

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ โคพันธุ์พื้นเมือง และโคพันธุ์ไฮลสไตน์-ฟรีเซียน ทั้งสองพันธุ์เป็นโคสาว พันธุ์แท้เลือด 100 เปอร์เซ็นต์ เกิดในประเทศไทย อายุใกล้เคียงกัน ระหว่าง 2 ถึง 3 ปี แต่ละพันธุ์มีจำนวน 7 ตัว โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยเมื่อวันที่ 21 ตุลาคม 2535 ในโคพันธุ์พื้นเมือง 173.15 ± 13.72 กิโลกรัม และโคพันธุ์ไฮลสไตน์-ฟรีเซียน 207.15 ± 11.85 กิโลกรัม

หลังจากนำโคเข้าคอกทดลอง โคได้รับอาหารหยาบ คือ หญ้าแห้ง โดยให้กินได้เต็มที่ตามความต้องการตลอดการทดลอง เพื่อลดความแตกต่างระหว่างช่วงการเกิดตัวอย่างที่อาจเกิดขึ้น เนื่องจากการได้รับอาหารหยาบที่แตกต่างกัน สาเหตุที่ใช้หญ้าแห้งเป็นอาหารหยาบเพราะไม่สามารถจัดให้มีหญ้าสดในช่วงฤดูแล้งได้ โคได้รับอาหารข้นวันละ 1 กิโลกรัม/ตัว/วัน ซึ่งมีโภชนาต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 4 และให้มิน้ำกินตลอดเวลา

ทำการถ่ายพยาธิภายในพยาธิใบไม้ในตับ และพยาธิตัวกลมต่าง ๆ โดยใช้ Nitroxylnil injection 34 % (Trodax) 1 ซีซี./น้ำหนักตัว 50 กิโลกรัม กำจัดพยาธิภายนอกใช้ 1 % w/v sterline solution of ivermectin (Ivomec) 1 ซีซี./น้ำหนักตัว 50 กิโลกรัม ให้วัคซีนป้องกันโรคปากเท้าเปื่อยชนิดโอ เอ และวัคซีนป้องกันโรคคอบวม ทุก ๆ 6 เดือน รวมทั้งการเสริมแร่ธาตุ ก่อนไว้ในคอก และฉีดวิตามินเอ ดี อี เค (Injectavit) 10 ซีซี./ตัว

ตารางที่ 4 โภชนะของอาหารชั้นที่โคได้รับ

โภชนะ	เปอร์เซ็นต์ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	โภชนะ	เปอร์เซ็นต์ (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
ความชื้น	7.02 ± 0.07	ถั่วไม่ละลายในกรด	0.45 ± 0.02
โปรตีน	16.67 ± 0.02	แคลเซียม	0.81 ± 0.01
ไขมัน	8.83 ± 0.07	ฟอสฟอรัส	0.92 ± 0.03
เยื่อใย	1.98 ± 0.05	พลังงานรวม	$4,730 \pm 48$
เถ้า	6.79 ± 0.06		

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

3.2.1 สถานที่เก็บข้อมูลพื้นฐาน

หมวดโคเนื้อ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตั้งอยู่ในระดับสูงจากน้ำทะเล 200 เมตร เส้นละติจูดที่ 16 องศาเหนือ มีภูมิอากาศแบบทุ่งหญ้าเมืองร้อน โดยมีลักษณะโรงเรียนดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะและที่ตั้งของโรงเรียนที่ใช้ทำการทดลอง

3.2.2 สถานที่วิเคราะห์คำโลหิตวิทยา

ห้องปฏิบัติการ สรีรวิทยา ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2.3 สถานที่วิเคราะห์ฮอร์โมนคอติซอล

ห้องปฏิบัติการ ศูนย์การค้นคว้าและพัฒนาเกษตรกรรมภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.3 การเก็บตัวอย่างค่าสังเกต

3.3.1 คำจำกัดความ

1.) ความเครียดโดยการชักนำ หมายถึง ความเครียดของโคที่เกิดขึ้น เมื่อถูกเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมจากการอยู่ในร่ม ไปเป็นการออกไปอยู่กลางแจ้ง ซึ่งจะมีระดับของอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละช่วงในรอบปี

2.) สภาพแวดล้อมในร่มก่อนที่โคออกกลางแจ้ง (T1) หมายถึง การที่โคอยู่ในโรงเรือนมีร่มเงาของโรงเรือนตามลักษณะดังในภาพที่ 1 ซึ่งมีอุณหภูมิแวดล้อมตัวโคที่ต่ำกว่า และความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงกว่า ขณะที่โคอยู่กลางแจ้ง

3.) สภาพแวดล้อมกลางแจ้ง (T2) หมายถึง การที่โคออกไปอยู่กลางแจ้ง ไม่มีร่มเงา และมีอุณหภูมิแวดล้อมตัวโคที่สูงกว่า และความชื้นสัมพัทธ์ที่ต่ำกว่า ขณะที่โคอยู่ในร่ม

4.) สภาพแวดล้อมในร่มหลังจากที่โคออกกลางแจ้งเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง (T3) หมายถึง โคกลับเข้าร่ม คือโรงเรือนเดิมหลังจากการอยู่กลางแจ้งในข้อ 3.) ซึ่งมีอุณหภูมิแวดล้อมที่ต่ำกว่าและความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงกว่าขณะที่โคอยู่กลางแจ้ง

3.3.2 การแบ่งช่วงการเก็บตัวอย่าง

ได้สุ่มเดือนที่ทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละช่วงโดยวิธีการจับฉลาก โดยมีเดือนที่ทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละช่วงใน 1 ปี ดังนี้

1.) ช่วงการเก็บตัวอย่างที่ 1 (S1) เก็บตัวอย่างต้นเดือนเมษายน ถึงกลางเดือน

พฤษภาคม

2.) ช่วงการเก็บตัวอย่างที่ 2 (S2) เก็บตัวอย่างต้นเดือนมิถุนายน ถึงปลายเดือน

กรกฎาคม

3.) ช่วงการเก็บตัวอย่างที่ 3 (S3) เก็บตัวอย่างกลางเดือนสิงหาคม ถึงปลายเดือนกันยายน

