หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ในบรรดาสัตว์เศรษฐกิจที่เลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบัน กระบือ (Bubalus bubalis Linn.) นับว่าเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญกับมนุษย์มาช้านาน กระบือเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ruminant) เช่นเดียวกับโค และแกะ สามารถใช้อาหาร เช่น หญ้า ที่อยู่ตามไร่นา ซึ่งมีคุณภาพไม่ดีนักมาเปลี่ยนเป็นเนื้อ หนัง และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ซึ่งรวมทั้งแรงงานด้วย ในสภาพความเป็นจริงแล้ว ถ้าพิจารณาในด้านความทนทานต่อสภาพแวดล้อม กระบือมีความเหมาะสมที่จะเลี้ยงมากกว่าโค ถึงแม้นว่าในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้หันมาสนใจที่จะศึกษาวิจัยเรื่องของกระบือมากขึ้น แต่วิทยาการด้านกระบือก็มีสิ่งที่ต้องการศึกษาค้นคว้าอีกมาก เพราะการเลี้ยงกระบือส่วนมากอยู่ทางแถบเอเชีย งานวิจัยของกระบือจึงมีน้อยเมื่อเทียบกับโค เนื่องจากงานวิจัยส่วนใหญ่มาจากประเทศทางตะวันตกซึ่งนิยมเลี้ยงโคมาเป็นเวลานาน

สำหรับประเทศไทย สัตว์จำพวกโค กระบือ นับว่ามีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันจำนวนโค กระบือไม่เพิ่มขึ้นเท่าที่ควร เมื่อเทียบกับจำนวนของประชากร เนื่องจากกระบืออุ้มท้องนานกว่าโคประมาณ 45 วัน และอายุการเป็นหนุ่มสาวช้ากว่าโคประมาณ 6 เดือน (ประสพ บูรณมานัส, 2520) นอกจากนี้จากการศึกษาทางต่อมไร้ท่อเรื่องฮอร์โมนเพศพบว่ากระบือมีวงรอบการเป็นสัด (estrus cycle) ไม่สม่ำเสมอและมีระยะเวลาเป็นสัดยาวนานกว่าโค กระบือมีระยะเวลาเป็นสัดได้ตั้งแต่ 24-72 ชั่วโมง(มณีวรรณ กมลพัฒนะ และสรรเพชญ โสภณ, 2530) จึงทำให้การเพิ่มจำนวนของกระบือทำได้ช้ากว่าโค ทั้ง ๆ ที่กระบือมีความเหมาะสมที่จะเลี้ยงในประเทศไทยได้ง่ายกว่าโค การย้ายฝากตัวอ่อนในกระบือจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยพัฒนาการเพิ่มปริมาณของกระบือที่มีคุณภาพดี

การย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer) คือเทคนิคทางการขยายพันธุ์สัตว์ประกอบด้วยสัตว์เพศเมียในวัยเจริญพันธุ์และมีความสมบูรณ์ทางเพศซึ่งเป็นแม่ตัวให้ (donor) ทำการฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการตกไข่ (superovulation) ให้มีจำนวนไข่ (ova) มากกว่าสภาวะการตกไข่ปกติ หลังจากนั้นทำการผสมพันธุ์โดยการผสมเทียมหรือผสมโดยใช้พ่อพันธุ์เพื่อให้เกิดการปฏิสนธิภายในตัวสัตว์ จากนั้นทำการเก็บตัวอ่อนย้ายไปฝากแม่สัตว์อีกตัวหนึ่งเรียกว่าแม่ตัวรับ (recipient) ที่ถูกฉีดฮอร์โมนปรับสภาวะของมดลูกให้อยู่ในระยะเดียวกันกับแม่ตัวให้ เตรียมรับการฝังตัวอ่อนจากแม่ตัวให้ ตัวอ่อนจะฝังตัวเจริญเติบโตได้รับอาหารและการเลี้ยงดูจากแม่ตัวรับ ลูกสัตว์ที่เกิดมาจะมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนแม่ตัวให้และพ่อพันธุ์ที่ผสม

มีรายงานการย้ายฝากตัวอ่อนสำเร็จครั้งแรกในกระต่าย ที่มหาวิทยาลัยแคมบริดจ์ ประเทศอังกฤษ (Heape, 1890) ต่อมามีผู้ศึกษาเพื่อทำในโค (Hartman et al., 1931; Dowling, 1919; Umbaugh, 1949) การย้ายฝากตัวอ่อนในโคได้ก้าวหน้าเป็นลำดับอย่างรวดเร็ว ความคิดที่จะศึกษาความเป็นไปได้ของการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนี้ในกระบือปลักจึงได้เกิดขึ้น ได้มีการพยายามย้ายฝากตัวอ่อนในกระบือปลักในประเทศไทยขึ้นโดย พิทยา ตั้งธนะวัฒน์ และคณะ (2524), สมิต นิตยวรรธนะ และคณะ (2525), Maneewan Kamonpatana et al. (1985) Peerasak Chantaraprateep et al. (1988) ซึ่งในรายงานทั้งหมดประสพความสำเร็จในการเก็บตัวอ่อนได้ในอัตราที่ต่ำและได้รับตัวอ่อนในระยะเจริญเติบโตที่แตกต่างกันไป และได้พยายามย้ายฝากไปยังตัวรับ แต่ยังไม่ประสพความสำเร็จ ในปี ค.ศ. 1984 Sharifuddin และ Jainudeen ได้รายงานการทำให้ไข่ตกเพิ่มขึ้น และล้างเก็บตัวอ่อนจากกระบือปลักของมาเลเซียแต่ปรากฏว่าล้างเก็บตัวอ่อนไม่ได้เลย

