

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

สัตว์ทดลอง

ทำการศึกษาในโคนมลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน ($HF \geq 75\%$) จากฟาร์มของเกษตรกร ขนาดประมาณ 400 ตัว ในจังหวัดนครราชสีมา ตั้งแต่เดือนมกราคม 2551 ถึง พฤษภาคม 2552 โดยทำการศึกษาในแม่โคนมลำดับท้องที่ 1 (lactation ที่ 1) จำนวน 37 ตัว แบ่งการศึกษาออกเป็นสองช่วง

ช่วงที่ 1 (กลุ่มที่ 1) คลอดลูกระหว่างเดือนมกราคม-เมษายน (แม่โคที่คลอดในช่วงอากาศร้อน) จากข้อมูลที่บ้านทึกโดยกรมอุตุนิยมวิทยาในปี พ.ศ. 2547-2550 พบว่า อุณหภูมิในช่วงนี้มีค่าเฉลี่ย 28.49°C โดยมีช่วงของอุณหภูมิตั้งแต่ $23.03 - 34.41^{\circ}\text{C}$ และมีความชื้นเฉลี่ย 66.88%

ช่วงที่ 2 (กลุ่มที่ 2) คลอดลูกระหว่างเดือนกันยายน-ธันวาคม (แม่โคที่คลอดในช่วงอากาศเย็น) อุณหภูมิในช่วงนี้มีค่าเฉลี่ย 27.37°C โดยมีช่วงของอุณหภูมิตั้งแต่ $22.74 - 32.27^{\circ}\text{C}$ และมีความชื้นเฉลี่ย 71.21%

ทำการเริ่มเก็บข้อมูลและตัวอย่างตั้งแต่ประมาณ 1 เดือนก่อนคลอด และเก็บข้อมูลจนถึงตรวจการตั้งท้องในวันที่ 60 -90 วันหลังผสม แม่โคได้รับอาหารโดยคำนวณตามความต้องการทางโภชนาของแต่ละระยะ ให้ต้นข้าวโพดหมักเป็นอาหารหยาบหลักและเสริมด้วยหญ้าแห้ง (หญ้าแพงโกล่า) ฟางข้าว หรือหญ้าสด (กินนี้สีม่วง) ผสมอาหารข้นแยกต่างหากจากอาหารหยาบ โดยให้แม่โคกินพร้อม ๆ กัน มีน้ำให้กินเต็มที่ตามความต้องการ แม่โคได้รับการเลี้ยงแบบปล่อยอิสระในโรงเรือน แม่โคที่ได้รับเลือกเข้ามาในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นแม่โคที่สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ปราศจากปัญหาในระหว่างและหลังการคลอด เช่น การคลอดยาก ภาวะรกค้างและมดลูกอักเสบ การดำเนินงานวิจัยนี้เป็นไปตามข้อกำหนดว่าด้วยจรรยาบรรณการใช้สัตว์โดยสภาวิจัยแห่งชาติ และได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การให้คะแนนความสมบูรณ์ของร่างกายและประเมินน้ำหนักตัว

ทำการประเมินคะแนนความสมบูรณ์ของร่างกายตั้งแต่ก่อนคลอดที่ 4 และ 2 สัปดาห์ก่อนวันครบกำหนดคลอดตามประวัติการผสม และหลังจากคลอดจะทำการให้คะแนนทุก ๆ สัปดาห์จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 12 หลังคลอด โดยให้คะแนนในระบบ 5 คะแนนโดยที่คะแนน 1.0

หมายถึงผอมมาก และคะแนน 5.0 หมายถึงอ้วนมากให้ความละเอียดของคะแนนที่ 0.25 (Ferguson et al., 1994) แม่โคทุกตัวได้รับการประเมินและให้คะแนนโดยบุคคล ๆ เดียวตลอดการวิจัย ทำการประเมินและจัดบันทึกน้ำหนักโคโดยใช้สายวัดรอบอกในทุก ๆ ครั้งที่ทำการให้คะแนนความสมบูรณ์ของร่างกาย

การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างนมเพื่อตรวจประเมินการทำงานของรังไข่หลังคลอด จะเก็บเก็บสัปดาห์ละ 2 ครั้ง ตั้งแต่สัปดาห์แรกหลังคลอดจนกระทั่งตรวจพบการเป็นสัดและผสมครั้งแรกหรือถึงสัปดาห์ที่ 12 ในกรณีที่ตรวจไม่พบการเป็นสัด ในการเก็บตัวอย่างน้ำนม ทำการเก็บก่อนที่จะสวมหัวรีดเพื่อรีดนมตามปกติ ทำการรีดนมทั้งประมาณ 3-4 ครั้ง แล้วรีดจากเต้านมใส่ในขวดพลาสติกโดยตรงและทำการเก็บจากทุกเต้านม โดยทำการเก็บตัวอย่างนมใส่ลงในขวดพลาสติกขนาด 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20°C ก่อนนำไปตรวจวัดระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดโคนหาง (coccygeal vein) เพื่อตรวจสารเมตาบอไลต์ในเลือด ทำการเก็บเลือดในสัปดาห์ที่ 4 และ 2 ก่อนครบกำหนดคลอด และทำการเก็บตัวอย่างเลือดสัปดาห์ละ 1 ครั้งหลังคลอด จนกระทั่งแม่โคได้รับการผสมหรือสัปดาห์ที่ 12 หลังคลอด ในการเก็บตัวอย่างเลือดทำการเก็บโดยใช้หลอดสุญญากาศบรรจุสารกันเลือดแข็งตัว (EDTA) ขนาด 9 มล. ทำการปั่นเลือดทันทีหลังจากเก็บที่ 2,000 รอบ/นาที แยกพลาสมาใส่ลงในหลอด microtube และเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งทำการตรวจวิเคราะห์

ทำการผสมเทียมเมื่อแม่โคแสดงอาการเป็นสัด และเก็บเลือดเพิ่มเติมเพื่อประเมินการตายของตัวอ่อน โดยทำการเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง คือในวันที่ผสม วันที่ 12 และวันที่ 21 หลังผสม เพื่อตรวจฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและในวันที่ 30 - 45 เพื่อตรวจวัดระดับของ Pregnancy Specific Protein B (PSPB) โดยใช้หลอดเก็บเลือดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งตัว ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัวแล้วนำไปปั่นแยกเอาซีรัมและเก็บซีรัมที่ -20°C จนกระทั่งทำการตรวจวิเคราะห์

การจับสัดและการผสมเทียม

ทำการตรวจจับการเป็นสัดวันละ 2 ครั้ง ๆ ละอย่างน้อยครั้งละ 30 นาที ในช่วงเช้ามีด (06.00 น) และตอนเย็นหัวค่ำ (17.00 น) โดยนายสัตวแพทย์ประจำฟาร์ม นอกจากการสังเกตการเป็นสัดทั้งสองช่วงแล้ว ระหว่างปฏิบัติงานประจำวัน เมื่อพบแม่โคแสดงอาการเป็นสัดในช่วงเวลาอื่นก็จะแจ้งเจ้าหน้าที่ผสมเทียมให้ดำเนินการผสมเทียมอีกด้วย ทำการผสมเมื่อพบว่าโคเป็นสัดยืนยันนี้ ใช้ระบบการผสม AM/PM คือเป็นสัดเช้าผสมเย็น และเป็นสัดเย็นผสมเช้า และซ้ำอีกครั้ง 12 ชั่วโมงต่อมา โดยเจ้าหน้าที่ที่มีความชำนาญและใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการรับรองคุณภาพ

การประเมินประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์

ทำการประเมินประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ในแม่โคจากค่าพารามิเตอร์คือ ระยะห่างระหว่างคลอดและการผสมครั้งแรก (intervals between calving and first AI) ระยะห่างระหว่างคลอดถึงผสมติด (intervals between calving and conception) อัตราการผสมติด (conception rate) และจำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติด (service per conception) โดยทำการจดบันทึกข้อมูลทางระบบสืบพันธุ์ของแม่โคที่ทำการทดลอง คือ หมายเลขแม่โค วันคลอด วันที่แสดงอาการเป็นสัดในแต่ละครั้ง วันที่ผสมในแต่ละครั้ง วันที่ผสมติด และวันคลอด