4.) ช่วงการเก็บตัวอย่างที่ 4 (S4) เก็บตัวอย่างต้นเดือนพฤศจิกายน ถึงต้นเดือนธันวาคม

3.3.3 เวลาในการเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างของคำสังเกตทุกคำ เก็บในเวลาที่ใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง โดยแบ่งการเก็บตัวอย่างเป็น 4 ช่วงการเก็บตัวอย่างใน 1 ปี แต่ละช่วงมีระยะเวลานานประมาณ 45 วัน มีระยะพักระหว่างช่วงประมาณ 1 เดือน ในแต่ละช่วง เก็บตัวอย่าง 14 วัน โดยใช้โคทดลองคู่ละ 2 วัน ติดต่อกัน แต่ละคู่ห่างกันประมาณ 7-14 วัน (ขึ้นกับความสามารถเก็บตัวอย่างเลือดได้ครบทุกครั้งในหนึ่งชุดต่อวัน เนื่องจากมักเกิดปัญหาของการไม่สามารถดูดเลือดออกจากสายแคตติเตอร์ได้ ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด) เก็บตัวอย่างวันละ 10 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 30 นาที เริ่มเก็บตั้งแต่เวลา 11.30 น. จนกระทั่งถึงเวลา 16.00 น. เวลาในการเก็บตัวอย่างในแต่ละวันแสดงในภาพที่ 2

โดยแบ่งสภาพแวดล้อมของการเก็บตัวอย่าง 3 แบบ ได้แก่

1.) โคอยู่ในร่มก่อนออกกลางแจ้ง (T1) เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 และ 2 ที่เวลา 11.30 น. และ 12.00 น. ตามลำดับ รวมจำนวนการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง (ภาพที่ 3)

2.) โคอยู่กลางแจ้ง นำโคออกไปกลางแจ้งหลังจากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 (T2) เก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ถึงครั้งที่ 8 ที่เวลา 12.30 - 15.00 น. รวมจำนวนการเก็บตัวอย่าง 6 ครั้ง และรวมระยะเวลาที่โคอยู่กลางแจ้งนาน 3 ชั่วโมง (ภาพที่ 4)

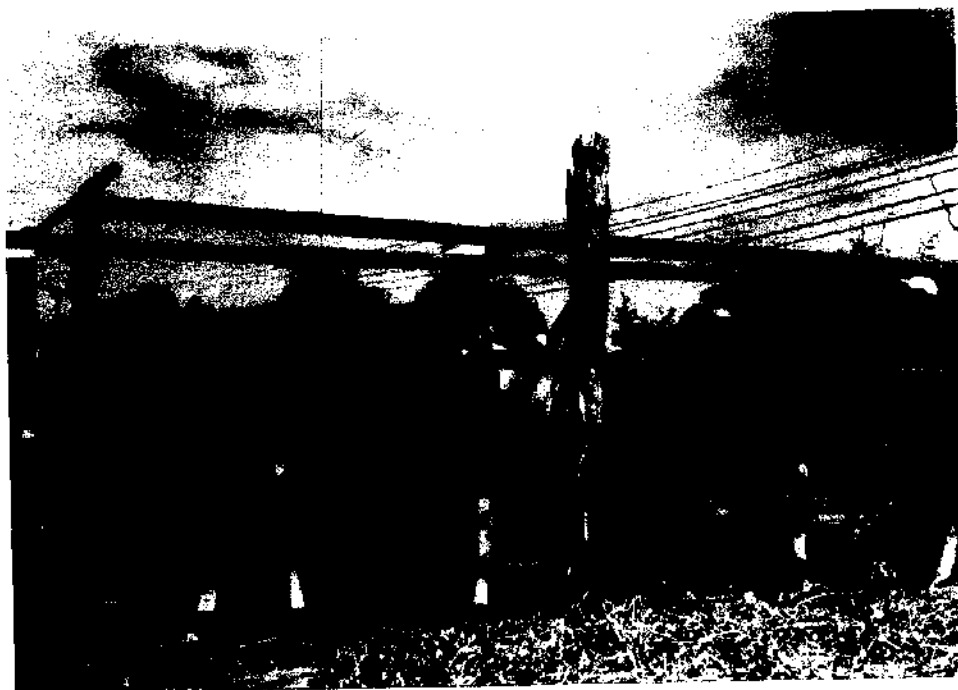
3.) โคอยู่ในร่มหลังออกกลางแจ้ง นำโคเข้ามาในโรงเรือนหลังจากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 8 (T3) เก็บตัวอย่างครั้งที่ 9 และ 10 ที่เวลา 15.30 น. และ 16.00 น.ตามลำดับ รวมจำนวนการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง

	ในร่ม	กลางแจ้ง						ในร่ม		
เวลา	11.30	12.00	12.30	13.00	13.30	14.00	14.30	15.00	15.30	16.00
ครั้งที่	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)

ภาพที่ 2 แผนผังเวลาในการเก็บตัวอย่างและบันทึกคำสังเกตในแต่ละวัน



ภาพที่ 3 สภาพสิ่งแวดล้อมในร่มของโค



ภาพที่ 4 สภาพสิ่งแวดล้อมกลางแจ้งของโค

3.3.4 การเก็บตัวอย่างเลือด

การฝังสายแคตติเตอร์ (Catheter) เข้าที่เส้นเลือดใหญ่ที่คอโค

ทำการฝังสายแคตติเตอร์ก่อนการเก็บตัวอย่างเลือด 24 ชั่วโมง โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ก) ฉีดยาสลบ (2-(2, 6-Xylidino)-5, 6-Dihydro-4H-1, 3-Thiazine Hydrochloride, รอมพัน) ผลิตโดยไบเออร์ (เวทเคม) กรุงโซล เกาหลี) พันธุ์พื้นเมืองใช้ขนาด 1.8-2 ซีซี./ตัว พันธุ์ไฮสโตน-ฟรีเซียน ใช้ขนาด 1.4-1.6 ซีซี./ตัว ขึ้นกับขนาดของโค รอกจนกระทั่งโคสลบ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที โดยทั่วไปโคพันธุ์พื้นเมืองใช้เวลาที่สั้นกว่าโคพันธุ์ไฮสโตน-ฟรีเซียน ขณะที่รอให้โคสลบป้องกันไม่ให้มีสิ่งใดไปรบกวน จัดให้สภาพแวดล้อมของโคเงียบสงบ เมื่อยาออกฤทธิ์โคนอนในลักษณะที่ศีรษะพับลงมาพาดอยู่ที่หลัง ทำการฝังท่อแคตติเตอร์ในลักษณะนี้โดยไม่ต้องลัมโคให้นอนตะแคง เนื่องจากเป็นท่าที่สะดวกต่อการปฏิบัติงานของผู้ปฏิบัติ และมีความปลอดภัยกับโคมากกว่าท่าอื่น

