

## บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### 3.1. สัตว์ทดลอง

ใช้แม่โครีดนมในฟาร์มโคนมขนาดใหญ่แห่งหนึ่งในจังหวัดราชบุรี พันธุ์ลูกผสมสายเลือดไฮลด์ไชน์พีรีเซียนสูงกว่า 75% และมีคะแนนความสมบูรณ์ของร่างกาย (ระบบ 1 – 5) มากกว่าหรือเท่ากับ 2.5 ขึ้นไป โดยสุ่มแม่โครีดนมท้องว่างในช่วงเดือนตุลาคม 2542 – มีนาคม 2543 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (C) จำนวน 132 ตัว และกลุ่มทดลอง (T) จำนวน 103 ตัว ซึ่งไม่พบความแตกต่างของช่วงอายุการให้นม จำนวนวันท้องว่าง และจำนวนครั้งการผสมระหว่างแม่โคทั้ง 2 กลุ่ม ( $p > 0.05$ )

3.1.1. กลุ่มควบคุม (C) คือ กลุ่มแม่โคที่ได้รับการผสมเทียมตามโปรแกรมการจัดการปกติของฝูงในช่วงเวลาใกล้เคียงกับแม่โคกลุ่มทดลอง โดยผสมเทียมโคหลังจากสังเกตเห็นอาการยืนนิ่ง (Standing heat) ประมาณ 12 ชม.

3.1.2. กลุ่มทดลอง (T) คือ กลุ่มแม่โคที่เหนียวนำการเป็นสัดโดยการเหนียวนำการเจริญของฟอลลิเคิลด้วยโปรเจสเทอโรนร่วมกับเอสตราไดโอดอล เบนโซเอทและพรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู อัลฟา และทำการผสมเทียมแบบกำหนดเวลาหลังจากถอดโปรเจสเทอโรนออกประมาณ 54-60 ชม. ซึ่งโคกลุ่มทดลองนี้ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มทดลองที่ 1 (T1) และกลุ่มทดลองที่ 2 (T2)

3.1.2.1. กลุ่มทดลองที่ 1 (T1) คือ กลุ่มแม่โคที่เหนียวนำการเป็นสัดและทำการผสมเทียม 1 ครั้งหลังจากถอดโปรเจสเทอโรนออกประมาณ 54-60 ชม.

3.1.2.2. กลุ่มทดลองที่ 2 (T2) คือ กลุ่มแม่โคที่เหนียวนำการเป็นสัดและเหนียวนำการตกไข่โดยฉีดเอสตราไดโอดอล เบนโซเอทหลังจากถอดโปรเจสเทอโรนออก 24 ชม. และผสมเทียม 1 ครั้งหลังจากถอดโปรเจสเทอโรนออกประมาณ 54-60 ชม. เช่นกัน

การผสมเทียมแม่โคทั้ง 3 กลุ่มใช้เจ้าหน้าที่ผสมเทียมคนเดียวและน้ำเชื้อมาจากพ่อโคแหล่งเดียวกัน

#### 3.2. ฮอโมนที่ใช้เหนียวนำการเจริญของฟอลลิเคิลและการตกไข่

3.2.1. CIDR® เป็นแท่งยางซิลิโคนสำหรับสอดเข้าทางช่องคลอดโค ประกอบด้วยฮอโมนโปรเจสเทอโรน 1.9 กรัม

2.2. Estradiol Benzoate injection (EB)\* ใน 1 มล.ประกอบด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจนไดออกไซด์เบนโซเอต 5 มก.

2.3. Estroplan®\*\*เป็น พรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู อัลฟา ชนิดสังเคราะห์ ใน 1 มล.ประกอบด้วย Cloprostenol 250 ไมโครกรัม

2.4. CIDIROL®\*\*\*ใน 1 มล.ประกอบด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจนไดออกไซด์ เบนโซเอต 0.5 มก.

### 3.3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจห้อง

3.3.1. เครื่องอัลตราซาวด์ชนิด real time B-mode รุ่น SD500 และหัวตรวจแบบสอดผ่านทางทวารหนัก (Rectal probe) ชนิด linear array ความถี่ 5 MHz.