ได้มีรายงานประสพความสำเร็จครั้งแรกในปี ค.ศ. 1983 โดย Drost et al. ซึ่งได้ทำการย้ายฝากตัวอ่อนในกระบือแม่น้ำพันธุ์ Jaffarabadi ที่เลี้ยงอยู่ในประเทศสหรัฐอเมริกา แม่กระบือตั้งท้องเป็นเวลา 300 วัน ได้ลูกกระบือเพศผู้มีน้ำหนัก 35 กิโลกรัม ต่อจากนั้นก็ยังไม่มีรายงานถึงความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนในกระบืออีกเลยจนปี ค.ศ. 1989 Peerasak Chantaraprateep, Kobayashi et al. ได้รายงานผลสำเร็จครั้งแรกของการย้ายฝากตัวอ่อนแบบนิรศัลยกรรมในกระบือปลักไทย โดยแม่กระบือตัวรับ 2 ตัวที่ได้รับตัวอ่อนระยะ morula จากการกระตุ้นให้ตกไข่ครั้งที่ 2 ปรากฏว่าตั้งท้อง และกำหนดคลอดประมาณกลางเดือนมีนาคม ค.ศ. 1989

พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป (2531) ได้กล่าวถึงประโยชน์และวัตถุประสงค์ในการย้ายฝากตัวอ่อนโดยสรุปได้ดังนี้ คือใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และเพิ่มการผลิตสายพันธุ์สัตว์ที่ต้องการ ช่วยในการวางแผนการผสมพันธุ์โดยสามารถกระจายสายพันธุ์ของแม่กระบือที่ผ่านการทดสอบให้เร็วขึ้น ใช้เพื่อทดสอบพันธุ์ของพ่อพันธุ์ที่ใช้ในสถานีผสมเทียมเพื่อกำจัดลักษณะพันธุกรรมที่ไม่ต้องการออก ใช้เพื่อผลิตลูกแฝดโดยการฝากตัวอ่อนที่ปีกมดลูกข้างละตัวให้แก่แม่ที่ไม่ได้รับการผสมหรือฝากตัวอ่อนเพิ่มขึ้นอีก 1 ตัว ให้แก่ตัวที่ได้รับการผสมแล้วโดยฝากด้านตรงข้ามกับด้านที่มีไข่ตก ใช้ในธุรกิจเกี่ยวกับตัวอ่อนระดับนานาชาติ โดยช่วยลดปัญหาการขนส่งสัตว์มีชีวิต ช่วยเสริมการทำงานของระบบสืบพันธุ์ในการทำวิจัยและที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการย้ายฝากตัวอ่อนคือ เพื่อใช้ในการการควบคุมโรคเพราะตัวอ่อนมีโอกาสน้อยหรือแทบไม่มีเลยในการแพร่โรคติดต่อที่สำคัญ

<u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

- ศึกษาวิธีการกระตุ้นให้ตกไข่เพิ่มขึ้นโดยใช้ฮอร์โมน
- ศึกษากระบวนการเก็บตัวอ่อนในแม่กระบือปลัก
- เพื่ออนุรักษ์พันธุกรรมของกระบือปลักไทย

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการย้ายฝากตัวอ่อนในกระบือปลักต่อไปในอนาคต ซึ่งจะช่วยพัฒนาปศุสัตว์ของประเทศไทยในการที่จะขยายพันธุ์กระบือปลักได้อย่างรวดเร็ว และลดระยะเวลาของการสร้างกระบือปลักที่มีคุณภาพ นอกจากนั้นยังเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชั้นสูง อันได้แก่ การผลิตลูกแฝด การแยกเพศ และการแลกเปลี่ยนยีน ที่เป็นประโยชน์อย่างมากก็คือ เป็นแนวทางในการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ หรือพันธุกรรมของสัตว์ (animal genetics resources) เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กระบือปลัก และป้องกันการสูญเสียพันธุกรรมที่ดีของกระบือปลัก

การตรวจสอบเอกสาร

ขั้นตอนของการย้ายฝากตัวอ่อนในกระบือมีหลักการและเทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนที่ดัดแปลงและปรับปรุงให้เหมาะสมกับกระบือดังนี้ คือ

- การคัดเลือกตัวให้และตัวรับ
- การกระตุ้นให้ตกไข่เพิ่มขึ้นในตัวให้และเหนี่ยวนำให้เป็นสัดพร้อมกันทั้งตัวให้และตัวรับ
- การตรวจการเป็นสัดและการผสมพันธุ์ตัวให้
- การเก็บตัวอ่อนจากตัวให้
- การประเมินคุณภาพตัวอ่อน
- การย้ายฝากตัวอ่อนไปยังตัวรับ

การคัดเลือกตัวให้และตัวรับ

การคัดเลือกตัวให้

กระบือตัวให้จะต้องเป็นกระบือที่มีคุณภาพต่าง ๆ ดี โดยมีค่าทางเศรษฐกิจต่าง ๆ เหนือกว่าค่าเฉลี่ยของกระบือกลุ่มเดียวกันที่นำมาทดสอบสมรรถภาพ มีระบบสืบพันธุ์ปกติทุกประการ โดยเฉพาะวงจรการเป็นสัด มีการแสดงอาการเป็นสัดให้เห็นอย่างเด่นชัดและผสมติดง่าย อายุผ่านวัยเจริญพันธุ์ไปแล้วและถ้ามีลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ตัว จะยิ่งดี แสดงว่ามีความสมบูรณ์พันธุ์ นิสัยดี ไม่ดุร้าย เพราะจะช่วยในการปฏิบัติงานให้เป็นไปอย่างเรียบร้อย ต้องปลอดโรคต่าง ๆ และได้รับวัคซีนป้องกันโรคที่สำคัญด้วย (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531)

การคัดเลือกตัวรับ

จะต้องเป็นกระบือที่มีระบบการสืบพันธุ์เป็นปกติดี แสดงพฤติกรรมทางเพศขณะเป็นสัดอย่างชัดเจน มีวงจรการเป็นสัดสม่ำเสมอ ประวัติผสมติดง่าย คลอดลูกง่ายและเลี้ยงลูกได้ดี ควรคลอดลูกมาแล้ว 1-2 ตัว มีสุขภาพแข็งแรงปลอดโรคติดต่อต่าง ๆ และได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคที่สำคัญแล้ว (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การกระตุ้นให้ตกไข่เพิ่มขึ้นในตัวให้และเหนี่ยวนำให้เป็นสัดพร้อมกันทั้งตัวให้และตัวรับ

การกระตุ้นทำให้ไข่ตกเพิ่มขึ้น (superovulation)