ข) หาดำแหน่งเส้นเลือดบริเวณคอที่เห็นชัดมากที่สุด (ภาพที่ 5)

ค) ล้างทำความสะอาดบริเวณที่จะโกนขนด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อโรคเซเฟรอน (Saferon) ความเข้มข้น 30% เตรียมโดยหน่วยเวชภัณฑ์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โกนขนบริเวณที่พบเส้นเลือดใหญ่ที่คอ ที่จะทำการฝังสายแคตติเตอร์ (ภาพที่ 6) จากนั้นเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 75 %

ง) ใช้เข็มเซอร์ฟิโลว์แคตติเตอร์ (Surflo I.V. Catheter 16G*2" (I.D. 1.30 *51 mm.) ผลิตโดย Terumo Corporation Toukyo, Japan) แทะบริเวณที่โกนขนและทำความสะอาดไว้ (ภาพที่ 7) เมื่อแทงเข้าภายในเส้นเลือด ดึงตัวเข็มเซอร์ฟิโลว์แคตติเตอร์ออก คงเหลือเฉพาะปลอกพลาสติกไว้

จ) ใช้เส้นลวดนาร์รองสอดผ่านปลอกพลาสติกเข้าไปในเส้นเลือด ความยาวประมาณ 20 เซนติเมตรเพื่อป้องกันการหลุดที่อาจเกิดจากการขยับของโคหรือผู้ปฏิบัติเอง (ภาพที่ 8)

ฉ) จากนั้นดึงปลอกพลาสติกออก คงเหลือแต่เส้นลวดนาร์รอง และใส่สายแคตติเตอร์ที่เตรียมไว้เข้ากับเส้นลวดนาร์รอง จนกระทั่งสายแคตติเตอร์ผ่านเข้าไปได้หมด (ภาพที่ 9) โคพันธุ์พื้นเมืองใช้สายแคตติเตอร์ที่มีความยาว 15 เซนติเมตร เนื่องจากโคพันธุ์พื้นเมืองมีผิวหนังที่มีความหนาและยืดหดตัวมาก การใช้สายที่สั้นมักทำให้เกิดการเลื่อนหลุดของสายออกจากเส้นเลือดได้ง่าย ส่วนโคพันธุ์ไฮสโตน-ฟรีเซียน มีผิวหนังและผนังของเส้นเลือดที่บางกว่าโคพันธุ์พื้นเมือง การใช้สายที่มีความยาวมากเกินไปอาจทำให้เกิดการแทงทะลุผ่านผนังเส้นเลือด และส่วนปลายของสายแคตติเตอร์อยู่ติดติดกับผนังเส้นเลือด ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการไม่สามารถดูดเลือดออกมาได้ จึงใช้สายที่สั้นกว่าของโคพันธุ์พื้นเมือง คือความยาว 10 เซนติเมตร

ข) ดึงเส้นลวดนำร่องออก (ภาพที่ 10) ปิดด้วยจุกปิดที่เตรียมไว้ (ภาพที่ 11)

ช) เย็บสายแคตติเตอร์บริเวณจุกปิดให้ติดเข้ากับผิวหนังชั้นนอกของโค (ภาพที่ 12)

ณ) ใช้เฮปาริน (Heparin) ผลิตโดย Novo Nordisk A / S 2660 Bagsvaerd, Denmark เจือจาง 1,000 IU/mm. (Resemberger, 1979) ฉีดผ่านสายแคตติเตอร์ 1 ซีซี เพื่อหล่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด อันจะทำให้เกิดการอุดตันของสายแคตติเตอร์

ญ) พ่นยาป้องกันแมลงรบกวน (เนกกาชัน 0, 0-Diethyl-0-(3-Chloro-4-methyl-7-coumarinyl)-Thiophosphate 3%, 2-Isopropoxyphenyl-N-methyl-carbamate 2%, Sulfanilamide 5% ผลิตโดยบริษัทไบเออร์ เลเวอร์คูเซิน เยอรมันนี) ที่บริเวณปากแผล และ ฉีดยาออกซิเตท ที.พี. (ในน้ำยา 2 ซีซี.ประกอบด้วยออกซิเตตราไซคลิน 100 มิลลิกรัม, ลิโดเคน ไฮโดรคลอไรด์ 2 % ผลิตโดยบริษัทที.พี.ดรักแลบบอราทอรีส์ (1969) จำกัด) 10 ซีซี./ตัว

หมายเหตุ อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการฝังสายแคตติเตอร์แช่น้ำยาฆ่าเชื้อโรคเซฟรอนก่อนการปฏิบัติการนานประมาณ 15 นาที



ภาพที่ 5 ตำแหน่งที่จะทำการฝังสายแคตติเตอร์



ภาพที่ 6 บริเวณที่ทำการโกนขนเพื่อฝังสายแคตติเตอร์



ภาพที่ 7 การแทงเข็มเซอร์โพลไฮวีแคตติเตอร์เข้าเส้นเลือด



ภาพที่ 8 การสอดเส้นลวดนำร่องผ่านปลอกพลาสติก



ภาพที่ 9 การใส่สายแคดดี้เตอร์ผ่านเส้นลวดนำร่อง



ภาพที่ 10 ภาพภายหลังจากดึงเส้นลวดนำร่องออก



ภาพที่ 11 การปิดสายแคตติเตอร์ด้วยจุกที่เตรียมไว้



ภาพที่ 12 การเย็บสายแคตติเตอร์บริเวณจุดปิดติดเข้ากับผิวหนัง

ขั้นตอนในการเก็บตัวอย่างเลือด

ก) เก็บตัวอย่างเลือดจากจุดปิดสายแคตติเตอร์ โดยไม่ต้องเปิดจุด (เนื่องจากเป็นจุดชนิดมียางที่สามารถยืดหยุ่นได้ต่อไปอยู่) ใช้กระบอกฉีดยาเปล่า ดูดเลือดประมาณ 1-2 ซีซี.ทิ้งไป (เลือดผสมเฮปารินที่ค้างอยู่ในสายแคตติเตอร์จึงไม่นำมาใช้)

