บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

<u>การทดลองที่ 1</u>

สุกรพ่อพันธุ์และการเตรียมน้ำเชื้อสด

สุกรพ่อพันธุ์ มีประวัติการเกิดและเบอร์หู อายุ 1.5-3 ปีขึ้นไป 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ดูร็อกซ์ (Duroc) แลนด์เรซ (Landrace) และลาร์จไวท์ (Large White) สายพันธุ์ละ 4 ตัว รวมทั้งสิ้น 12 ตัว โดยใช้ระบบการเลี้ยง การจัดการ อาหารและน้ำที่เหมือนกันทั้งหมด และตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเป็นประจำ รีดเก็บน้ำเชื้อสดจากพ่อสุกรด้วยมือ (hand-glove technique) โดยรีดเก็บเอาเฉพาะน้ำเชื้อส่วนที่มีอสุจิมาก (sperm rich fraction) และใช้ผ้าก๊อซกรองเอาส่วนเม็ดสาคูออกก่อนนำออกจากฟาร์ม เพื่อนำมาทำการทดสอบคุณภาพทางห้องปฏิบัติการที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยจะตรวจดูสี ปริมาตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าโดยใช้การส่องตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง ตรวจหาเปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิด้วยการย้อมสี SYBR-14/Propadium Iodide (PI)ตรวจความผิดปกติของอะโครโซม (acrosome integrity) ด้วยการย้อมสี FITC-PNA วิเคราะห์ผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง รวมทั้งตรวจความเข้มข้นด้วย photometer (Spermacue®) โดยอัตราของเซลล์อสุจิมีชีวิตที่สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าจะต้องอยู่ที่ 75% จากนั้นผสมน้ำเชื้อกับสารเจือจางน้ำเชื้อ (Modena™, Swine Genetics International Ltd., Iowa, USA) เพื่อการขนส่งต่อไป

การเตรียมน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งและกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อที่ขนส่งมาถึงห้องปฏิบัติการ โดยจะใช้มาตรฐานการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเดียวกับการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อสด แต่ให้ปริมาณอสุจิมีชีวิตที่สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าที่ยอมรับได้อยู่ที่ 70% เจือจางน้ำเชื้อด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ Modena™ ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ 1 ส่วนต่อ Modena™ 1 ส่วน ที่อุณหภูมิ 32 °C รักษาอุณหภูมิในตู้เย็นที่ 15 °C นาน 2 ชั่วโมง ปั่นน้ำเชื้อที่ได้ด้วยเครื่อง cold centrifuge ที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาทีอุณหภูมิ 15 °C นาน 10 นาที เทส่วนของเหลวด้านบน (supernatant) ออกเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่เหลือด้านล่างด้วย Extender II (11% lactose solution 80 มล. และ egg yolk 20 มล.) ให้ได้ความเข้มข้นของตัวอสุจิ 1.5 x 10^9 ตัว/มล. แบ่งกลุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อสุกรทั้ง 3 สายพันธุ์จำนวนสายพันธุ์ละ 4 ตัว รวมทั้งหมด 12 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มทดลองตามความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ L-cysteine ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมไม่ใส่ L-cysteine

กลุ่มที่ 2 ใส่ L-cysteine ที่ความเข้มข้น 5 mMol ลงใน freezing extender II

กลุ่มที่ 3 ใส่ L-cysteine ที่ความเข้มข้น 10 mMol ลงใน freezing extender II

กลุ่มที่ 4 ใส่ L-cysteine ที่ความเข้มข้น 15 mMol ลงใน freezing extender II

ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 5 ºC เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ที่ 5 ºC จากนั้น เจือจางเพิ่มด้วย Extender III (Extender II 89.5 มล. + glycerol 9 มล. + Equex STM [Nova Chemical Sales, Inc., Scituate, MA. USA]) ในอัตราส่วน 2:1 ปรับปริมาณความเข้มข้นของน้ำเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิเท่ากับ 1 x 10^9 ตัว/มล. บรรจุสารละลายน้ำเชื้อจากตัวอย่างน้ำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ลงในหลอดฟางชนิด polyvinyl chloride medium-straw ขนาด 0.5 มล. แล้วปิดผนึกเพื่อนำเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง (cryopreservation) โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง (controlled rate freezer) (SY-LAB, Purkersdorf, Austria) โดยใช้อัตราเร็วที่ 30°C/ นาที (Wongtawan et al., 2006; Kaeoket et al., 2008)