เป็นวิธีการทำโดยใช้ฮอร์โมน gonadotrophin กระตุ้นให้มีการเจริญมากขึ้นของ follicle และ กระตุ้นการตกไข่เพิ่มขึ้นด้วย ทำให้สามารถผลิตไข่หรือตัวอ่อนที่ได้จากตัวให้ที่มีลักษณะดีตามที่เราได้คัดเลือกมาแล้วเพิ่มมากขึ้น เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากในกระบวนการย้ายฝากตัวอ่อน

จากการศึกษาทั้งทางระบบกายวิภาคและสรีรวิทยาของการสืบพันธุ์ของกระบือปลัก พบว่าคล้ายคลึงกับโคมาก (ชัยฉรงค์ โลหชิต และคณะ, 2530) ทำให้เราสามารถใช้พื้นฐานทางสรีรวิทยาของการสืบพันธุ์ในโคมาเป็นพื้นฐานเพื่อทำความเข้าใจ และนำไปประยุกต์ใช้ในกระบือต่อไป ซึ่ง รังสรรค์ พาลพ่าย (2530) ได้อ้างผลการศึกษาของ Moor et al. (1984) ที่พบว่าในแต่ละวงจรการเป็นสัดของโคในรังไข่แต่ละข้างจะมี follicle ที่จะเจริญ 8-10 ใบ แต่จะมีเพียง 1 ใบหรือบางครั้ง 2 ใบ ที่สามารถเจริญต่อไปได้จนตกไข่ลงมา ส่วนที่เหลือจะฝ่อไปตั้งแต่กึ่งกลางของวงจรการเป็นสัด กลไกของฮอร์โมน gonadotrophin ในการกระตุ้นให้ตกไข่เพิ่มขึ้นก็คือ จะไปยับยั้งไม่ให้ follicle ที่มีอยู่ในขณะนี้ฝ่อไปเสียก่อนและยังกระตุ้นให้ follicle เหล่านี้ เจริญเติบโตต่อไปได้ โดย follicle อยู่ในสภาพที่เจริญเติบโตต่อไปได้นั้นจะมีจำนวนมากในระหว่างวันที่ 9-13 ของวงจรการเป็นสัด การให้ฮอร์โมนจากภายนอกระหว่างนี้ในปริมาณที่เหมาะสมทำให้ follicle ที่มีอยู่ข้างละ 8-10 ใบ เจริญเติบโตต่อไปจนไข่ตก การตอบสนองต่อฮอร์โมนที่ใช้กระตุ้นให้ไข่ตกเพิ่มขึ้นของสัตว์ตัวให้แต่ละตัวจะมีความแปรปรวนขึ้นกับ ความไวของรังไข่ต่อฮอร์โมน พันธุ์สัตว์ อายุสัตว์ตัวให้ สภาวะทางโภชนาการ ชุดของผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนที่ใช้ (Bondurant, 1986) โดยฮอร์โมนที่ใช้ในการกระตุ้นให้ตกไข่เพิ่มขึ้นมีดังนี้

1. pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG)

เป็นฮอร์โมนที่สกัดจาก serum ของม้าที่ตั้งท้องระหว่าง 45-120 วัน PMSG มีกึ่งอายุขัย 5 วัน ฉะนั้นการฉีดเพียงครั้งเดียวก็เพียงพอต่อการกระตุ้นให้ตกไข่เพิ่มขึ้น ใช้ฉีดได้ทั้งเข้ากล้ามเนื้อหรือใต้ผิวหนัง ปริมาณที่ใช้อยู่ระหว่าง 1500-3000 IU (หน่วยสากล) ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุ น้ำหนักและ

พันธุ์สัตว์ ข้อดีคือใช้ง่ายเพราะฉีดเพียงครั้งเดียว ราคาถูก หาซื้อได้ง่าย แต่มีข้อระวังคือใช้แล้วจะทำให้สัตว์สร้าง antibody เมื่อการใช้ซ้ำอีกจะทำให้การตอบสนองลดลงและมักจะพบถุงน้ำรังไข่ (6-8 วันหลังผสมเทียม) เนื่องจากฤทธิ์ของ PMSG ที่เหลืออยู่หลังการตกไข่ดังที่ Jillella (1982) รายงานไว้ ในการศึกษาในโค การตกไข่จากการใช้ PMSG อาจจะไม่สม่ำเสมอจึงมีการใช้ฮอร์โมนอื่นเสริม เช่น HCG (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531)

การใช้ PMSG ในปริมาณที่มากขึ้น อาจเพิ่มอัตราการตกไข่ แต่คุณภาพของตัวอ่อนลดลง ทำให้ได้จำนวนตัวอ่อนที่เหมาะสม และโอกาสในการประสพผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนก็จะลดลงด้วย เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก PMSG มีกึ่งอายุขัยยาวถึง 5 วัน แต่ไข่จะตกหลังฉีด PMSG ประมาณ 4.0-4.5 วัน ทำให้มีฤทธิ์ของ PMSG เหลืออยู่ ซึ่งจะไปกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโตของ follicle ขึ้นมาอีกชุดหนึ่ง และ follicle ในชุดใหม่นี้จะสร้างและหลั่งฮอร์โมน estradiol 17 bata เข้าสู่กระแสเลือดมีผลต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนทำให้คุณภาพของตัวอ่อนลดลง จึงมีการนำเอา Anti-PMSG มาใช้ร่วมกับ PMSG โดยจะฉีด Anti-PMSG ระหว่างการแสดงการเป็นสัดเพื่อขจัดฤทธิ์ของ PMSG ที่เหลืออยู่ให้หมดไป (Jillella, 1982)

2. follicle stimulating hormone (FSH)