3.3.2. ชุดตรวจวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยวิธี Radioimmunoassay (RIA) Coat-A-Count Progesterone®\*\*\*\*

### 3.4. วิธีการและขั้นตอนการเหนี่ยวนำการการเป็นสัดโดยการเหนี่ยวนำการเจริญของฟอลลิเคิลและการตกไข่

3.4.1. วันที่เริ่มการทดลอง (D0) ตรวจอวัยวะสืบพันธุ์ โดยการสังเกตคลำผ่านทางทวารหนัก เพื่อตรวจอวัยวะสืบพันธุ์เช่น รังไข่และมดลูก รวมทั้งลักษณะของฟอลลิเคิลและคอร์ปัส ลูเตียม (CL) ที่พบบนรังไข่ทั้ง 2 ข้าง

3.4.2. แบ่งแม่โคกลุ่มทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม T1 และกลุ่ม T2 ทำการสอด CIDR-B เข้าช่องคลอดทิ้งไว้ในส่วนหน้าของช่องคลอดแม่โคทั้ง 2 กลุ่มนาน 8 วันเพื่อเพิ่มระดับของโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดให้สูงขึ้น

3.4.3. วันต่อมา (D1) ฉีดเอสโตรเจนไดออกไซด์ เบนโซเอต (EB) 5 มก. เข้ากล้ามเนื้อเพื่อเหนี่ยวนำระยะการเจริญของฟอลลิเคิลให้เกิดขึ้นพร้อมกัน

3.4.4. หลังจากสอด CIDR-B 7 วัน (D7) ฉีด Cloprostenol 500 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อเพื่อสลายคอร์ปัส ลูเตียม

---

\* March Pharmaceuticals; Bangkok, Thailand

\*\* Parnell Laboratories (Aust) PTY. LTD.; Alexandria, Australia

\*\*\* InterAg; Hamilton, New Zealand

\*\*\*\* Diagnostic Products Corporation; Los Angeles, USA

3.4.5. วันที่ 8 (D8) ดึงCIDR-B ออก เพื่อให้ระดับของโปรเจสเทอโรนลดต่ำลง

3.4.6. หลังจากดึง CIDR-B ออก 24 ชม. (D9)ฉีดเอสตราไดออล เบนโซเอท (CIDIROL®) 1 มก. เข้ากล้ามเนื้อ ในแม่โคกลุ่ม T2 เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่ในเวลาใกล้เคียงกัน ส่วนแม่โคกลุ่ม T1 ไม่ฉีด CIDIROL® ตามที่แสดงในตารางที่ 1

3.4.7. เจาะเลือดวันที่ 1 (D1), วันที่ 8 (D8)และวันผสมเทียม (AI) เพื่อวัดระดับโปรเจสเทอโรน ในช่วงที่เหนี่ยวนำการเจริญของฟอลลิเคิลและการตกไข่

ตารางที่ 1 แสดงโปรแกรมการใช้ฮอร์โมนและแผนการวิจัยเพื่อเพิ่มสมรรถภาพการสืบพันธุ์ในแม่โคนม

กลุ่มควบคุม	กลุ่ม T1	กลุ่ม T2
สังเกตการเป็นสัดแล้ว AI ตามปกติของฝูง	D0:สอด CIDR®	D0:สอด CIDR®
	D1:ฉีด EB 5 mg.	D1:ฉีด EB 5 mg.
	D7:ฉีด Cloprostenol 500 µg.	D7:ฉีด Cloprostenol 500 µg.
	D8:ถอด CIDR®	D8:ถอด CIDR®
	D9:	D9:ฉีด CIDIROL® 1 mg.
	D10:AI (54-60 ชม.)	D10:AI (54-60 ชม.)
	D22-24: ตรวจท้อง(P4)	D22-24: ตรวจท้อง(P4)
D27-30:ตรวจท้อง(US)	D27-30:ตรวจท้อง(US)	D27-30:ตรวจท้อง(US)
D60:ตรวจท้อง(RP/US)	D60:ตรวจท้อง(RP/US)	D60:ตรวจท้อง(RP/US)
←————— เปรียบเทียบอัตราการผสมติด —————→		