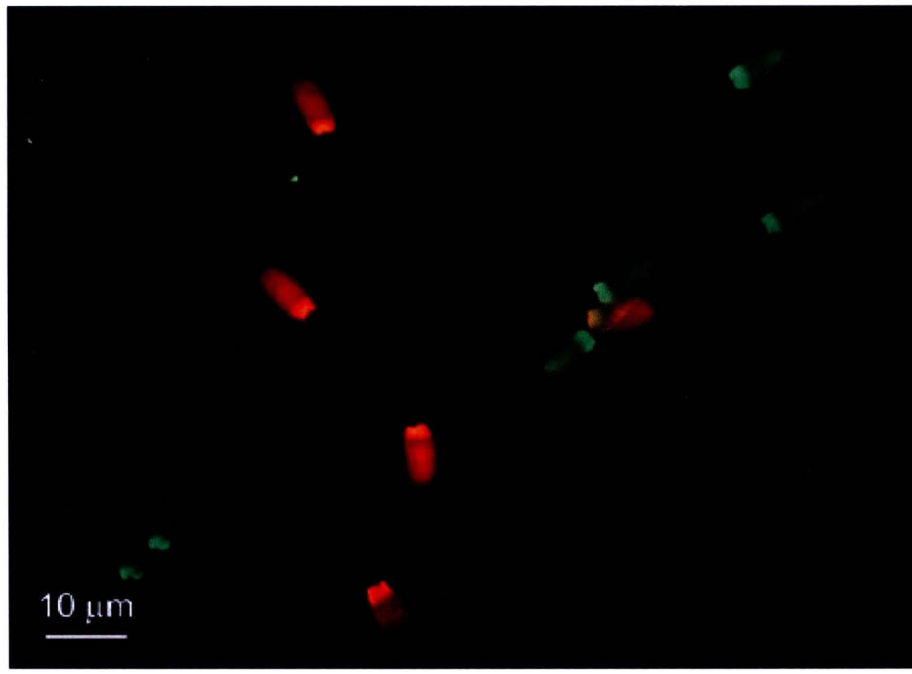
กระบวนการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งและการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

สุ่มหลอดน้ำเชื้อหนึ่งหลอดมาทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 12 วินาที เจือจางด้วย thawing solution (Modena™ 9.5 ml + Extender II 0.5 ml) แล้วทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อทันทีโดยการตรวจสอบหาปริมาณอสุจิมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าในน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ และทำการสุ่มตัวอย่างหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งอีกหนึ่งหลอดมาทำการละลายเช่นเดียวกัน ก่อนเจือจางด้วย thawing solution (Modena™ 9.5 ml + Extender II 0.5 ml) นำน้ำเชื้อที่ได้มา incubate ใน water bath ที่ 37 °C นาน 30 นาที แล้วนำมาตรวจสอบ ดังนี้

- ลักษณะความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (scanning electron microscope)
- ปริมาณของเซลล์อสุจิที่มีชีวิตและตายด้วยการย้อมสี SYBR-14/PI
- สถานะการเปลี่ยนแปลงของอะโครโซมด้วยการย้อมสี FITC-PNA
- สถานะการเกิดคาปาซิเตชั่นของเซลล์อสุจิด้วยวิธี CTC staining (Kaneto et al., 2000)
- เปอร์เซนต์การมีชีวิต และการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิด้วยการย้อมสี Annexin-V/PI assay และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow Cytometer (Pena et al., 2003)

การตรวจหาเซลล์อสุจิที่มีชีวิต (sperm viability)