เป็นฮอร์โมนที่สกัดจากต่อมใต้สมองของม้า สุกรและแกะ ที่ขายส่วนใหญ่มาจากต่อมใต้สมองของสุกร FSH มีกึ่งอายุขัย 2-5 ชั่วโมง ฉะนั้นต้องฉีด FSH ทุกวัน เวลาเช้าและเวลาเย็นติดต่อกัน 4 หรือ 5 วัน โดยอาจฉีดแบบลดปริมาณลงทุกวันหรือแบ่งฉีดในปริมาณที่เท่ากันทุกครั้ง รวมแล้วใช้ FSH ในการกระตุ้นตกไข่ครั้งหนึ่ง ๆ 30-50 มิลลิกรัม ข้อดีคือสามารถใช้ซ้ำได้หลายครั้งโดยไม่มีปัญหาในการสร้าง antibody และให้ผลการตอบสนองค่อนข้างแน่นอนไม่ค่อยมีความแปรปรวน ตัวอ่อนที่ชะล้างได้มีคุณภาพเหมาะสมในการย้ายฝากตัวอ่อนค่อนข้างสูง ข้อเสียคือต้องฉีด 8-10 ครั้ง ทำให้เสียเวลามากและราคาแพงหาซื้อภายในประเทศยาก ใช้ฉีดได้ทั้งเข้ากล้ามเนื้อหรือใต้ผิวหนัง (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531)

การใช้ FSH ในการกระตุ้นให้ไข่ตกมากขึ้นโดยใช้ปริมาณทั้งหมด 30-50 มิลลิกรัม ให้ตัวอ่อนที่สามารถย้ายฝากได้มีคุณภาพดีกว่าใช้ PMSG ในขนาด 1500-4000 IU (Maneewan Kamonpatana, 1990)

3. human chorionic gonadotrophin (HCG)

เป็นฮอร์โมนที่ช่วยให้มีการตกไข่ดีขึ้นและอยู่ในช่วงที่ต้องการได้ ทั้งนี้เนื่องจากการให้ฮอร์โมนกระตุ้นให้เกิดการตกไข่เพิ่มขึ้นนั้น การตกไข่จาก follicle ที่แก่แล้วจะเกิดขึ้นแต่จะตกไม่หมด หรือต้องกินเวลานานเกินไปทำให้เป็นปัญหาต่อการปฏิสนธิของไข่กับอสุจิได้ ดังนั้นการใช้ HCG ในกระบือจะทำให้มีไข่ตกในช่วงเวลาที่ต้องการได้ นิยมใช้ฮอร์โมนนี้เมื่อกระบือเริ่มแสดงอาการเป็นสัด ขนาดที่ใช้ในกระบือ คือ 2500-3000 IU (ชัยณรงค์ โลหิต และคณะ, 2530; พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531)

4. gonadotrophin releasing hormone (GnRH)

ขนาด 0.01-0.02 มิลลิกรัมต่อตัว เป็นฮอร์โมนสังเคราะห์ใช้ฉีดเข้ากล้ามให้แก่ตัวให้ 12-18 ชั่วโมงก่อนการผสม โดยจะออกฤทธิ์เหมือน lutenizing hormone ช่วยกระตุ้นให้มีการตกไข่ (ชัยณรงค์ โลหิต และคณะ, 2530; พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์สำหรับการเร่งการตกไข่ในแม่กระบือ (Peerasak Chantaraprateep, 1991)

วันที่	เวลา	วิธีที่ 1	วิธีที่ 2	วิธีที่ 3
9	24.00-12.00 น.	2000-3000 IU PMSG	5 มก.FSH	5 มก.FSH
	12.00-24.00 น.		5 มก.FSH	5 มก.FSH
10	24.00-12.00 น.		4 มก.FSH	5 มก.FSH
	12.00-24.00 น.	ให้ PGF_2 alpha ตัวรับ	4 มก.FSH	5 มก.FSH
11	24.00-12.00 น.	ให้ PGF_2 alpha ตัวให้	3 มก.FSH	5 มก.FSH
	12.00-24.00 น.		3 มก.FSH	5 มก.FSH
12	24.00-12.00 น.		2 มก.FSH	5 มก.FSH
	12.00-24.00 น.		2 มก.FSH	5 มก.FSH
13	24.00-12.00 น.		2 มก.FSH	5 มก.FSH
	12.00-24.00 น.	ผสมเทียม	2 มก.FSH	5 มก.FSH
14	24.00-12.00 น.	ผสมเทียม	ผสมเทียม	ผสมเทียม
	12.00-24.00 น.	ผสมเทียม	ผสมเทียม	ผสมเทียม

การเหนี่ยวนำให้เป็นสัดพร้อมกันทั้งตัวให้และตัวรับ

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่มีความจำเป็นในการย้ายฝากตัวอ่อนซึ่งมีวิธีการต่างๆกัน โดยมีเหตุผลสำหรับแต่ละวิธีต่างกัน แต่มีวัตถุประสงค์ขั้นสุดท้ายเหมือนกันคือควบคุมการเป็นสัด โดยเมื่อหยุดใช้จะทำให้เกิดการเป็นสัดตามเวลาที่กำหนดหรือช่วยให้สังเกตการเป็นสัดสะดวกขึ้น วิธีการต่างๆที่ใช้มีดังนี้ (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2530)

1. prostaglandin F_2 alpha (PGF_2 alpha)

สาร prostaglandin F_2 alpha สร้างจากเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกายตลอดจนของเหลวในร่างกายด้วยมีฤทธิ์ เช่น ฮอร์โมนทำให้ corpus luteum บนรังไข่ซึ่งมีอายุระหว่างวันที่ 6 ถึง 17 ของวงจรการเป็นสัดเกิดการฝ่อตัว (Cooper, 1974) สำหรับขนาด (dosage) ของสารตัวนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ใช้ เช่น เมื่อฉีดเข้าไปใน corpus luteum โดยตรงใช้ขนาดน้อย (300 ไมโครกรัม) หรือฉีดเข้าปากมดลูก (5 มิลลิกรัม) สารตัวนี้จะใช้ไม่ได้ผลถ้าให้ก่อนวันที่ 5 หรือเลยวันที่ 17 (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2530; Maneewan Kamonpatana, 1990) สารนี้มี 2 ชนิด คือ ชนิดธรรมชาติและชนิดสังเคราะห์ ถ้าสามารถล้วงตรวจรังไข่แล้วพบ corpus luteum ฉีดสารนี้เพียงเข็มเดียวจะทำให้กระบือเป็นสัดภายใน 3-5 วันหลังฉีด (มณีวรรณ กมลพัฒนะ, 2521; พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2525, 2531) การที่จะฉีดสารนี้เพียงเข็มเดียวหรือ 2 เข็มขึ้นกับว่าตรงกับระยะที่ corpus luteum กำลังเจริญอยู่หรือไม่ ถ้ามี corpus luteum กำลังเจริญอยู่ การฉีดสารนี้เพียงเข็มเดียวก็เพียงพอแล้วและยังเป็นการประหยัดด้วย แต่ถ้าเราต้องการผสมพันธุ์โดยไม่ต้องตรวจการเป็นสัด แล้วโปรแกรมฉีดสารนี้ 2 เข็มจะเหมาะกว่า (Peerasak Chantaraprateep, 1987b) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า PGF_2 alpha มีผลทำให้ระยะการเป็นสัดครั้งต่อไปนานขึ้น (Andreson et al., 1977 อ้างโดย พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2530) แต่ไม่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ หรือทำให้อัตราการผสมติดลดลงแต่อย่างใด (Hafez et al., 1974 อ้างโดย พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2530)