การตรวจการตั้งท้อง

ทำการตรวจท้องในแม่โคที่ได้รับการผสมและไม่มีประวัติการกลับมาเป็นสัดหลังการผสมนั้น ๆ โดยนายสัตวแพทย์ประจำฟาร์ม ณ วันที่ 60-90 หลังผสม โดยการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนักและ/หรือตรวจด้วยเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (อัลตราซาวด์)

การจดบันทึกปริมาณน้ำนม

ทำการชั่งและจดบันทึกปริมาณน้ำนมที่รีดได้ต่อวันของแม่โครายตัวสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยอ่านค่าจากกระบอกชั่งน้ำหนักสำหรับวัดปริมาณการผลิตน้ำนมรายตัว

การบันทึกอุณหภูมิและความชื้นประจำวัน (THI)

เครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้นอัตโนมัติถูกตั้งโปรแกรมให้ทำการบันทึกอุณหภูมิและความชื้น ๆ ทุก ๆ 1 ชั่วโมง โดยติดตั้งเครื่องบันทึกไว้บริเวณตรงกลางของโรงเรือน สูงจากพื้นประมาณ 2.5 เมตร และในการศึกษาครั้งนี้แม่โคนมที่อยู่ในกลุ่มที่ศึกษาอยู่ในโรงเรือนเดียวกันทั้งหมด คำนวณค่า THI โดยใช้สูตร (Garcia-Ispierto et al., 2007)

$$THI = (0.8 * \text{Mean Temp}) + (\text{RH}/100) * (\text{Mean Temp} - 14.4) + 46.4$$

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

ทำการตรวจวัดค่าต่าง ๆ คือ

- ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone) ในน้ำนมโดยวิธี EIA ด้วยชุดตรวจ Ovucheck[®] Milk ELISA (Biovit Inc., Saint-Hyacinthe, Canada)
- ระดับความเข้มข้นของ IGF-1 ในกระแสเลือด ด้วยชุดตรวจ Active[®] IGF-1 ELISA (Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Texas, USA.)
- ระดับคอร์ติซอล (Cortiso) ด้วยชุดตรวจ Active[®] Cortisol EIA (Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Texas, USA.)

- ระดับ Non-esterified fatty acids ด้วยชุดตรวจ NEFA C kits (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Co., Osaka, Japan)
- ค่า Pregnancy Specific Protein B ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจ BOVINE PREG-TEST 29[®] (Biovit Inc., Saint-Hyacinthe, Canada)

การกลับมาทำงานของรังไข่ (Ovarian resumption)

หลังจากการตรวจระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนแล้ว ทำการจำแนกชนิดของของการกลับมาทำงานของรังไข่ ตามรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน การจำแนกว่ามี luteal activity หลังคลอดเมื่อระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมตั้งแต่ 3 ng/mL อย่างน้อยในสองตัวอย่างที่เก็บติดกัน และกำหนดให้การตกไข่เกิดขึ้น 5 วันก่อนวันที่มีการเพิ่มขึ้นครั้งแรกของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมากกว่าหรือเท่ากับ 3 ng/mL การกลับมาทำงานของรังไข่หลังคลอดเกิดขึ้นเมื่อมีการตกไข่เกิดขึ้น และตามมาด้วยวงจรการเปลี่ยนแปลงของวงจรรังไข่ (ovarian cycle) แบบปกติ คือมีช่วงระยะ luteal phase ประมาณ 2 สัปดาห์ และ follicular phase ประมาณ 1 สัปดาห์ โคจะถูกจัดเป็นกลุ่มตามชนิดของ ovarian resumption ดังนี้ (Shrestha et al., 2004, 2005)