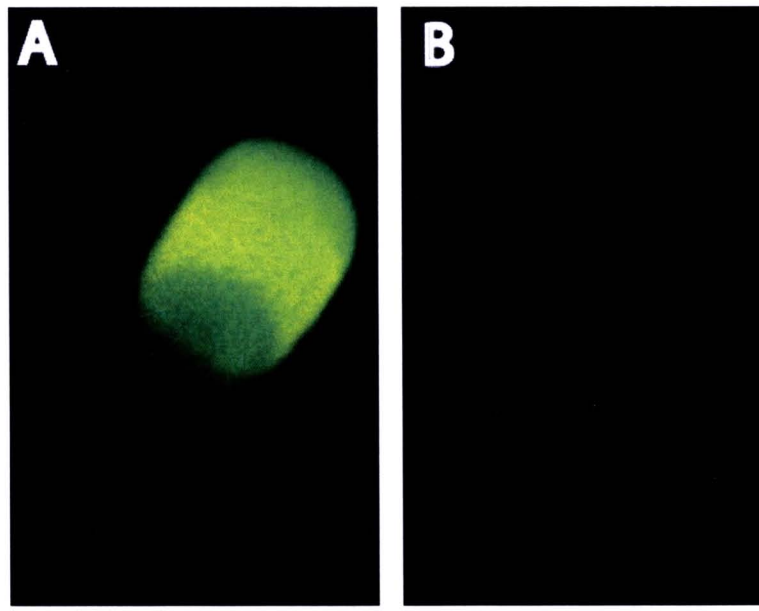
ปริมาณของเซลล์อสุจิที่มีชีวิตจะตรวจนับหลังจากด้วยการย้อมสี SYBR-14/PI (L-7011, Live/Dead Sperm Viability Kit, Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว 10 ไมโครลิตร มาเติมด้วย SYBR-14 2.7 ไมโครลิตร และ PI จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที ตรวจนับเซลล์อสุจิ 200 เซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงที่กำลังขยาย 1000x โดยเซลล์อสุจิที่มีเยื่อหุ้มเซลล์ที่สมบูรณ์ (intact plasma membrane) จะย้อมติดสีเขียวของ SYBR-14 ขณะที่เซลล์อสุจิที่มีความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์จะติดสีส้มของ PI สภาพการมีชีวิตของเซลล์อสุจิจะจัดแบ่งออกเป็น 3 สถานะ ดังนี้ 1) เซลล์อสุจิที่มีชีวิตจะพบส่วนหัวของเซลล์ติดสี SYBR-14, 2) เซลล์อสุจิที่ตาย ส่วนหัวจะย้อมติดสีส้มของ PI และ 3) เซลล์อสุจิที่อยู่ในสภาพ moribund จะพบส่วนหัวติดสีเขียวและส้ม (รูปที่ 2.1) ผลการทดลองจะแสดงให้เห็นเฉพาะเปอร์เซนต์ของเซลล์อสุจิที่มีชีวิต



รูปที่ 2.1 การติดสีของเซลล์อสุจิสุกรที่ย้อมด้วย SYBR-14/PI ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง พบสถานะในการติดสี 3 แบบ คือ 1) เซลล์อสุจิที่มีชีวิตจะพบส่วนหัวของเซลล์ติดสี SYBR-14, 2) เซลล์อสุจิที่ตาย ส่วนหัวจะย้อมติดสีส้มของ PI และ 3) เซลล์อสุจิที่อยู่ในสภาพ moribund จะพบส่วนหัวติดสีเขียวและส้ม

การตรวจสถานะของอะโครโซม (acrosome integrity)