2. progestogens

ฮอร์โมน progestogens นี้จะออกฤทธิ์ตรงกันข้ามกับ PGF_2 alpha ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น คือจะยับยั้งการตกไข่และขัดขวางการเป็นสัด การให้ฮอร์โมนนี้ช่วงระยะเวลาหนึ่งจะทำให้เกิดการฝ่อตัวไปตามธรรมชาติของ corpus luteum ในสัตว์ทุกตัวที่ได้รับ จึงทำให้เกิดการเป็นสัดได้เมื่อเลิกใช้ฮอร์โมนนี้ ที่นิยมใช้มี 2 แบบ ดังนี้ (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2530)

2.1 บรรจุเป็นแท่ง (Implant) ใช้ฝังใต้ผิวหนัง ที่ใช้กันในปัจจุบันนี้ คือ ผลิตภัณฑ์ในชื่อการค้าว่า SYNCRO-MATE B ประกอบด้วย norgestomet ขนาด 6 มิลลิกรัม บรรจุแท่งพลาสติก เรียกว่า Implant เป็น progesterone สังเคราะห์มีฤทธิ์สูงมาก ฝัง Implant เข้าใต้ผิวหนังบริเวณใบหูด้านหลัง พร้อมกับฉีด norgertomet ขนาด 30 มิลลิกรัม ร่วมกับฉีด oestradiol valerate 6 มิลลิกรัม เข้ากล้าม ปล่อยทิ้งไว้ 9 วัน แล้วดึงออก ผสมเมื่อประมาณ 48 ชั่วโมงถัดมา หรือ 12 ชั่วโมงหลังแสดงอาการเป็นสัด (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2530, 2531)

2.2 การใส่ห่วงในช่องคลอด โดยมีชื่อการค้าว่า PRID (progesterone releasing-intra vaginal device) นำไปเคลือบด้วย progesterone ตามธรรมชาติ เนื่องจากพื้นที่ของห่วงมีมากจึงช่วยแพร่กระจายฮอร์โมน progesterone ทำให้มีการดูดซึมเข้าร่างกายและรักษาระดับในกระแสเลือดให้เพียงพอกับการที่จะไปยับยั้งการเป็นสัด ระยะเวลาที่ใส่ห่วงประมาณ 9-12 วัน และจะผสมหลังจากดึงห่วงออก 48-56 ชั่วโมง หรือ 12 ชั่วโมง หลังแสดงอาการเป็นสัด (Peerasak Chantaraprateep, 1987a)

<u>การตรวจการเป็นสัดและการผสมพันธุ์ตัวให้</u>

กระบือมีพฤติกรรมการเป็นสัดหลายลักษณะ มักแสดงอาการไม่ชัดเจนและมักไม่แสดงอาการให้เห็นครบตามรายละเอียดต่างๆที่กล่าวไว้ (Peerasak Chantaraprateep, 1985 อ้างโดย พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531) จึงนิยมใช้พ่อกระบือที่ได้ทำการย้ายลำลึงค์แล้ว (Usanakonkul et al., 1980 อ้างโดย พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531) หรือใช้กระบือเพศเมียซึ่งฉีดด้วยฮอร์โมน androgen เพื่อให้มีความรู้สึกเป็นเพศผู้ (Drost et al.,1983; Peerasak Chantaraprateep et al., 1987 อ้างโดย ชัยณรงค์ โลหชิต และคณะ, 2530) ปล่อยคุมฝูงตลอดเวลา การใช้กระบือที่มีการตัดท่อพักตัวอสุจิออก แล้วทำการติด chinball นำมาใช้ในการตรวจสอบการเป็นสัด (Jainudeen, 1986) แต่ Peerasak Chantaraprateep, 1987a) รายงานว่าไม่ได้ผลในกระบือปลัก เนื่องจากเป็นสัตว์ที่อยู่ในปลักโคลน มีการแนะนำว่าการใช้กระบือเผือกสำหรับตรวจการเป็นสัดในฝูงสัตว์เพศเมียที่มีสีดำจะได้ผลดี การล้วงตรวจทางทวารหนัก เพื่อทราบถึงสภาพของรังไข่และ tone มดลูกของกระบือที่เปลี่ยนแปลงไปในช่วงต่าง ๆ ของวงจรการเป็นสัดเป็นวิธีที่ทำได้ และเหมาะสมในทางปฏิบัติ (ประสิทธิ์ โพธิปักษ์ และคณะ, 2524)

