้ำที่ $j = (1 \dots 50)$

i = เต็มฮอร์โมนออกซีโทซิน 4 ระดับ คือ 0, 2.5, 5.0 และ 7.5 ไอ.ยู.

j = ทำการทดลองทั้งหมด 50 ซ้ำ

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดในการทดลอง

T_i = อิทธิพลของกลุ่มทดลองที่เต็มฮอร์โมนออกซีโทซิน 4 ระดับ คือ 0, 2.5, 5.0 และ 7.5 ไอ.ยู.

ϵ_{ij} = ค่าความคลาดเคลื่อน

เมื่อพบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างโดย
วิธี Duncan's new multiple range test อัตราผสมติด อัตราเข้าคลอดวิเคราะห์โดยวิธี Chi – square
test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS (1998)

สูตรการหาค่า อัตราการผสมติด = $\frac{\text{จำนวนแม่สุกรที่ผสมติด ไม่มีการกลับสัดภายใน 21±3 วัน}}{\text{จำนวนแม่สุกรที่ผสมทั้งหมด}} \times 100$

อัตราการเข้าคลอด = $\frac{\text{จำนวนแม่สุกรที่เข้าคลอดทั้งหมด}}{\text{จำนวนแม่สุกรที่ผสมทั้งหมด}} \times 100$

14. สถานที่ทำการทดลอง

บริษัทอะกริฟีด แอนด์ ไลฟ์สต็อก จำกัด ม.9 ต.เขาขลุง อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี

15. ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มการทดลองเดือนตุลาคม พ.ศ. 2549

สิ้นสุดการทดลองเดือนเมษายน พ.ศ. 2550