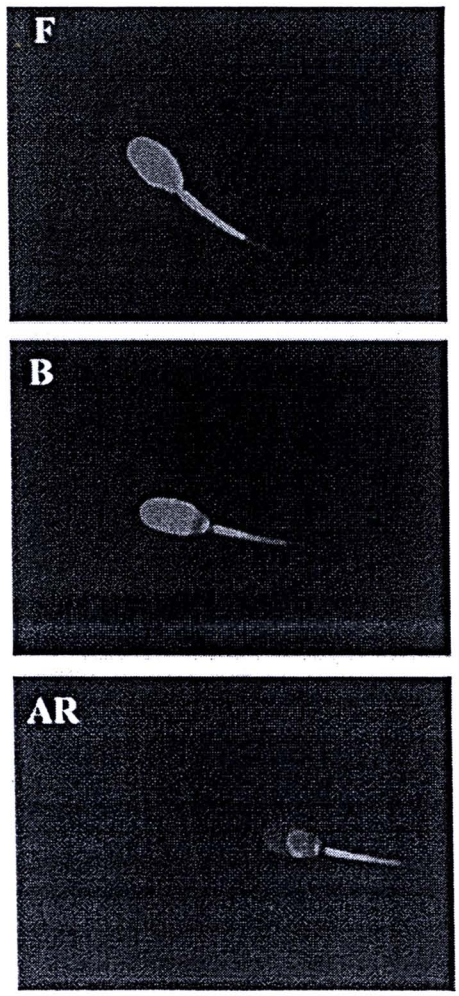
การตรวจสอบสถานะของอะโครโซมที่เกิดขึ้นกับเซลล์อสุจิ จะวิเคราะห์ด้วยการย้อมด้วย fluoresceinisothiocyanate-labeled peanut (Arachis hypogaea) agglutinin (FITC-PNA) นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว 10 มล. ผสมด้วย EthD-1 จำนวน 10 มล. แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ได้จำนวน 5 มล. มา smear บนสไลด์แก้ว แล้วตรึงสภาพด้วยเอทานอล 95% เป็นเวลา 30 วินาที แล้วตามด้วย FITC-PNA (เจือจาง FITC-PNA ด้วย phosphate-buffered saline) หยดลงทั่วสไลด์ แล้ว incubate ในกล่องที่ปรับให้มีความชื้น อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ตรวจนับเซลล์อสุจิ 200 เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงที่กำลังขยาย 1000x เซลล์อสุจิจะจัดแบ่งออกเป็น 3 สถานะคือ 1) สภาพอะโครโซมที่สมบูรณ์ (intact acrosome) และสภาพอะโครโซมที่เสียหาย (damage acrosome) (รูปที่ 2.2) ผลการทดลองจะแสดงให้เห็นเปอร์เซนต์ของเซลล์อสุจิที่มีสภาพของอะโครโซมที่สมบูรณ์



รูปที่ 2.2การติดสีของเซลล์อสุจิสุกรที่ย้อมด้วย FITC-PNA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงเพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของอะโครโซม A) เซลล์อสุจิที่มีชีวิตและมีส่วนของอะโครโซมที่สมบูรณ์ และ B) เซลล์อสุจิที่มีชีวิตแต่มีส่วนของอะโครโซมเสียหาย

การตรวจสถานะของเซลล์อสุจิที่เกิดคาปาซิเตชั่น (sperm capacitation)

สถานะการเกิดคาปาซิเตชั่นของเซลล์อสุจิ ตรวจสอบด้วยการ chlortetracycline (CTC) staining (Kaneto et al., 2000) นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว 45 ไมโครลิตร มาผสมด้วย CTC solution (ประกอบด้วย 750 µM CTC (Sigma), 5 mM DL-cysteine (Sigma), 130 mM NaCl, and 20 mM tris [hydroxymethyl] aminomethane [pH 7.8]) 45 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 วินาทีจากนั้นเติม 12.5% paraformaldehyde 8 ไมโครลิตร นำน้ำเชื้อที่ผสมแล้ว 8 ไมโครลิตร smear บนสไลด์แก้ว ตามด้วย 0.22 M 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane (Sigma) ซึ่งเจือจางใน glycerol : PBS (9:1) จำนวน 1 หยดวิเคราะห์ผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง สถานะคาปาซิเตชั่นของเซลล์อสุจิจัดแบ่งออกเป็น 3 สถานะคือ 1) F-pattern คือเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนหัวจะติดสีเขียวทั้งหมดซึ่งคือเซลล์อสุจิที่สมบูรณ์ และยังไม่เกิดการคาปาซิเตชั่น (uncapacitated spermatozoa), 2) B-pattern คือไม่พบการติดสีเขียวที่บริเวณ post-acrosomal region แต่บริเวณ acrosomal region ติดสีเขียวชัดเจนคือเซลล์อสุจิที่เกิดคาปาซิเตชั่น (capacitated spermatozoa) และ 3) AR-pattern คือพบการติดสีเขียวเป็นแถบเฉพาะบริเวณ equatorial segment คือสภาพการเกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (acrosome-reacted spermatozoa) (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 ลักษณะการติดสีเรืองแสงของเซลล์อสุจิสุกรที่ย้อมด้วย CTC staining ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง พบสถานะในการติดสี 3 แบบ คือ F-pattern, B-pattern และ AR-pattern

การตรวจการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิด้วย Annexin V/Propadium Iodide Assay

การตรวจหาสภาพการเปลี่ยนแปลงและการเสื่อมตาย (apoptosis) ของเซลล์อสุจิ จะใช้ Annexin-V-fluorescein isothiocyanate (FITC) apoptosis detection kit II (Pharmingen, San Diego, CA, USA) ซึ่งสามารถตรวจการเปลี่ยนแปลงของ phospholipid phosphatidylserine (PS) ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิภายหลังการทำละลายหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อสุกร การย้อมแต่ละขั้นตอนจะดำเนินการตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ดังนี้ ภายหลังการทำละลายน้ำเชื้อกลุ่มที่ 1-4 แล้ว น้ำเชื้อแต่ละกลุ่ม จะนำมาเจือจางด้วย Annexin-V binding buffer (10 mM N-2-hydroxyethyl piperazineethane sulfonic acid (HEPES)/NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl2) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ 1.0 x 10^6ตัว/มล. นำน้ำเชื้อที่ได้จากการเจือจางปริมาณ 100 ไมโครลิตร (1.0 x 10^5ตัว/มล.) มาใส่ใน culture tube ขนาด 5 มล.เติม FITC Annexin V 5 ไมโครลิตร และ Propadium Iodide (PI) 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้ว incubate ไว้ในที่มืดอีกครั้งเป็นเวลา 15 นาทีแล้วจึงเติม binding buffer ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดจากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer ภายใน 1 ชม. โดยทุกขั้นตอนของการย้อมและการ incubate จะทำที่อุณหภูมิห้อง

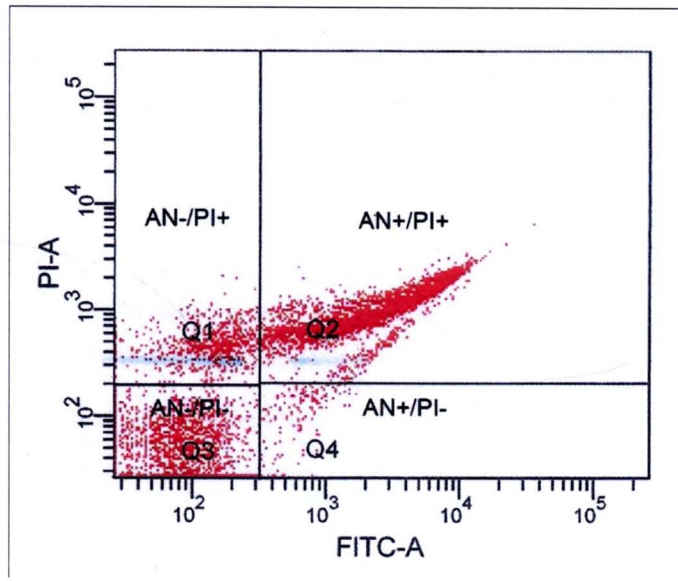
ตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อสุกรแต่ละกลุ่มจะนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LSR flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) ซึ่งมี standard optics ประกอบกับการใช้เลเซอร์ Argon-ion (488 nm) และ Helium–Cadmium (325 nm) ผลการวิเคราะห์จะนำมาประเมินผลด้วยโปรแกรม CellQuest version 3.3 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) ซึ่งจะปรากฏในรูปแบบของ FCS/SCC two-dimensional histogram โดยสัดส่วนของเซลล์อสุจิจะแบ่งออกเป็น 4 ช่องตามการย้อมติดสี (รูปที่ 2.4) คือ

