

วิธีดำเนินการทดลอง

สัตว์ทดลองและรูปแบบการวิจัย

แม่โคลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียน ($HF \geq 75\%$) หลังคลอด ถูกคัดเลือกแบบสุ่ม จำนวน 48 ตัว ลำดับคลอด (parity) ที่ 1 – 4 ทั้งนี้การให้อาหารเป็นไปตามความต้องการทางโภชนาของแม่โครีดนม (NRC, 2001) และการให้น้ำไม่จำกัด (*ad libitum*) แม่โคทั้งหมดถูกเลี้ยงอยู่ในฟาร์มแบบปล่อยอิสระ (free stall system) ในอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยระหว่าง 2 สัปดาห์ก่อนคลอด ถึง 10 สัปดาห์หลังคลอด โดยการบันทึกข้อมูลทางคลินิก การประเมินน้ำหนักตัวและความสมบูรณ์ของร่างกาย การประเมินการทำงานของรังไข่หลังคลอด การตรวจวิเคราะห์ค่าชีวเคมีในเลือด และพารามิเตอร์ทางการสืบพันธุ์

ทั้งนี้ ขั้นตอนการปฏิบัติงานวิจัยทั้งหมดเป็นไปตามข้อกำหนดว่าด้วยจรรยาบรรณการใช้สัตว์ โดยสภาวิจัยแห่งชาติ และได้ผ่านการรับรองแล้วจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

การบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูลทางคลินิก

จดบันทึกเบอร์แม่โค ประวัติวันคลอด และข้อมูลทางการสืบพันธุ์อื่น ๆ วันที่เป็นสัดหลังคลอดแต่ละครั้งที่สังเกตพบ วันที่ผสมเทียมแต่ละครั้งหลังคลอด วันที่ตั้งท้อง จำนวนแม่โคที่ถูกคัดทิ้ง ของกลุ่มแม่โคที่ทำการศึกษามารวบรวม และวิเคราะห์ข้อมูล โดยจำแนกตามรูปแบบการทำงานของรังไข่หลังคลอดจากผลการตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ได้ เพื่อเปรียบเทียบและศึกษาหาความสัมพันธ์ทางสถิติต่อไป

การประเมินความสมบูรณ์ของร่างกายและน้ำหนักตัว

ทำการประเมินความสมบูรณ์ของร่างกายและน้ำหนักตัวของแม่โคแต่ละตัว 1 ครั้งต่อสัปดาห์ โดยการประเมินค่าคะแนนความสมบูรณ์ของร่างกาย (body condition score) ในระบบ 5 เกรด (0 – 5) ความละเอียดของหน่วยวัด = 0.25 และวัดความยาวเส้นรอบหน้าอกด้วยสายวัด โดยเจ้าหน้าที่สัตวบาลประจำโรงเรียน สัปดาห์ละ 1 ครั้ง คนเดียวตลอดการทดลอง

การเจาะเลือดและการเก็บตัวอย่างซีรัม

ทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดที่หาง สัปดาห์ละ 1 ครั้งในช่วงก่อนคลอด และสัปดาห์ละ 2 ครั้งในช่วงหลังคลอด โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 21-G ยาว 1 นิ้ว และหลอดสุญญากาศที่ไม่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว 6 มล. (BD Vacutainer®, Becton Dickinson Ltd., Thailand) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง ก่อนนำ

ตัวอย่างเลือดมาปั่นด้วยความเร็ว $1,000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที แยกเก็บตัวอย่างซีรัมที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการต่อไป

การประเมินการทำงานของรังไข่ของแม่โคหลังคลอด

ประเมินการทำงานของรังไข่ของแม่โคหลังคลอด โดยการตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) ในตัวอย่างซีรัม สัปดาห์ละ 2 ครั้งหลังคลอดโดยวิธีเอนไซม์อิมมูโนเอสเซ (enzyme immunoassay, EIA) ตามที่มีรายงานโดย Munro และ Stabenfeldt (1984) และด้วยวิธีเดียวกัน ซึ่งปรับปรุงโดย Kornmatitsuk และคณะ (2007) ทั้งนี้ค่า intra-assay coefficients และ inter-assay coefficients of variation ของการตรวจวิเคราะห์มีค่าเท่ากับ 8.0% และ 14.0% ตามลำดับ

การตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดไขมัน ชนิด non-esterified

ตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของกรดไขมันชนิด non-esterified จากตัวอย่างซีรัมของแม่โคนมในช่วงสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ก่อนคลอด (2 – 8 วัน และ 9 – 14 วันก่อนคลอดตามลำดับ) ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป Ranbut NEFA® (Randox Laboratories Ltd., United Kingdom) โดยวิธี End-point Colorimetric Method วัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance value) ของสารมาตรฐานและตัวอย่างซีรัม ที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร ก่อนนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของกรดไขมัน ชนิด non-esterified ในตัวอย่างซีรัมที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยค่า Linearity ของกราฟมาตรฐานจาก 0 – 2.0 มิลลิโมล/ลิตร $R^2 \geq 0.99$

การตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรท

ตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของสารเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรท จากตัวอย่างซีรัมของแม่โคนม ในช่วงสัปดาห์ที่ 1, 2, 3, 5 และ 7 หลังคลอด ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป Ranbut (D-3-hydroxybutyrate)® (Randox Laboratories Ltd., United Kingdom) โดยวิธี Kinetic Enzymatic Method อาศัยหลักการ oxidation ของเอนไซม์ D-3-hydroxybutyrate ไปเป็น acetoacetate ด้วยเอนไซม์ 3-Hydroxybutyrate dehydrogenase และการลดลงของค่า cofactor NAD^+ ไปเป็น NADH ก่อนทำการวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance value) ที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร และนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของสารเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรทในตัวอย่างซีรัมที่ได้ ค่า lower detection limit ของชุดทดสอบ เท่ากับ 0.1 มิลลิโมล/ลิตร

โปรแกรมการเหนี่ยวนำการตกไข่ และการประเมินประสิทธิภาพการสืบพันธุ์

ในวันที่ 70 หลังคลอด แมโคเข้าสู่โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ ด้วยโปรแกรม Ovsynch + CIDR ร่วมกับการผสมเทียมแบบกำหนดเวลา (timed AI) พร้อมเก็บข้อมูลทางการสืบพันธุ์ของแมโคที่ทำการทดลอง ได้แก่ เบอร์แมโค วันที่คลอด ปัญหาสุขภาพในช่วงคลอด (ถ้ามี) วันที่เป็นสัดหลังคลอด วันที่ผสมเทียม วันที่ตั้งท้อง และจำนวนแมโคที่ถูกคัดทิ้ง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

สถิติเชิงพรรณนาแสดงโดยค่าเฉลี่ย (mean) ค่า Standard Error of the Mean (SEM) และข้อมูลในรูปแบบตารางการแจกแจงความถี่ (frequency table) และค่าเปอร์เซ็นต์ เป็นต้น การทดสอบทางสถิติใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ทางสถิติสำเร็จรูป SPSS version 16 (SPSS Inc., IL, USA) โดยทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าพารามิเตอร์ด้วย Procedure Mixed between-within subjects analysis of variance และทดสอบความแตกต่างของพารามิเตอร์ 2 กลุ่ม ด้วยวิธีทดสอบ Tukey test และ/หรือ Dunnett's test ส่วนการทดสอบค่าทางสถิติของพารามิเตอร์ชนิดคุณภาพ/แจกแจงความถี่ ใช้วิธีการทดสอบ Fisher's exact test และ Chi-square test โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

เอกสารอ้างอิง

- Kornmatitsuk B, Thitaram C, Kornmatitsuk S, 2007: Measurement of faecal progesterone metabolites and its application for early screening of open cows post-insemination. *Reprod. Domest. Anim.* 42(3), 238 – 342.
- Munro C, Stabenfeldt G, 1984: Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J. Endocrinol.* 101, 41 – 49.
- NOAA, 1976: Livestock hot weather stress. United States Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Weather Service Central Region, Regional Operations Manual Letter C-31-76.
- NRC, 2001: Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th revised edition. National Academy Press, Washington, DC. 381 pp.