ข) ใช้กระบอกฉีดยาที่ทำด้วยแก้ว ดูดเลือดประมาณ 10 ซีซี. (ตัวอย่างเลือดที่นำมาใช้)

ค) หลังการเก็บเลือดในขั้นตอน ข) ทุกครั้งหล่อสารละลายเฮปารินเจือจางความเข้มข้นประมาณ 1,000 IU./ml. (Resemberger, 1979) 0.5-1 ซีซี.เพื่อป้องกันการอุดตันของสายแคตติเตอร์

ง) เลือดที่ได้มาถูกแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่ง 9 ซีซี. เก็บไว้ในหลอดพลาสติก และแช่ไว้ในกระดิกน้ำแข็งทันที เพื่อรอการปั่นแยกเอาซีรัม ส่วนที่เหลือ 1 ซีซี. เก็บไว้ในหลอดที่เคลือบด้วยเอททิสัน ไดอามีน เตตราอะซิติกแอซิด (ในรูปเกลียวไดโพรแทสเซียม) 1 มิลลิกรัม (ผลิตโดย Fluka chemic AG, CH-9740 Buchs Packed in Switzerland) เขย่าให้สารละลายเข้ากับเลือด เก็บไว้ในกระดิกน้ำแข็งทันทีเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด รอการวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา ภายหลังจากเสร็จสิ้นการเก็บตัวอย่างในแต่ละวัน (Resemberger, 1979)



ภาพที่ 13 การวัดอุณหภูมิทวารหนักพร้อมกับการจับชีพจร



ภาพที่ 14 การเก็บตัวอย่างเลือด

3.4 การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา

3.4.1 การหาค่าฮีมาโตคริต (Hct) โดยวิธี Micro-heamatocrit

ก) บรรจุเลือดเข้าหลอดแคพิลลารี (Vitrex ผลิตโดย Modulohm I/S 6-8 Vasekaer, DK-2730 Herlev, Denmark) โดยใช้ปลายข้างหนึ่งและที่หยดเลือด เอียงหลอดเล็กน้อยให้เลือดไหลเข้าหลอดแคพิลลารี บรรจุเลือดประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของหลอด

ข) อุดปลายหลอดข้างหนึ่งด้วยดินน้ำมัน (Clay Adams Parsippany. N. Y. 07054 / CAT No. 1015 U.S.A.)

ค) นำหลอดแคพิลลารีที่บรรจุเลือดเรียบร้อยแล้วไปเข้าเครื่องปั่นอโตคริต (Autocrit centrifuge Clay Adams 0581 Division of Becton, Dickinson and company Parsippany. N. Y. 07054 CAT No. 0572 U.S.A.) โดยให้ปลายด้านที่อุดดินน้ำมันชิดกับขอบของเครื่องปั่น ติดกับแผ่นยาง ปั่นนาน 5 นาที ความเร็ว 10,000 ถึง 11,000 รอบต่อนาที

ง) วัดความยาวของส่วนเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (มีค่าเป็นร้อยละของความสูงทั้งหมด) กับมาตรวัดของเครื่องค่าที่ได้คือค่าฮีมาโตคริต มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (Benjamin, 1961)

3.4.2 การหาค่าฮีโมโกลบิน (Hb) โดยวิธี Acid hematin

ก) หยด 0.1 N. ของกรดเกลือไฮโดรคลอริก 5 หยด ลงในหลอดของเครื่อง Sahli Haemometer (Supe & Rior Germany) จนถึงขีดต่ำสุด

ข) ใช้สารสีไปเปต (Saaringia W-Germany ± 0.0004) ตูดเลือดขึ้นมาจนถึงขีด 0.02 มิลลิลิตร เข็ดเลือดที่ปลายไปเปตด้วยกระดาษนุ่ม พยายามปรับให้เลือดอยู่ที่ระดับ 0.02 มิลลิลิตร โดยใช้นิ้วชี้ปิดที่ปลายไปเปต

ค) จุ่มปลายไปเปตลงในกรดเกลือเป่าฟั่นเลือดออกจนหมด ตูดกรดเกลือนี้ล้างไปเปต แล้วปล่อยออก 2 - 3 ครั้ง ใช้แท่งแก้วคนให้เลือดและกรดเกลือเข้ากันดี

ง) ตั้งทิ้งไว้ 4 นาที จนฮีโมโกลบินกลายเป็นกรดฮีมาติน เติมน้ำกลั่นที่ละหยดลงในหลอด คนทุกครั้งที่ยกน้ำกลั่นลงไป เทียบสีของสารละลายในหลอดกับสีของแท่งแก้วมาตรฐาน ซึ่งอยู่ข้างหลอด ให้ได้สีที่เหมือนกัน

จ) เมื่อเทียบสีได้เสมอกัน อ่านค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบินจากระดับของของเหลวในหลอดกับมาตรวัดที่ข้างหลอด มีหน่วยเป็นกรัมเปอร์เซ็นต์ของฮีโมโกลบิน (Benjamin, 1961)

3.4.8 การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC)

ก) ใช้ไปเปต Coming No.7049 A U.S.A.6744 ดูดเลือดถึงขีด 0.5

ข) เช็ดเลือดที่ติดที่ส่วนปลายไปเปตออก

ค) คูดน้ำยาที่ใช้เจือจางเลือด Turk's solution (ผลิตโดยโครงการน้ำยาสำเร็จรูป คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) ถึงขีด 11 เขย่าให้เลือดและน้ำยาเข้ากันดีโดยใช้ นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ปิดปลายทั้งสองข้างของไปเปตเขย่าไปมาหลาย ๆ ครั้ง จนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