1) เซลล์อสุจิมีชวิตและมีสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ (viable spermatozoa with stable plasmalemma) ซึ่งเซลล์อสุจิจะไม่ติดสี Annexin-V และสี PI (AN–/PI–)

2) เซลล์อสุจิมีชวิตและพบสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์เสียหายบ้างเล็กน้อย หรืออาจเริ่มเกิดภาวะ apoptosis (spermatozoa with a PS-exteriorized yet intact plasma membrane) ซึ่งเซลล์อสุจิจะติดสีบวกของ Annexin-V แต่ไม่ติดสี PI (AN+/PI–)

3) เซลล์อสุจิที่ตายและมีการเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเซลล์อสุจิตายในภาวะ late apoptotic หรือ early necrotic cells โดยจะติดสีบวกทั้ง Annexin-V และ PI (AN+/PI+) และ

4) เซลล์อสุจิที่ไม่ติดสี Annexin-V แต่ติดสีบวกของ PI (AN–/PI+) ซึ่งหมายถึง เซลล์อสุจิที่ตายและอยู่ในสภาวะ late necrotic cells



รูปที่ 2.4

FCS/SCC two-dimensional histogram แสดงผลการย้อมเซลล์อสุจิด้วย Annexin-V/PI จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer โดยสัดส่วนของเซลล์อสุจิแบ่งออกเป็น 4 ช่องตามการย้อมติดสี คือ กลุ่มเซลล์อสุจิที่มีชีวิต AN-/PI-, AN+/PI- และเซลล์อสุจิที่ตาย AN-/PI+, AN+/PI+

<u>การทดลองที่ 2</u>

สัตว์ทดลอง

สุกรพ่อพันธุ์ ใช้น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อสุกรที่ได้จากการทดลองที่ 1 โดยต้องเป็นพ่อสุกรตัวเดียวกัน นำมารีดน้ำเชื้อเพื่อทำการแช่แข็งให้ได้จำนวนหลอด (straws) เพียงพอสำหรับการผสมเทียมแม่สุกรจำนวน 15 ตัว (กลุ่มที่ B, C และ D)

สุกรแม่พันธุ์เลือกสุกรนางพันธุ์ผสม (Large white x Landrace) คัดเลือกจากสุกรที่ไม่มีปัญหาในระบบสืบพันธุ์จำนวน 20 ตัว (โดยมีลำดับครอกอยู่ระหว่าง 3-4) ภายใต้ระบบการเลี้ยง การจัดการอาหารและน้ำเหมือนกันทั้งหมด โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่มดังนี้

ตารางที่ 2.1แสดงกลุ่มการทดลองโดยการเปรียบเทียบชนิดของน้ำเชื้อและกระบวนการที่แตกต่างกันในการผสมเทียม

กลุ่มทดลอง	กระบวนการ	จำนวนสุกร	ปริมาณตัวอสุจิ $X10^9$ sperm/dose	ปริมาณน้ำเชื้อ (ml)
กลุ่ม A (กลุ่มควบคุม)	น้ำเชื้อสด	5	2	60
กลุ่ม B	น้ำเชื้อแช่แข็ง + สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ(Extender)	5	2	60
กลุ่มC	น้ำเชื้อแช่แข็ง + Supernatant	5	2	60
กลุ่ม D	น้ำเชื้อแช่แข็ง + Supernatant	5	4	60