### 3.5. การเก็บตัวอย่างเลือดและซีรัม

3.5.1. เจาะเลือดจากเส้นเลือดที่หาง(Coccygeal vessels) ประมาณ 5-10 มล. ใส่หลอดแก้วทิ้งไว้ให้แข็งตัว ประมาณ 2-3 ชม. ในวันที่ 22-24 หลังผสมเทียม

3.5.2. ปั่นแยกซีรัมที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที นาน 10 นาที

3.5.3. แยกซีรัมใส่หลอดพลาสติกและแช่แข็งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$ . เพื่อนำไปตรวจระดับฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนต่อไป

### 3.6. การตรวจวินิจฉัยการตั้งท้อง

ได้ทำการตรวจวินิจฉัยการตั้งท้องทั้งในกลุ่มควบคุมและทดลองโดยวิธีดังต่อไปนี้

3.6.1. ตรวจวัดระดับของโปรเจสเตอโรน (P4) โดยวิธี Radioimmunoassay (Coat-A-Count Progesterone®) โดยแม่โคที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนน้อยกว่า 1.5 นาโนกรัมในวันที่ 22-24 หลังผสมถือว่าไม่ตั้งท้อง แม่โคที่มีระดับฮอร์โมนมากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 นาโนกรัม ถือว่าตั้งท้อง (Humblot *et al.*, 1988)

3.6.2. ตรวจวินิจฉัยการตั้งท้องโดยเครื่องอัลตราซาวด์ (US) ในวันที่ 27 – 30 วัน หลังผสมเทียมโดยใช้หัวตรวจสอบสอดผ่านเข้าไปในทวารหนักบริเวณเหนือดลูก แม่โคที่ตั้งท้องจะตรวจพบ embryonic vesicle เป็นภาพสีดำอยู่ภายในมดลูกหรือตรวจพบตัวอ่อนอยู่ภายใน embryonic vesicle ส่วนแม่โคที่ไม่ตั้งท้องจะตรวจพบภาพลักษณะผนังมดลูกเป็นสีเทา ไม่มีของเหลวภายในมดลูก (Curran *et al.*, 1986)

3.6.3. ตรวจการตั้งท้องซ้ำโดยการล้างคลำตรวจผ่านทางทวารหนัก (RP) และเครื่องอัลตราซาวด์ ประมาณวันที่ 60 หลังผสมเทียม ตามที่แสดงในตารางที่ 1

3.6.4. บันทึกผลเพื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

### 3.7. การวัดระดับความเครียดจากความร้อนชื้น

วัดระดับความเครียดจากความร้อนชื้นโดยใช้ค่า Temperature Humidity Index (THI)

3.7.1. บันทึกอุณหภูมิจากกระเปาะแห้งและกระเปาะเปียกของไฮโกรมิเตอร์ (Hygrometer) ที่ติดไว้ในโรงเรือนโคนม วันละ 2 เวลา คือเวลาเช้า (8.00 น.) และเวลาเที่ยง (12.00 น.)

3.7.2. คำนวณค่า THI จากสูตร  $THI = 0.4[\text{อุณหภูมิกระเปาะแห้ง} (^{\circ}F) + \text{อุณหภูมิกระเปาะเปียก} (^{\circ}F)] + 15$

3.7.3. แบ่งระดับความเครียดจากความร้อนชื้นที่แม่โคได้รับโดยใช้ค่า THI (Armstrong, 1994) ดังนี้คือ (แผนภาพที่ 3)

3.7.3.1. ค่า THI ต่ำกว่า 72 ไม่มีความเครียด (No stress)

3.7.3.2. ค่า THI ระหว่าง 72-78 มีความเครียดน้อย (Mild stress)

3.7.3.3. ค่า THI ระหว่าง 79-88 มีความเครียดปานกลาง (Medium stress)