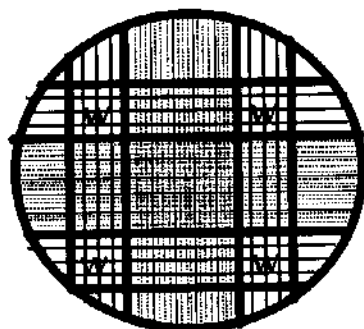
ง) หยดน้ำยา 3-5 หยดแรกทิ้งไป เพราะเป็นส่วนที่ไม่มีเม็ดเลือดอยู่ หยดเลือดลงใน แผ่นแก้วนับเม็ดเลือด (Hemocytometer chamber; Spencer Brigh-Line Improved Neubauer 1/10 mm. deep Boeco Germany) โดยใช้ปลายไปเปตแตะที่ขอบของ cover slip จากนั้นค่อย ๆ ปลอ่ยสารละลายออกมา โดยอุดส่วนบนของไปเปตไว้ เพื่อให้ของเหลวในกระเปาะของไปเปต ค่อย ๆ ไหลลงให้พอดีเต็มช่อง

จ) ทิ้งไว้ 2 นาที เพื่อให้เซลล์กระจายตัวและนอนกันเรียบร้อย นับจำนวนเม็ดเลือดขาว โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus Optical Co., LTD. Japan G 92108) กำลังขยายต่ำ นับใน ช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัส 4 มุม มีพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร (ภาพที่ 15) คำนวนจำนวนเม็ดเลือดขาวที่ไม่มีการเจือจางต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร โดยมีวิธีการคำนวณตามแบบของ Benjamin (1961) ดังต่อไปนี้

X = จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้

Y = จำนวนเม็ดเลือดขาวต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ดังนั้น $Y = X \cdot 50$ เซล/ลูกบาศก์มิลลิเมตร



W หมายถึงบริเวณที่นับจำนวนเม็ดเลือดขาว

ภาพที่ 15 บริเวณนับจำนวนเม็ดเลือดขาวในแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด

3.4.4 การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC)

ก) ใช้ไปเปต (Saaringia W-Germany) ดูดเลือดขึ้นมาถึงขีด 0.5 เช็ดเลือดส่วนที่ติดปลายไปเปตออก

ข) ดูดน้ำยาเจือจางเลือด Grower's solution (ผลิตโดยโครงการน้ำยาสำเร็จ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) จนถึงขีด 101 เขย่าให้เลือดและน้ำยาเข้ากันดี โดยใช้นิ้วหัวแม่มือ และนิ้วชี้ปิดปลายสองข้างของไปเปตเขย่าไปมาหลาย ๆ ครั้ง

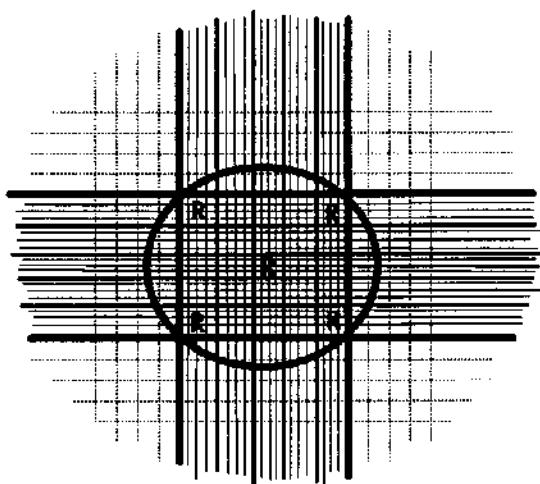
ค) หยดน้ำยา 3 - 5 หยดแรกทิ้งไป เพราะเป็นส่วนที่ไม่มีเม็ดเลือดอยู่ จากนั้นหยดเลือดลงที่ขอบแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด (Hemocytometer chamber; Spencer Brigh-Line Improved Neubauer 1/10 mm. deep Boeco Germany) โดยใช้ปลายไปเปตแตะที่ขอบของ cover slip ค่อย ๆ ปล่อยน้ำ โดยอุดส่วนบนของไปเปตไว้ เพื่อให้ของเหลวในกระเปาะของไปเปตค่อย ๆ ไหลลงให้พอดีเต็มช่อง

ง) ทิ้งไว้ 2 นาที เพื่อให้เซลล์กระจายตัวและนอนกันเรียบร้อยจึงนับจำนวน ปรับกล้องจุลทรรศน์ (Olympus Optical Co., LTD. Japan G 92108) ไปที่บริเวณพื้นที่จตุรัสตรงกลาง ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ นับ ใช้กำลังขยายสูงนับจำนวนเม็ดเลือดแดงในบริเวณจตุรัส 5 ช่องของพื้นที่ 1/25 มิลลิเมตร จตุรัส 5 ช่องใช้สีเหลี่ยมขอบนอก 4 ช่อง และตรงกลาง 1 ช่อง (ภาพที่ 16) ในการนับเม็ดเลือดจะมีเม็ดเลือดบางส่วนติดอยู่ตามขอบของจตุรัส นับเม็ดเลือดเหล่านั้นจาก 2 ด้านของจตุรัส (ด้านขวาและด้านล่าง) อีก 2 ด้านไม่นับ (ด้านซ้ายและด้านบน) คำนวณจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีการเจือจางต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร โดยมีวิธีการคำนวณตามแบบของ Benjamin, 1961 ดังต่อไปนี้

X = จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้

Y = จำนวนเม็ดเลือดแดงต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ดังนั้น $Y = X * 10,000$ เซล/ลูกบาศก์มิลลิเมตร



R หมายถึงบริเวณที่นับจำนวน
เม็ดเลือดแดง

ภาพที่ 16 บริเวณนับจำนวนเม็ดเลือดแดงในแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด

3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของคอร์ติซอล (Cor) โดยใช้วิธี เรดิโออิมมูโนโน แอสเสย์ (RIA) ด้วย Amerlex Cortisol RIA Kit Code IM.2021 Kodak Clinical Diagnostics LTD. Amersham UK.