การผสมพันธุ์ตัวให้โดยใช้พ่อพันธุ์ผสมจะให้ผลในแง่การการผสมติดดีที่สุด (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531) หรือใช้การผสมเทียม ในการย้ายฝากตัวอ่อนควรจะทำการผสมมากกว่า 1 ครั้ง โดยผสมเมื่อตอนที่เป็นสัดและผสมอีก 1 หรือ 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง (ชัยณรงค์ โลหชิต และคณะ, 2530) หรือทำการผสมเทียมครั้งแรกหลังเริ่มยืนนิ่งรับการผสม 12 ชั่วโมง 3 ครั้ง ห่างกันทุกๆ 12 ชั่วโมง และอาจให้ GnRH เพื่อช่วยกำหนดเวลาของการตกไข่ได้แน่นอนยิ่งขึ้น (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2530) Maneewan Kamonpatana et al. (1985) ได้กำหนดเวลาที่ใช้ผสมเทียม 3 ครั้ง คือ 56, 72 และ 80 ชั่วโมงหลังฉีด prostaglandin F_2 alpha การปฏิสนธิของไข่ในกระบือที่มีการกระตุ้นการตกไข่จำนวนมาก โดยทั่วไปจะต่ำกว่าไข่ในกระบือที่ไม่ได้มีการกระตุ้นการตกไข่ (Elsden, Hasler and Seidel, 1976; Peerasak Chantaraprateep, Kobayashi et al., 1989)

การเก็บตัวอ่อนจากตัวให้

ในกระบือปลักเราสามารถที่จะเก็บตัวอ่อนได้ทั้งวิธีศัลยกรรม และวิธีนิรศัลยกรรม อย่างไรก็ตามวิธีนิรศัลยกรรมจะมีการนำมาใช้มากกว่าวิธีศัลยกรรม เทคนิคของการเก็บตัวอ่อนโดยวิธีนิรศัลยกรรม จะใช้ในการเก็บตัวอ่อนที่มีอายุ 6 หรือ 7 วัน (Thungtanawat et al., 1981; Nittayavardhana et al., 1982; Maneewan Kamonpatana et al., 1985; Drost et al., 1983 อ้างโดย Peerasak Chantaraprateep et al., 1991) การเก็บตัวอ่อนเป็นวิธีหนึ่งที่สะดวกและง่ายที่จะยืนยันว่ามีการตกไข่ในแม่กระบือตัวให้ (พิทยา ตั้งธนะวัฒน์, 2524) ซึ่งอาศัยหลักการทำเช่นเดียวกับโค (Elsden, 1976)

Peerasak Chantaraprateep, Chainarong Lohachit et al.(1989) แนะนำว่าควรจะเก็บตัวอ่อนของกระบือในวันที่ 6 และ 7 หลังจากการเริ่ม standing heat จะได้ตัวอ่อนระยะระหว่าง morula ถึง blastocyst การเก็บตัวอ่อนโดยวิธีนิรศัลยกรรม ก่อนทำการเก็บตัวอ่อนควรทำการอดอาหารแม่กระบือตัวให้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ให้ขาหน้าของสัตว์ถูกยกให้สูงขึ้นเพื่อที่จะทำให้การไหลกลับของน้ำยาชะล้างตัวอ่อนเป็นไปได้สะดวกยิ่งขึ้นขณะทำการเก็บตัวอ่อนพันหางแม่กระบือด้วยเชือกและทำความสะอาดบริเวณปากช่องคลอด โคนหาง และฝีเย็บ ทำการฉีดยากล่อมประสาท xalazine hydrochloride (20 mg/IM) (Rompum ^{R}-Bayer) ในปริมาณ 0.8 มิลลิลิตร/ตัว และฉีด xylocaine hydrochloride 2% ประมาณ 2 มิลลิลิตร/ตัว เข้าไขสันหลัง

(epidural nerve block) เพื่อไม่ให้สัตว์เคลื่อนไหวส่วนท้ายและแกว่งหาง หลังจากฉีดยาทั้งสองชนิดแล้วควรรอประมาณ 15-20 นาที เพื่อให้ฤทธิ์ของยามีผลกับแม่กระบือ ทำการตรวจคลำรังไข่โดยล้วงทางทวารหนักเพื่อตรวจดูจำนวนของการตกไข่ที่รังไข่โดยการนับ corpus luteum ที่มีอยู่ เครื่องมือที่ใช้ทั้งหมดจะต้องถูกทำการฆ่าเชื้อโรคและในขบวนการทำต้องป้องกันการติดเชื้อให้มากที่สุด มือข้างหนึ่งจะล้วงเข้าทางทวารหนักเพื่อที่จะจับช่องคลอดและช่วยนำทางของเครื่องมือที่ใช้เก็บตัวอ่อน ใช้ cervical dilator เพื่อที่จะค่อยๆถ่างและยืด cervix (Chainarong Lohachit, 1981 อ้างโดย Peerasak Chantaraprateep et al., 1991) หลังจากนำ cervical dilator ผ่าน cervix ได้แล้ว cervical dilator จะถูกดึงออก และนำ Foley catheter (French gauze 18 หรือ 20) โดยมีก้านเหล็ก (stylette) อยู่ภายใน ค่อยๆสอดผ่านเข้าไปใน cervix ในโพรงของปีกมดลูกเมื่อ cuff ของ Foley cathether ถูกวางอยู่ในตำแหน่งที่แน่นอนแล้ว คืออยู่จากส่วนหน้าของแยกปีกมดลูกประมาณ 2-3 เซนติเมตร Foley cathether จะถูกอัดอากาศเข้าไป 10-15 มิลลิเมตร ซึ่งจะขึ้นอยู่กับขนาดของมดลูก ต้องระมัดระวังไม่ให้มีการอัดอากาศเร็วหรือช้าจนเกินไปเพราะอาจจะไปทำลาย endometrium ซึ่งเป็นสาเหตุของการมีเลือดไหล

