

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### คำถามของการวิจัย

1. การใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัตว์และตกไข่จะมีผลต่อประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนมลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเซียน อย่างไร
2. การใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัตว์และตกไข่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบกับการจัดการระบบสืบพันธุ์โดยปกติทั่วไปหรือไม่
3. การใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัตว์และตกไข่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้จัดการระบบสืบพันธุ์ในประเทศไทยหรือไม่

#### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนมจากการใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัตว์และตกไข่
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรเจสเตอโรนเพื่ออธิบายผลของการตอบสนองของรังไข่ในโคนมที่ใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัตว์และตกไข่
3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนมที่ใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัตว์และตกไข่กับโคนมที่ใช้ระบบการจัดการระบบสืบพันธุ์ตามปกติทั่วไป

#### สมมุติฐานของการวิจัย

1. การใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัตว์และตกไข่ สามารถเพิ่มอัตราการได้รับการผสม อัตราผสมติดและอัตราการตั้งท้องในการผสมเทียมครั้งแรกภายใน 90 วันหลังคลอดและจากการผสมเทียมภายใน 90 และ 120 วันหลังคลอดได้
2. การใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัตว์และตกไข่ สามารถลดระยะเวลาหลังคลอดถึงผสมครั้งแรกและระยะเวลาหลังคลอดถึงผสมติดครั้งแรก

## ตัวอย่างและเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง

### ตัวอย่าง

การศึกษานี้ได้ทดลองในแม่โครีดนมในฟาร์มขนาด 300 แมรีดนมแห่งหนึ่งใน อ. บ้านบึง จ. ชลบุรี โดยสุ่มตัวอย่างในแม่โครีดนมลูกผสมพันธุ์ไฮลสไตน์ฟรีเซียนที่มีระยะหลังคลอด 40-70 วันและยังไม่เคยได้รับการผสมเทียมหลังจากคลอดจำนวน 60 ตัวเข้าสู่กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมกลุ่มละ 30 ตัว

### เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา

1. แม่โครีดนมลูกผสมไฮลสไตน์ฟรีเซียนที่มีระดับสายเลือดตั้งแต่ 75% ขึ้นไป คลอดลูกมาระยะประมาณ 40-70 วัน มีระดับคะแนนสุขภาพร่างกายระหว่าง 2.5 - 3.0 (คะแนนเต็ม 5) และไม่เคยได้รับการผสมหลังจากคลอดมาก่อนเข้าการทดลองและมีสุขภาพแข็งแรง
2. แม่โคไม่มีความผิดปกติทางระบบสืบพันธุ์ โดยยืนยันการตรวจด้วยสายตาและการล้วงตรวจทางทวารหนัก

### เกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา

เมื่อตรวจพบความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ โดยเฉพาะการติดเชื้อและอักเสบของมดลูกและอวัยวะสืบพันธุ์ รวมถึงการเกิดถุงน้ำที่รังไข่ (cystic ovary)

## วิธีการเลือกตัวอย่าง

1. ตรวจบันทึกข้อมูลการคลอดและระยะวันหลังคลอด ประวัติการผสม โดยกำหนดให้แม่โคนมที่มีระยะวันหลังคลอด 50-60 วันและยังไม่ได้รับการผสม เข้าในการทดลอง
2. ล้วงตรวจคล้ายอวัยวะสืบพันธุ์ทางทวารหนักเพื่อตรวจความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์
3. โคที่ผ่านการคัดเลือกในข้อ 2 จะถูกบันทึกเลขประจำตัวและจัดเรียงลำดับหมายเลขการทดลองโดยเริ่มจากโคตัวที่ 1 ถึงโคตัวที่ 60 (หมายเลข 1-60) ตามความก่อนหลังของการผ่านเกณฑ์ของโคแต่ละตัว
4. แบ่งโคออกเป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยลำดับหมายเลขในการทดลอง (1-60) ของโคแต่ละตัวหมายเลขที่เป็นเลขคี่จะเป็นกลุ่มควบคุม หมายเลขคู่จะเป็นกลุ่มทดลอง

## อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

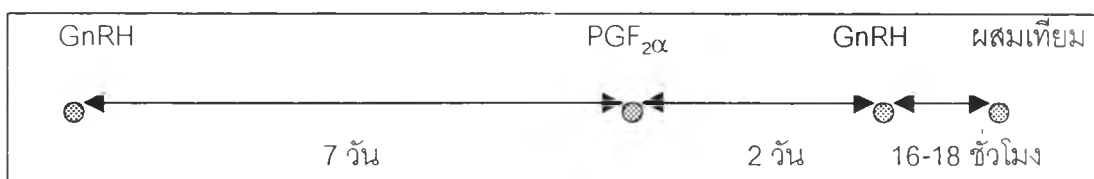
1. โภนาโดโทรปิน รีลิ่งซอร์โมน (GnRH)
2. พรอสตาแกลนดิน
3. เข็มเจาะเลือดเบอร์ 18 ความยาว 1 นิ้ว, ไชริงค์ขนาด 10 มล. และหลอดแก้วเก็บเลือด
4. หลอดพลาสติก 5 มล. สำหรับเก็บซีรัม
5. ชุดตรวจซอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Coat-A-Count<sup>®</sup>)

## วิธีการศึกษา

### การทดลองในภาคสนาม

โคกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองจะได้รับระบบการจัดการระบบสืบพันธุ์และการผสมเทียม ดังนี้

1. กลุ่มควบคุม ใช้ระบบการจัดการระบบสืบพันธุ์และการผสมพันธุ์ตามปกติทั่วไปของฟาร์มได้แก่ การตรวจการเป็นสัดและผสมเทียมตามกฎ เข้า-ป่าย
2. กลุ่มทดลอง ใช้ระบบการจัดการระบบสืบพันธุ์และการผสมพันธุ์โดยการใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ซึ่งประกอบด้วยการฉีด GnRH (Buserelin; Receptal<sup>®</sup>) จำนวน 100 ไมโครกรัม ในวันแรกที่เข้าการทดลองและ 7 วันต่อมาฉีด PGF<sub>2α</sub> (Clopostenol ; EstroPLAN) จำนวน 500 ไมโครกรัม จากนั้น 48 ชั่วโมงฉีด GnRH 100 ไมโครกรัมและทำการผสมเทียมช่วงเวลา 16-18 ชั่วโมงต่อมา (แสดงในภาพที่ 1) แมโคที่ไม่ตั้งท้องหลังจากการผสมครั้งแรกภายหลังการเหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนที่กลับมาแสดงการเป็นสัดจะได้รับการผสมตามโปรแกรมปกติของฟาร์มซึ่งได้แก่ การผสมเทียมตามกฎ เข้า-ป่าย แมโคทั้งสองกลุ่มจะได้รับการตรวจการตั้งท้องโดยการล้วงตรวจจล้าทางทวารหนักในช่วง 50-60 วันหลังจากได้รับการผสมเทียม



ภาพที่ 1 แสดงรายละเอียดระยะเวลาการฉีดฮอร์โมนและกำหนดการผสมเทียมในโปรแกรมการเหนี่ยวนำให้เป็นสัดและตกไข่พร้อมกันในโค (Ovsynch)