ก) เตรียมสารละลายซีรัมมาตรฐาน (standard solution) นำขวดสารละลายซีรัมมาตรฐานที่อยู่ในรูป freeze dried มาเติมน้ำกลั่นขวดละ 500 ไมโครลิตร เขย่าอย่างนุ่มนวล เพื่อให้ส่วนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน สารละลายซีรัมมาตรฐานมีความเข้มข้นของคอร์ติซอล ดังนี้
ขวด A = 0 nmol/l, ขวด B = 30 nmol/l, ขวด C = 115 nmol/l, ขวด D = 315 nmol/l,
ขวด E = 740 nmol/l และขวด F = 1,696 nmol/l

ข) ละลายซีรัมของตัวอย่างที่นำมาหาค่าปริมาณคอร์ติซอล โดยนำออกจากช่องแช่แข็ง (-20 °C) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (18°C ถึง 28°C) จนกระทั่งซีรัมละลายจนหมด

ค) เตรียมการวิเคราะห์โดยการเขียนฉลากติดลำดับหลอดพลาสติกขนาด 5 ซีซี โดยมีจำนวนและการเรียงลำดับหลอด ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จำนวนและการเรียงลำดับหลอดในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง

ลำดับที่	ชื่อหลอด	จำนวน	หมายเหตุ
1 - 4	A	4	ความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล 0 nmol/l
5 - 6	Total count (TC)	2	มีเฉพาะฮอร์โมนคอติโซลที่ติดฉลากไอโอดีน 125
7 - 9	B	3	ความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล 30 nmol/l
10 - 12	C	3	ความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล 115 nmol/l
13 - 15	D	3	ความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล 315 nmol/l
16 - 18	E	3	ความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล 740 nmol/l
19 - 21	F	3	ความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล 1,690 nmol/l
22	หลอดเปล่า	1	เพิ่มความถูกต้องของการนับของเครื่อง
23 - 24	Q1**	2	ความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล 370 nmol/l
25 - 26	Q2	2	ความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล 140 nmol/l
27 - 46	HF1-HF10	20	หมายเลขละ 2 หลอด *
47 - 66	NT1-NT10	20	หมายเลขละ 2 หลอด
67 - 68	Q1	2	ความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล 370 nmol/l
69 - 70	Q2	2	ความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล 140 nmol/l
71 - 90	HF1-HF10	20	หมายเลขละ 2 หลอด
91 - 110	NT1-NT10	20	หมายเลขละ 2 หลอด
111 -	Q1	2	ความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล 370 nmol/l
112			
113 - 114	Q2	2	ความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล 140 nmol/l

* เพื่อนำไปใช้ในการหาค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของฮอร์โมนทำให้เกิดความน่าเชื่อถือของค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ เมื่อมีสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่มีค่าต่ำ

** Q1 และ Q2 เป็นตัวอย่างซีรัมที่ได้จากคนไข้ โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก หน่วยเวชศาสตร์นิวเคลียร์ ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง

ง) วิเคราะห์ โดยการเติมสารละลายตามลำดับดังนี้ (ภาพที่ 17)

1. ไปเปิดสารละลายซีรัมมาตรฐาน Q1* Q2* และตัวอย่างซีรัมที่จะวิเคราะห์หาความเข้มข้นฮอร์โมนคอติโซล 50 μ l ลงในหลอดที่ติดฉลากไว้ตามลำดับ ยกเว้นในหลอด Total Count (TC)

2. ไปเปิดสารละลายฮอร์โมนคอติโซลที่ติดฉลากด้วยไอโอดีน 125 (I^{125}) 200 μ l ลงในทุกหลอด เป็นแอนติเจนที่ติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสีที่ใช้วิเคราะห์ความเข้มข้นของฮอร์โมน โดยทางอ้อม อาศัยหลักการของ RIA คือการแย่งกันจับระหว่างแอนติเจนที่ติดฉลากและแอนติเจนที่อยู่ในซีรัมกับแอนติบอดี จากนั้นแยกส่วนที่เป็นแอนติเจนอิสระ ออกจากส่วนที่เกิดปฏิกิริยา และรวมตัวกันอยู่ในรูปสารประกอบของแอนติเจน-แอนติบอดี ซึ่งมีทั้งสารประกอบแอนติเจนติดฉลาก-แอนติบอดี และสารประกอบแอนติเจนในซีรัม-แอนติบอดี วัดปริมาณสารกัมมันตภาพรังสีจากสารประกอบแอนติเจนติดฉลาก-แอนติบอดี คำนวณกลับเป็นปริมาณความเข้มข้นของแอนติเจนในตัวอย่างซีรัม โดยอาศัยชุดของตัวอย่างที่ทราบค่าความเข้มข้นสารละลายซีรัมมาตรฐานที่วิเคราะห์พร้อมกันในแต่ละครั้ง

3. ไปเปิดสารละลายแอนติบอดีของฮอร์โมนคอติโซล 200 μ l (เป็นแอนติบอดีของฮอร์โมนคอติโซลที่ได้จากแกะ) ลงในทุกหลอด ยกเว้นหลอด TC

4. ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันโดยใช้ Vortex genie 2 TM. Model G-560E เป็นเวลา 1 นาที

5. นำมาบ่มที่อ่างน้ำอุณหภูมิ $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้การเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดี และแอนติเจนสามารถเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

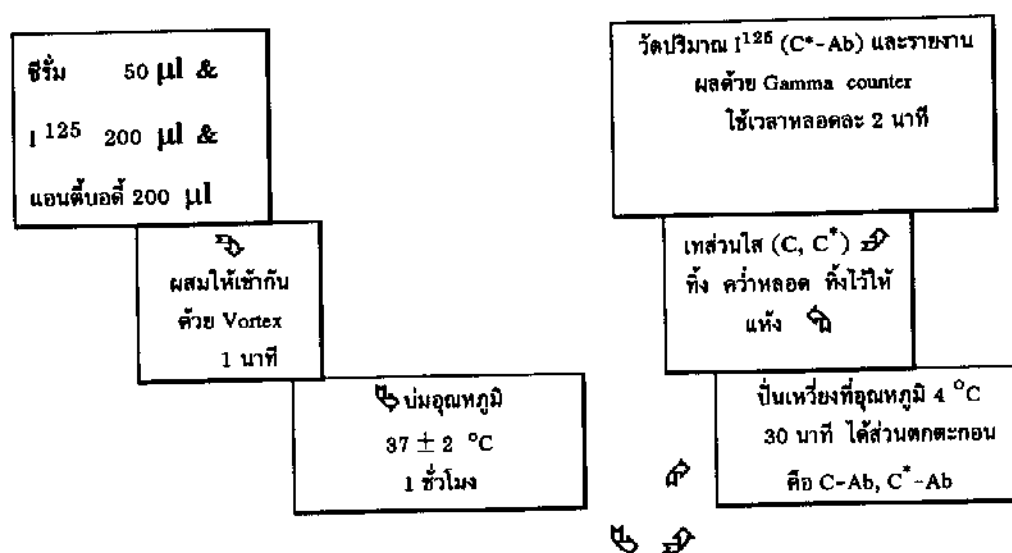
6. หลังจากบ่มแล้วปั่นทุกหลอดที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตกตะกอนฮอร์โมนคอติโซลที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีเรียบร้อยแล้ว (ทั้งฮอร์โมนที่มีในตัวอย่างซีรัม (C) และฮอร์โมนติดฉลากไอโอดีน 125 (C^*) ซึ่งจะแย่งกันทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี) โดยแยกหลอด TC ไว้ไม่ต้องปั่น