กลุ่มที่ 1 Normal resumption: มีการตกไข่เกิดขึ้นภายใน 45 วันหลังคลอดและมีการ

เปลี่ยนแปลงของวงจรรังไข่ (ovarian cycle) แบบปกติ

กลุ่มที่ 2 Delayed first ovulation หรือ anovulation: การตกไข่เกิดขึ้นมากกว่า 45 วันหลังคลอด

กลุ่มที่ 3 Prolong luteal phase: มีการตกไข่เกิดขึ้นภายใน 45 วันหลังคลอดแต่มีอย่างน้อย 1 ovarian cycle มี luteal phase (progesterone > 3 ng/L) มากกว่า 20 วัน

กลุ่มที่ 4 Short luteal phase: มีการตกไข่เกิดขึ้นภายใน 45 วันหลังคลอดแต่มีอย่างน้อย 1 ovarian cycle (ยกเว้น first cycle) มี luteal activity < 10 วัน

กลุ่มที่ 5 Cessation of cyclicity: มีการตกไข่เกิดขึ้นภายใน 45 วันหลังคลอดแต่ไม่มี luteal activity > 14 วัน ระหว่าง luteal phase ที่ 1 และ 2

อุบัติการณ์การสูญเสียตัวอ่อนในโคนม (Embryonic loss) (Humblot, 2001)

แบ่งชนิดการสูญเสียตัวอ่อนในโคนมโดยพิจารณาจากระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดหลังผสมร่วมกับ ระดับของ Pregnancy Specific Protein B และประวัติการเป็นสัดและการผสม โดยมีหลักเกณฑ์ในการแบ่งดังนี้

1. ทำการผสมในช่วง luteal phase: ระดับของโปรเจสเตอโรนในเลือดมากกว่า 1.5 ng/mL ในวันที่ทำการผสม

2. ไม่มีการปฏิสนธิหรือมีการตายของตัวอ่อนระยะต้น (Non-fertilization/Early Embryonic Mortality): ระดับโปรเจสเตอโรนน้อยกว่า 1.5 ng/mL ในวันที่ทำการผสมและวันที่ 21 หลังผสม กลับเป็นสัตว์ตรงรอบ ตรวจไม่พบ PSPB
3. ตัวอ่อนตายระยะท้าย (Late embryonic mortality): ระดับโปรเจสเตอโรนน้อยกว่า 1.5 ng/mL ในวันที่ทำการผสมและมากกว่า 1.5 ng/mL ในวันที่ 21 หลังผสมตรวจพบ PSPB ไม่มีการตั้งท้อง
4. ท้อง: ระดับโปรเจสเตอโรนน้อยกว่า 1.5 ng/mL ในวันที่ทำการผสมและมากกว่า 1.5 ng/mL ในวันที่ 21 หลังผสมตรวจพบ PSPB ไม่มีการกลับสัดและผสมซ้ำ ตรวจพบการตั้งท้อง

การจัดการข้อมูลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

แบ่งโคออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นโคที่คลอดในเดือนมกราคม ถึง เดือนเมษายน และกลุ่มที่ 2 คือโคที่คลอดในเดือนกันยายนถึงเดือนธันวาคม และเนื่องจากโคที่มีชนิดของ ovarian resumption แบบ Prolonged luteal phase และ Cessation of cyclicity มีน้อยจึงจัดแบ่งชนิดของ ovarian resumption เป็นสองกลุ่มคือ กลุ่ม Normal resumption และ กลุ่ม Abnormal resumption (Delayed ovulation, Prolonged luteal phase, Cessation of cyclicity) ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS (SAS[®], Version 9; SAS Institute, Cary, NC, USA) สัตว์ส่วนโคที่มี Normal และ Abnormal resumption และโคที่ตั้งท้องจากการผสมครั้งแรก (first service conception) ทำการวิเคราะห์โดย Chi square ใช้ PROC GLM ทำการวิเคราะห์ระยะห่างระหว่างคลอดลูกถึงผสมติดครั้งแรก (interval between calving and first AI), ระยะเวลาท้องว่าง (days open) ข้อมูลที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measure) คือน้ำหนัก, BCS, IGF-1, NEFA, Cortisol ทำการวิเคราะห์โดยใช้ Proc Mixed Analysis