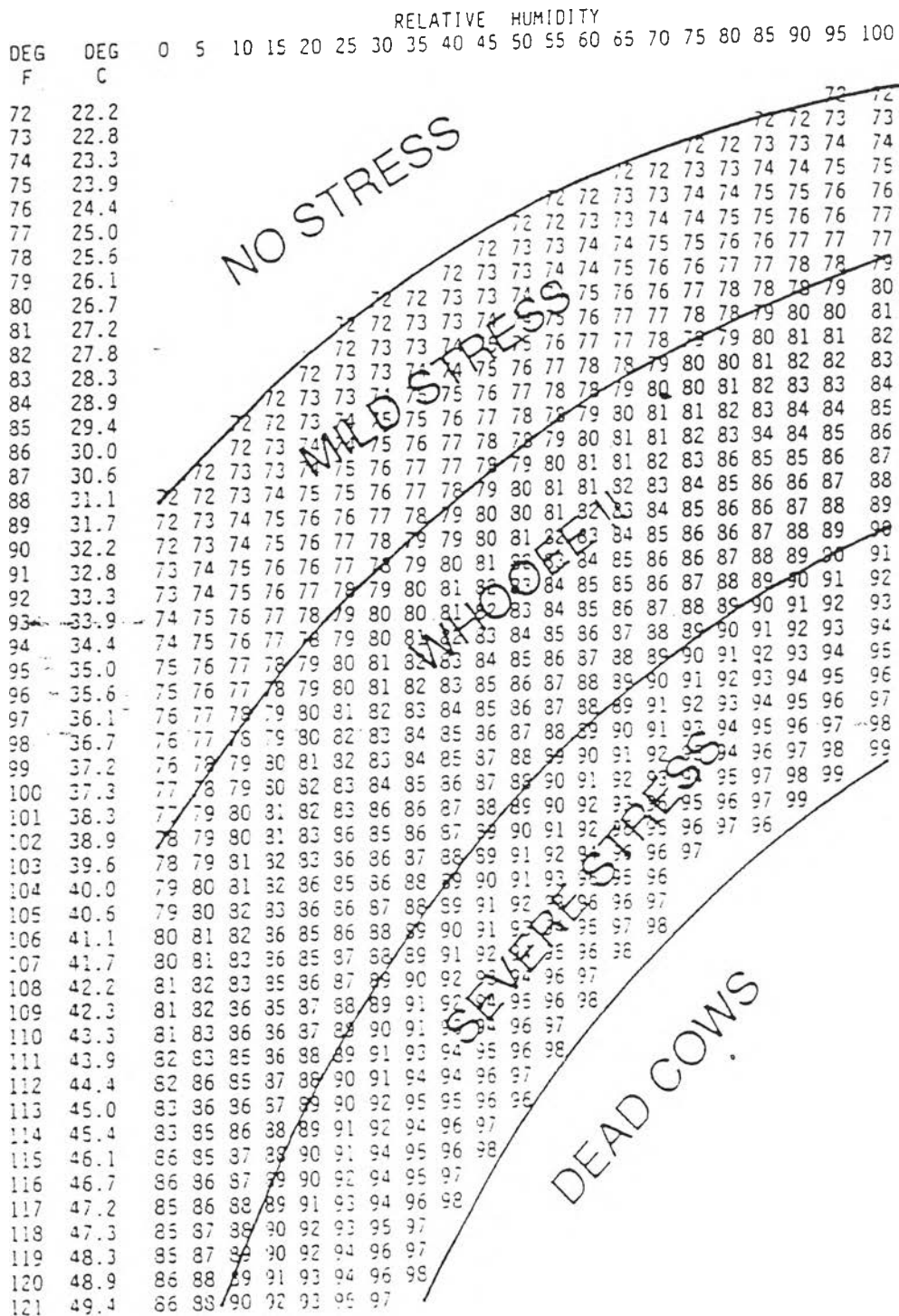
3.7.3.4. ค่า THI ระหว่าง 89-98 มีความเครียดรุนแรง (Severe stress)

3.7.3.5. ค่า THI สูงกว่า 98 ทำให้โคตาย (Dead cows)

## 8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

7.1. เปรียบเทียบอัตราการผสมติดของแม่โคกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยวิธีไคร้-สแควร์ ( $\chi^2$ )

7.2. วิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปรโดยวิธี T-test



แผนภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของค่า THI และระดับความเครียดจากความร้อนที่แม่โคนมได้รับ (ที่มา Armstrong, 1994)