7. หลังจากปั่นเรียบร้อยแล้วได้สารประกอบฮอร์โมนในตัวอย่างซีรัม-แอนติบอดี (C-Ab) และฮอร์โมนที่ติดฉลากไอโอดีน 125-แอนติบอดี (C^* -Ab) ตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ทำการรินของเหลวที่อยู่ส่วนบนออกทันที (ซึ่งมีฮอร์โมนคอติโซลอิสระเป็นส่วนประกอบ (C และ C^*) เป็นการแยกแอนติเจนในรูปอิสระออกจากสารประกอบแอนติเจน-แอนติบอดี) คว่ำหลอดทิ้งไว้ประมาณ 10 ถึง 15 นาที เพื่อให้ส่วนที่ตกตะกอนอยู่ได้หลอดแห้งสนิท (ไม่ให้เกิดการปนของแอนติเจนอิสระ อันก่อให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์) ใช้กระดาษซับช่วยซับสารละลายที่เหลือจนหลอดแห้งสนิท

8. ทำการนับปริมาณสารกัมมันตภาพรังสีในสารประกอบฮอร์โมนติดฉลาก-แอนติบอดี ด้วยเครื่อง gamma counter (LKB-Wallac 1275 Mini Gamma counter Models 1275-002 ประสิทธิภาพในการวัด = 80%) หลอดละ 2 นาที โดยสามารถทราบความเข้มข้นของ

ซอร์โบนคอดีโซลในตัวอย่างซีรัมจากการคำนวณของโปรแกรมในเครื่องโดยอัตโนมัติ (ได้แสดงตัวอย่างการรายงานผลของการวิเคราะห์ในภาคผนวก ค.)

หมายเหตุ ตัวอย่างซีรัมที่วิเคราะห์ค่าความเข้มข้นซอร์โบนคอดีโซล เป็นตัวอย่างที่ได้จากการเก็บเลือดในวันที่ 2 ของการทดลองครั้งที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 ในแต่ละฤดูกาล เนื่องจากข้อจำกัดทางด้านงบประมาณในการวิเคราะห์ จึงไม่สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างซีรัมที่เก็บในทุกครั้งได้ และในการวิเคราะห์ทุกชุดมีขั้นตอนในการวิเคราะห์เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 17 แผนผังขั้นตอนการวิเคราะห์ซอร์โบนคอดีโซลโดยวิธีเรดิโออิมมูโนโนแอสเสย์

3.5.1 ความเชื่อถือได้ของวิธีการวัดฮอร์โมนคอติโซล

ก) ความแม่นยำภายในแอสเสย์ครั้งเดียวกัน (intra-assay precision check)

ความแม่นยำในการวิเคราะห์ครั้งเดียวกัน (intra-assay) ได้ใช้ตัวอย่างซีรัม 2 ระดับความเข้มข้น

1. ใช้ตัวอย่างซีรัมของหนูซึ่งมีระดับฮอร์โมนคอติโซลอยู่ในระดับต่ำสูง (Q1)

2. ใช้ตัวอย่างซีรัมของหนูซึ่งมีระดับฮอร์โมนคอติโซลอยู่ในระดับต่ำ (Q2)

ทำการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนคอติโซล ตัวอย่างละ 20 หลอดในครั้งเดียวกัน นำค่าความเข้มข้นที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV.) ซึ่งแสดงในตารางที่ 6 ค่า CV. ที่ถือเป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ คือมีค่าไม่เกิน 5 % (ปณิตดา, 2530)

ตารางที่ 6 ความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซลในการวิเคราะห์ครั้งเดียวกัน (intra-assay)

ซีรัมตัวอย่าง	จำนวน (หลอด)	ความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล (nmol/l) ($\bar{x} \pm 2SD$)	CV. (%)
Q1	20	385.72 ± 10.77	1.39
Q2	20	139.73 ± 4.15	1.48

ที่มา : หน่วยเวชศาสตร์นิวเคลียร์ ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (2536)

ข) ความแม่นยำในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของฮอร์โมน ในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง (inter-assay precision check)

ใช้ตัวอย่างชุดควบคุมคุณภาพเดิม (Q1, Q2) เช่นเดียวกับการหาค่าความแม่นยำในการวิเคราะห์ครั้งเดียวกัน (intra-assay precision check) ทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซลของชุดควบคุมคุณภาพ (Q1, Q2) พร้อม ๆ กับซีรัมตัวอย่างทุกครั้งที่วิเคราะห์ตัวอย่าง นำค่าความเข้มข้นของทั้ง 10 ครั้งที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) $\bar{x} \pm 2SD$ และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนได้ค่าตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ความแม่นยำในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฮอร์โมนคอติโซล ในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง (inter assay)

ซีรัมตัวอย่าง	จำนวน (ครั้ง)	ความเข้มข้นของฮอร์โมน (nmol/l) ($\bar{x} \pm 2 SD$)	CV. (%)
Q1	10	387.11 ± 4.93	0.558
Q2	10	139.84 ± 3.87	1.281

ค) การหาความคลาดเคลื่อนเนื่องจากช่วงเวลา

เป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากช่วงเวลาในการทำแอสเสย์นั้น ๆ คือที่ต้นชุดการทดลอง (batch) กลาง batch และท้าย batch ซึ่งมีความห่างของเวลาในการทำว่าจะมีผลแตกต่างกันหรือไม่ โดยทำ duplicate ของตัวอย่างซีรัม Q1, Q2 ในแต่ละช่วงของแอสเสย์ แล้วนำค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ได้ในแต่ละช่วง มาหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนซึ่งไม่ควรแตกต่างกันเกิน 5 % CV.(ปกติค่า, 2530) แสดงผลการวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนเนื่องจากเวลาที่ตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนเนื่องจากเวลา ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นฮอร์โมนคอติโซลโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ 10 ชุดการวิเคราะห์