การเก็บ supernatant เพื่อนำมาเป็น post-thawing solution และ semen extender

นำน้ำเชื้อ (fresh semen + semen extender) ที่ได้ใส่ หลอดพลาสติกขนาด 50 ml นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง cold centrifuge ที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาทีอุณหภูมิ 15 °C นาน 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสที่อยู่ส่วนบน (supernatant) นำมาใส่หลอดพลาสติกขนาด 50 ml นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง cold centrifuge ที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาทีอุณหภูมิ 15 °C นาน 10 นาที อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นทำการเก็บส่วนใส ใส่หลอดพลาสติกนำไปเก็บไว้ที่ตู้แช่อุณหภูมิ -20 °C เวลานำมาใช้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลาย จากนั้นนำไปอุ่นใน water baht ที่อุณหภูมิ 37 °Cก่อนนำมาใช้เป็น post-thawing solution และ semen extender

การผสมเทียมในสุกร

สุกรนางจะถูกผสม 2 ครั้งโดยสังเกตจากระยะเวลาตั้งแต่หย่านมถึงสุกรเริ่มแสดงอาการยืนนิ่ง (Weaning to oestrus interval,WOI) คือ

สุกรที่มี WOI 3-4 วันจะผสมหลังเริ่มแสดงอาการเป็นสัด 24 ชั่วโมงและอีก 36 ชั่วโมงตามลำดับ

สุกรที่มี WOI 5-6 วันจะผสมหลังเริ่มแสดงอาการเป็นสัด 12 ชั่วโมงและอีก 24 ชั่วโมงตามลำดับ

สุกรที่มี WOI 7 วัน จะผสมหลังเริ่มแสดงอาการทันทีและอีก 12 ชั่วโมงตามลำดับ

ท่อผสมเทียมที่ใช้ในการผสมเทียมแบบ IUIประกอบด้วย ท่อพลาสติกภายนอกและท่อภายใน สำหรับท่อภายนอกเป็นท่อที่ใช้ผสมเทียมทั่วไป (foam tip) สำหรับการทำงานนั้น ท่อภายนอกแบบ foam tip จะถูกใส่เข้าไปจนติดที่คอมดลูก (cervix) หลังจากนั้น จะทำการสอดใส่ท่อภายในเข้าไปผ่านท่อภายนอกจนกระทั่ง ผ่านคอมดลูก และถึงตัวมดลูก (uterine body) ซึ่งเป็นจุดที่จะทำการปล่อยน้ำเชื้ออสุจิ

การตรวจการกลับสัดและการตรวจการตั้งท้อง (pregnancy rate) การบันทึกอัตราการคลอด(farrowing rate) และการบันทึกจำนวนลูกต่อครอก (litter size, Total born)

สุกรที่ถูกผสมเทียมแล้ว จะถูกตรวจการตั้งท้องที่ 3-4 สัปดาห์หลังผสม โดยใช้เครื่องอัลตร้าซาวด์ชนิดเรียลไทม์ บี โมด (50STringa, sector probe with 5 MHz, ESAOTE Pie Medical, The Netherlands) ตรวจผ่านผนังช่องท้องจากนั้นจะทำการบันทึก pregnancy rateไว้ และทำการบันทึกอัตราการคลอด (farrowing rate) ตลอดจนจำนวนลูกต่อครอก (Total number of piglet born, TNB) จำนวนลูกมีชีวิตต่อครอก (Number of born alive, NBA) จะถูกบันทึกไว้

การวิเคราะห์และการประเมินผล

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ตัวเป็นตัวตาย ความผิดปกติของอะโครโซม การเกิดคาปาซิเตชั่นโดยใช้ General Linear Model(GLM) และเปรียบเทียบ pregnancy rate, farrowing rate และ total number of piglet born, number of born alive, mummy, stillborn ระหว่างกลุ่มโดยสถิติวิธี ใช้สถิติแบบ Non-parametric (Kruskal Wallis test/Chi-square test) สำหรับ PR และ FR และใช้สถิติแบบ One way-ANOVA (analysis of variation) สำหรับ TNB และ NBA ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 18 และโปรแกรม SAS (SAS Inst. Version 9.0, Cary, NC USA)ค่า $P<0.05$ ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