### การเก็บตัวอย่างซีรัมและการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

โคจะได้รับการเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณโคนหางจำนวน 10 มล. ทุกครั้งก่อนฉีด GnRH และ PGF<sub>2α</sub> นำเลือดมาปั่นแยกเก็บซีรัมโดยเก็บรักษาซีรัมในตู้เย็นสำหรับเก็บรักษาซีรัมที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำมาตรวจระดับโปรเจสเทอโรนโดยวิธี Radioimmunoassay (RIA) โดยใช้ชุดสำหรับตรวจโปรเจสเทอโรนสำเร็จรูป (Coat-A-Count®) โดยกำหนดว่าระดับโปรเจสเทอโรนในวันที่ฉีด GnRH ครั้งที่ 1 หรือวันที่ฉีด PGF<sub>2α</sub> มากกว่า 1.0 นาโนกรัมต่อมล. จะแสดงถึงการปรากฏของคอร์ปัสลูเทียมและระดับของโปรเจสเทอโรนในวันที่ฉีด GnRH ครั้งที่ 2 ต่ำกว่า 1.0 นาโนกรัมต่อมล. แสดงถึงการสลายของคอร์ปัสลูเทียมและเมื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรเจสเทอโรนของโคในกลุ่มทดลองแต่ละตัวจากผลที่ได้จะจัดโคเข้าสู่กลุ่มโคต่างๆ ดังต่อไปนี้ คือ กลุ่มที่มีการตอบสนองอย่างสมบูรณ์ กลุ่มที่มีการตอบสนองบางส่วนและกลุ่มที่ไม่มีการตอบสนอง โดยมีหลักเกณฑ์การแบ่งดังต่อไปนี้ กลุ่มแม่โคที่ตอบสนองกับฮอร์โมนที่ใช้อย่างสมบูรณ์ระดับโปรเจสเทอโรนในวันที่ฉีด GnRH ครั้งที่ 1 (วันที่ 1) มีค่าสูงหรือต่ำกว่า 1 นาโนกรัมต่อมล. และมีระดับในวันที่ฉีด PGF<sub>2α</sub> (วันที่ 7) สูงกว่า 1 นาโนกรัมต่อมล. และมีระดับในวันที่ฉีด GnRH ครั้งที่ 2 (วันที่ 9) ต่ำกว่า 1 นาโนกรัมต่อมล. (high or low)-(high)-(low) กลุ่มโคที่ตอบสนองกับฮอร์โมนที่ใช้บางส่วนระดับโปรเจสเทอโรนในวันที่ฉีด GnRH ครั้งที่ 1 (วันที่ 1) มีค่าสูงหรือต่ำกว่า 1 นาโนกรัมต่อมล. และมีระดับในวันที่ฉีด PGF<sub>2α</sub> (วันที่ 7) สูงหรือต่ำกว่า 1 นาโนกรัมต่อมล. และมีระดับในวันที่ฉีด GnRH (วันที่ 9) ครั้งที่ 2 ต่ำกว่า 1 นาโนกรัมต่อมล. (high or low)-(high)-(high) และในกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมนระดับโปรเจสเทอโรนเป็นดังนี้ ระดับในวันที่ฉีด GnRH ครั้งที่ 1 (วันที่ 1) มีค่าสูงหรือต่ำกว่า 1 นาโนกรัมต่อมล. และมีระดับต่ำกว่า 1 นาโนกรัมต่อมล. ในวันที่ฉีด PGF<sub>2α</sub> (วันที่ 7) และในวันที่ฉีด GnRH (วันที่ 9) (high or low)-(low)-(low)

### การสังเกตและการวัด

1. ตัวแปรหลัก คือ ระบบการจัดการระบบสืบพันธุ์ซึ่งได้แก่ โปรแกรมการจัดการตามปกติของฟาร์มและโปรแกรม Ovsynch

2. ตัวแปรตาม คือ อัตราการได้รับการผสมเทียมภายใน 90 วันหลังคลอด อัตราการตั้งท้องหลังจากผสมครั้งแรกภายใน 90 วันหลังคลอด อัตราการตั้งท้องภายใน 90 วัน และ 120 วันหลังคลอด ระยะคลอดถึงผสมครั้งแรก ระยะคลอดถึงผสมติดครั้งแรก และอัตราผสมติดจากผสมครั้งแรกหลังคลอด

3. ข้อสังเกต ความหมายและวิธีการคำนวณอัตราการตั้งท้องและอัตราผสมติดมีความแตกต่างกัน อัตราการตั้งท้องจะหมายถึง เปอร์เซ็นต์โคที่ตั้งท้องจากจำนวนโคที่เข้าทดลองในแต่ละกลุ่ม ส่วนอัตราผสมติดหมายถึง เปอร์เซ็นต์โคที่ตั้งท้องจากจำนวนโคที่เข้าทดลองที่ได้รับการผสมเทียม (Burke *et al.*, 1996 ; Stevenson *et al.*, 1996 ; Schmitt *et al.*, 1996 ; Momcilovic *et al.*, 1998 ; Stevenson *et al.*, 1999 ; Britt and Gaska, 1998) ในการศึกษานี้ได้ใช้ความหมายและวิธีการตามรายงานข้างต้น

#### การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. คำนวณค่าดัชนีวัดประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ โดยมีค่าดัชนีวัดประสิทธิภาพการสืบพันธุ์และวิธีการคำนวณดังต่อไปนี้

1.1 อัตราการได้รับการผสมภายใน 90 วันหลังคลอด คำนวณจากจำนวนแม่โคที่ได้รับการผสมภายใน 90 วันหลังคลอดหารด้วยจำนวนแม่โคทั้งหมดในแต่ละกลุ่ม

1.2 อัตราการตั้งท้องจากการผสมครั้งแรกภายใน 90 วันหลังคลอด คำนวณจากจำนวนแม่โคที่ตั้งท้องจากการผสมครั้งแรกภายใน 90 วันหลังคลอดหารด้วยจำนวนแม่โคทั้งหมดในแต่ละกลุ่ม

1.2 อัตราการตั้งท้องภายใน 90 วันหลังคลอด คำนวณจากจำนวนแม่โคที่ตั้งท้องภายใน 90 วันหลังคลอดหารด้วยจำนวนโคทั้งหมดในแต่ละกลุ่ม

1.3 อัตราผสมติดจากการผสมครั้งแรกภายใน 90 วันหลังคลอด คำนวณจากจำนวนแม่โคที่ตั้งท้องจากการผสมครั้งแรกภายใน 90 วันหลังคลอดหารด้วยจำนวนโคทั้งหมดในแต่ละกลุ่ม

1.4 ระยะคลอดถึงผสมครั้งแรก คำนวณจากจำนวนวันหลังคลอดจนถึงวันที่แม่โคได้รับการผสมเทียมครั้งแรก

1.6 ระยะคลอดถึงผสมติดครั้งแรก คำนวณจากจำนวนวันหลังคลอดจนถึงวันผสมติดจากการผสมครั้งแรก

2. เปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องหลังจากผสมครั้งแรกภายใน 90 วันหลังคลอด อัตราการตั้งท้องภายใน 90 วันหลังคลอด อัตราการตั้งท้องภายใน 120 วันหลังคลอด อัตราผสมติดจากผสมครั้งแรกภายใน 90 วันหลังคลอดระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธีการทดสอบทางสถิติ Chi-square Test โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่  $\alpha=0.05$  หากข้อมูลที่ได้ไม่สามารถเข้าตามข้อกำหนดของการใช้ Chi-square Test จะใช้วิธีการทดสอบทางสถิติโดยวิธี Fisher 's Exact Test

3. เปรียบเทียบระยะคลอดถึงผสมครั้งแรกและระยะคลอดถึงผสมติดครั้งแรก โดยใช้การทดสอบ Student T-test ในการวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดจะวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows®

4. ตรวจสอบวัฏระดับโปรเจสเทอโรนโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับโปรเจสเทอโรน (Coat-A-Count®) และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของระดับโปรเจสเทอโรนเพื่ออธิบายผลของฮอร์โมนที่ใช้ในโปรแกรม Ovsynch ต่อการเปลี่ยนแปลงของรังไข่แม่โคและความสัมพันธ์กับการตั้งท้อง

### ระยะเวลาในการศึกษา

ระหว่างเดือน กันยายน 2542 ถึง เดือน มีนาคม 2543 (7 เดือน)

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. เพิ่มทางเลือกการจัดการระบบสืบพันธุ์และการผสมเทียมเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ที่สุด
2. ลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอันเนื่องมาจาก อัตราการเป็นสัด อัตราการผสมติด และอัตราการตั้งท้องมีค่าต่ำ
3. นำผลการศึกษาไปประยุกต์ใช้ในการแก้ไขปัญหาในระบบสืบพันธุ์อื่นๆ ต่อไป เช่น การแก้ไขปัญหาการเป็นสัดเฉียบ ปัญหาการผสมติดยาก