ซีรัมตัวอย่าง	ชุดที่	CV. (%)	ซีรัมตัวอย่าง	ชุดที่	CV. (%)
Q1	1	1.424	Q2	1	1.808
	2	1.400		2	1.692
	3	1.345		3	1.245
	4	1.380		4	1.276
	5	0.930		5	1.056
	6	1.077		6	1.468
	7	1.357		7	1.462
	8	1.154		8	1.326
	9	0.964		9	1.426
	10	0.711		10	1.303

ง) ค่า Sensitivity ของการวิเคราะห์

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ของความแปรปรวนจากชุด Standard ภายในแอสเสย์เดียวกัน จากการวิเคราะห์ของ Kodak Clinical Diagnostics Amerlex Cortisol RIA Kit (P.18) ได้ค่า Sensitivity เท่ากับ 2.76 nmol/l

จ) ความจำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้ในการวิเคราะห์

จากข้อมูลของชุดวิเคราะห์ Kodak Clinical Diagnostics Amerlex Cortisol RIA Kit , P.19 คำนวณค่า % cross reactivity ได้ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่า % cross reactivity

Steroid	% cross reactivity	Steroid	% cross reactivity
Cortisol	100	Canrenone	0.05
Prednisolone	35	β - cortol	0.05
11 - Desoxycortisol	1.8	Progesterone	0.05
Cortisone	1.8	5 β - Dihydrocortisone	0.06
Cortisol-21 - glucosidiuronate	1.5	Androstenedione	< 0.05
Corticosterone	0.6	β - cortolone	< 0.05
11 - Desoxycorticosterone	< 0.5	Cholesterol	< 0.05
5 β - Dihydrocortisol	0.3	Epiandrosterone	< 0.05
Prednisone	0.2	Spirolactone	< 0.05
Dexanethasone	0.1	Testosterone	< 0.05
Tetrahydrocortisol	< 0.1	Tetrahydrocortisone	< 0.05

3.6 การจัดสัตว์เข้าทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การจัดสัตว์เข้าทดลองโดย ทำการสุ่มโคเป็นคู่ประกอบด้วยโค 2 พันธุ์ คือ พันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ไฮลสไธน์-ฟรีเซียน โดยการจับฉลากหมายเลขตัวสัตว์ สุ่มโคเข้าคอกทดลองตามลำดับ 1 ถึง 7 และจัดลำดับการเก็บตัวอย่างในแต่ละคู่ โดยสุ่มด้วยวิธีการจับฉลากเช่นกัน มีระยะห่างระหว่างคู่ 7-14 วัน การเก็บตัวอย่างแต่ละคู่ทำ 2 วันติดต่อกัน วัดค่าสังเกตวันละ 10 ครั้ง คือ 2 ครั้งแรกโคอยู่ในร่ม 6 ครั้งถัดมาโคอยู่กลางแจ้ง และ 2 ครั้งสุดท้ายนำโคกลับเข้าร่ม แต่ละครั้งห่างกัน 30 นาที แบ่งการเก็บตัวอย่างเป็น 4 ช่วงใน 1 ปี โดยพักระหว่างช่วงการเก็บตัวอย่าง

ประมาณ 1 เดือน สำหรับการวิเคราะห์ค่าทางสถิติใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (1985) วิเคราะห์ โดยมีแบบหุ้ดดังต่อไปนี้

$$Y_{ijklm} = \mu + B_i + C(B)_{il} + S_j + S*B_{ij} + S*C(B)_{ijl} + T_k + T*B_{ik} + T*C(B)_{ikl} + T*S_{jk} + T*B*S_{ijk} + \epsilon_{ijklm}$$

Y_{ijklm} = ค่าสังเกตที่ได้จากพันธุ์ที่ i ช่วงการเก็บตัวอย่างที่ j เวลาที่ k โคที่ l ซ้ำที่ m

μ = ค่าเฉลี่ยของประชากร

B_i = อิทธิพลเนื่องจากพันธุ์ โดยที่ i = พันธุ์ไฮสโตน-ฟรีเซียน และ พันธุ์พื้นเมือง

$C(B)_{il}$ = อิทธิพลเนื่องจากโคที่ทดลองในแต่ละพันธุ์ โดยที่ $l = 1-7$

S_j = อิทธิพลเนื่องจากช่วงการเก็บตัวอย่าง โดยที่ j = ช่วงที่ 1, ช่วงที่ 2, ช่วงที่ 3 และช่วงที่ 4

$S*B_{ij}$ = อิทธิพลร่วมระหว่างช่วงเก็บตัวอย่างที่ j และพันธุ์ที่ i

$S*C(B)_{ijl}$ = อิทธิพลร่วมระหว่าง ช่วงการเก็บตัวอย่างที่ j และ โคที่ทดลองที่ l พันธุ์ที่ i

T_k = อิทธิพลเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป โดยที่ $k =$ ในร่ม ก่อนออกกลางแจ้ง, ขณะอยู่กลางแจ้ง และในร่มหลังออกกลางแจ้ง

$T*B_{ik}$ = อิทธิพลร่วมระหว่างสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปที่ k และพันธุ์ที่ i

$T*C(B)_{ikl}$ = อิทธิพลร่วมระหว่างสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปที่ k และโคที่ทดลองที่ l พันธุ์ที่ i

$T*S_{jk}$ = อิทธิพลร่วมระหว่างสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปที่ k และช่วงการเก็บตัวอย่างที่ j

$T*B*S_{ijk}$ = อิทธิพลร่วมระหว่างสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปที่ k พันธุ์ที่ i และช่วงการเก็บตัวอย่างที่ j

ϵ_{ijklm} = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยทางธรรมชาติของหน่วยทดลอง

สำหรับผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ทำการตรวจสอบและวัดความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan's New Multiple Range test แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเฉลี่ยต่าง ๆ ใน ภาคผนวก ข.