หลังจาก Foley cathether ถูกวางในตำแหน่งที่ต้องการและ cuff ยึดแน่นกับโพรงปีกมดลูกแล้ว stylette จะถูกดึงออกไป และปลาย Foley cathether จะถูกต่อเข้ากับข้อต่อรูปตัว Y ที่ติดอยู่กับท่อทางออกและทางเข้า ท่อทางเข้าจะถูกต่อเข้ากับขวดน้ำยาล้างตัวอ่อนโดยมีถ้วยยางพิเศษคอยควบคุมการไหลของน้ำยาชะล้างตัวอ่อน ท่อทางออกจะถูกใส่เข้าไปใน cylinder ทั้งท่อทางออกและทางเข้าจะถูกหนีบเอาไว้ด้วย artery forceps ขวดน้ำยาชะล้างตัวอ่อนจะถูกวางให้สูงจากพื้นดินประมาณ 2.5-3.0 เมตร น้ำยาที่ใช้ในการล้างเก็บตัวอ่อนก็คือ Dulbecco's phosphate buffer saline (PBS) ต้องมีการเติมยาปฏิชีวนะลงไปในน้ำยาชะล้างตัวอ่อนด้วยเพื่อป้องกันการติดเชื้อโรค ปีกมดลูกข้างที่ทำการชะล้างตัวอ่อนจะใช้มือถือเอาไว้ มดลูกจะถูกเติมน้ำยาชะล้างตัวอ่อนโดยการเปิดทางเข้าของน้ำยา ที่ถูกหนีบไว้ด้วย artery forceps เพื่อที่จะให้น้ำยาชะล้างตัวอ่อนไหลเข้าไปในมดลูกโดยแรงดันของน้ำ ในขั้นแรกน้ำยาชะล้างตัวอ่อนจำนวนเล็กน้อยจะถูกปล่อยให้ไหลผ่านเข้าไปในมดลูก เพื่อที่จะเคลียร์ทางเข้า ปีกมดลูกจะถูกยึดด้วยมือภาย

ในทวารหนักโดยใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ยกปีกมดลูกระหว่างที่น้ำยาไหลเข้าไปในมดลูก เมื่อมดลูกมีขนาดใหญ่ถึงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-7 ซม. ท่อทางเข้าจะถูกปิดด้วยการหนีบ artery forceps และทางออกจะถูกเปิดออก จะค่อย ๆ นวดปีกมดลูกเพื่อที่จะไล่เอาน้ำยาชะล้างตัวอ่อนออกมา

น้ำยาชะล้างตัวอ่อนที่ไหลออกมาจะถูกเก็บเอาไว้ใน cylinder เมื่อปีกมดลูกถูกไล่น้ำยาชะล้างตัวอ่อนหมดแล้วท่อทางออกจะถูกปิด และต่อมาน้ำยาชะล้างตัวอ่อนจะถูกปล่อยเข้าไปใหม่โดยการเปิดทางเข้า วิธีนี้จะถูกทำซ้ำ ๆ จนกระทั่งน้ำยาชะล้างตัวอ่อนประมาณ 500 มิลลิลิตร จะถูกปล่อยเข้าไปในปีกมดลูก หลังจากการชะล้างปีกมดลูกข้างหนึ่งแล้ว Foley cathether จะถูกดึงออกและขั้นตอนนี้จะถูกทำซ้ำบนปีกมดลูกอีกข้างหนึ่งโดยการใช้ Foley cathether อันใหม่ที่ได้รับการฆ่าเชื้อโรคแล้ว (Chainarong Lohachit, 1987 อ้างโดย Peerasak Chantaraprateepet al., 1991)

<u>การประเมินคุณภาพตัวอ่อน</u>

จากการชะล้างตัวอ่อนน้ำยาที่ถูกเก็บไว้ใน cylinder จะถูกป้องกันแสงแดดโดยการใช้ผ้าคลุมและจะถูกนำไปยังห้องปฏิบัติการเพื่อหาตัวอ่อน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ทำการดูดน้ำยาให้เหลือ 100 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการทำกาลักน้ำ โดยการหยดทีละหยดลงในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตรน้ำยาที่เหลือ 100 มิลลิลิตรจะถูกแกว่งเบา ๆ และเทลงใน petri dish ที่ปราศจากเชื้อโรค แล้วนำไปตรวจหาตัวอ่อนภายใต้กล้อง stereomicroscope ที่กำลังขยาย 10 ถึง 40 เท่า (Elsden, 1981 ; Mongkol Techakumphu, 1991)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 การพัฒนาตัวอ่อนของกระบือปลักในระยะเริ่มแรก (Mongkol Techakumphu, 1991)

วันที่หลังทำการผสม	ระยะของการพัฒนา
5.5	8-16 เซลล์
6.0	compact morula
	early blastocyst
6.5	blastocyst
7.0	hatched blastocyst
7.5	hatched expanding blastocyst

Kobayashi, Mongkol Techakumphu and Eiamvitayakorn (1990) พบว่าการพัฒนาตัวอ่อนของกระบือปลักคล้ายกับกระบือมูร่าห์ โดย Drost และ Elsden (1985) รายงานว่าระยะ hatched blastocyst ของกระบือสามารถเก็บได้ในวันที่ 5 แต่ Karaivanov et al. (1988) อ้างโดย Alexievet al., (1989) รายงานว่าตัวอ่อนของกระบือในวันที่ 10 จะเข้าสู่ระยะ morula (early blastocyst) และในวันที่ 15 จะอยู่ในระยะ blastocys จากผลงานที่แตกต่างกัน อาจจะเกิดจากการสังเกตพฤติกรรมการเป็นสัดของกระบือที่ทำได้ยาก ดังนั้นเวลาของการพัฒนาตัวอ่อนตั้งแต่การเป็นสัดอาจถูกประมาณไม่แม่นยำเมื่อเทียบกับเวลาของ standing heat (Mongkol Techakumphu, 1991) Peerasak Chantaraprateep et al. (1988) แสดงให้เห็นถึงเปอร์เซนต์ที่สูงของตัวอ่อนที่ปกติ ที่ได้จากการเก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ตามธรรมชาติมากกว่าการเก็บตัวอ่อนหลังการกระตุ้นการตกไข่

นำตัวอ่อนที่หาได้ไปเก็บไว้ในน้ำยา PBS ซึ่งมี fetal calf serum 20% (ชัยณรงค์ โลหชิต และคณะ, 2530) สมิต นิตยวรรธนะ และคณะ (2525) ได้แนะนำให้ใช้น้ำยาที่เก็บรักษาตัวอ่อนได้นาน คือ TCM 199, BME medium หรือ PBS ร่วมกับ 15-20% fetal calf serum ซึ่งจะทำให้การประเมินคุณภาพตัวอ่อนสามารถทำได้ละเอียดมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เพื่อเตรียมไว้ใช้ในการย้ายฝากต่อไป

Mongkol Techakumphu (1991) ได้จัดคุณภาพของตัวอ่อนออกเป็น 4 เกรด ดังต่อไปนี้

เกรด A (ดีเลิศ) ตัวอ่อน : มีรูปร่างเป็นทรงกลม zona pellucida และ blastomeres ที่มีจะต้องปกติและมีสีกลมกลืนกัน ในกรณีของ blastocyst การปรากฏของ inner cell mass, trophoblast และ blastocoele เป็นสิ่งที่จำเป็น

เกรด B (ดี) ตัวอ่อน : มีรูปร่างไม่เป็นทรงกลม และมี zona pellucida ปกติ แต่ blastomeres ผิดปกติ มี vesicle บางส่วน หรือ cell ที่ตายแล้วอาจมีอยู่บนผิวของ blastomeres

เกรด C (พอใช้) ตัวอ่อน : มีรูปร่างไม่เป็นทรงกลม เช่น อาจมีรูปไข่หรือแบน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าพิการ ตัวอ่อนบางตัวมีช่องว่างใน zona pellucida blastomeres มีการแบ่งตัวผิดปกติ บางครั้งกระจัดกระจายออกไป ในกรณีของ blastocyst เนื้อที่ของ inner cell mass และ trophoblast ไม่ชัดเจน

เกรด D (ไม่ดี) ตัวอ่อน : เป็นไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ ตัวอ่อนถูกทำลายอย่างมากหรือกำลังสลายตัวหรือสลายตัวไปแล้ว

<u>การย้ายฝากตัวอ่อนไปยังตัวรับ</u>

เทคนิคของการย้ายฝากตัวอ่อนทำได้เช่นเดียวกับกรณีของโค คือใช้วิธีการศัลยกรรมหรือวิธีนิรศัลยกรรมก็ได้ แต่ส่วนใหญ่ใช้วิธีนิรศัลยกรรมเช่นเดียวกับกรณีของ Drost et al. (1983) อ้างโดย พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป (2531) Mutter, Graden and Olds (1964) ได้ทำการย้ายฝากตัวอ่อนโดยวิธีนิรศัลยกรรมสำเร็จเป็นครั้งแรก ต่อมาวิธีการนี้มีการพัฒนาขึ้นมาก (Sreenan, 1975; Elsden et al., 1976; Baker and Jillella, 1978) ข้อดีของวิธีนี้อยู่ที่สามารถทำซ้ำได้หลายครั้ง โดยไม่มีอันตรายต่อสัตว์ ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพงหรือเสี่ยงต่ออันตรายจากการวางยาสลบหรือการติดเชื้อและการเสียหายจากการอักเสบของแผลผ่าตัด (Elsden, 1981)

019603

วิธีนิรศัลยกรรมโดยการดูดตัวอ่อนซึ่งได้ตรวจสอบและประเมินคุณภาพว่าดีแล้ว เข้าไปในหลอดพลาสติกใส่น้ำเชื้อที่เรียกว่า french mini-straw ซึ่งมีความจุ 0.25 มิลลิลิตร วิธีทำเริ่มโดยดูดน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน เข้าไปก่อนเล็กน้อยแล้วดูดอากาศเข้าไป ต่อจากนั้นดูดน้ำยาที่มีตัวอ่อนเข้าไปด้วยและตามด้วยฟองอากาศ และน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน ตามลำดับ ดังนั้นน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนจะมีฟองอากาศอยู่ที่ปลายทั้งสองข้าง นำหลอดนี้ไปสอดในท่อเหล็กที่ใช้ในการผสมเทียมตามปกติ สอดท่อพลาสติกปิดทับ ยึดให้แน่นที่ฐานแล้วนำไปผสมให้ตัวรับ ซึ่งมีวงจรเป็นสัดใกล้เคียงกับตัวให้ เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนนี้ทำเช่นเดียวกับการผสมเทียมแต่สอดกระบอกผสมเทียม โดยให้ปลายเข้าไปยังปีกมดลูกด้านที่ตรวจพบ corpus luteum (ชัยณรงค์ โลหชิต, 2530; พีระศักดิ์จันทร์ประทีป, 2531; Elsden, 1981)

ทำการตรวจการตั้งท้องของแม่กระบือตัวรับ การตรวจการตั้งท้องโดยการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนักเป็นวิธีที่สะดวกและให้ผลแน่นอน โดยในโคจะทำการล้างตรวจ 50-60 วันหลังจากการย้ายฝากตัวอ่อน (Wright, 1981) สำหรับกระบือการล้วงตรวจที่ 90 วัน หลังจากการย้ายฝากให้ผลตรวจที่แน่นอน (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 1981 อ้างโดย สมิต นิตยวรรธนะและคณะ, 2525) ในโคพบอัตราการตั้งท้องสูงถึง 64-66% เมื่อใช้ตัวอ่อนระยะ blastocyst (Wright, 1978) และการใช้ตัวอ่อน 2 ตัวย้ายฝากให้แก่ตัวรับมีการตั้งท้องและการอยู่รอดของตัวอ่อนสูงกว่าการใช้ตัวอ่อนเพียงตัวเดียว (Brand, 1978)

ในเรื่องความสำเร็จของทุกประเทศที่ได้ทำการย้ายฝากตัวอ่อนในกระบือตั้งแต่เริ่มทำมาในปี ค.ศ. 1981-1989 นั้น ประสพความสำเร็จน้อยมาก คือ อัตราการเก็บตัวอ่อนที่ได้ต่อแม่กระบือตัวให้เป็น 1.16 ตัวอ่อนและมีคุณภาพเพียง 0.51 ตัวต่อแม่กระบือ และมีอัตราการตั้งท้องต่อตัวให้เพียง 0.06 และได้ลูกกระบือเพียง 0.03 ตัวต่อแม่กระบือตัวให้ 1 ตัว และมีรายงานแสดงให้เห็นว่าลูกกระบือที่ได้นั้นเกิดจากไข่ที่ผสมโดยใช้พ่อพันธุ์หรือโดยการใช้พ่อพันธุ์ร่วมกับน้ำเชื้อแช่แข็ง ส่วนการทำโดยการผสมเทียมอย่างเดียวไม่เคยได้ลูกกระบือเลย (มณีวรรณ กมลพัฒนะ, 2533)