

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์การทดลอง

1. วัคซีน Cattle Master[®] 4 จำนวน 164 โด๊ส
2. อุปกรณ์สำหรับฉีดวัคซีน เก็บตัวอย่างเลือดและตัวอย่างชิ้นเนื้อ
 - 2.1 ไชริง ขนาด 10 มิลลิลิตร
 - 2.2 เข็ม # 18 ขนาด 1 นิ้ว
 - 2.3 หลอดเก็บเลือด ขนาด 10 มิลลิลิตร
 - 2.4 สำลีและอัลกอฮอล์ฆ่าเชื้อ 70 เปอร์เซ็นต์
 - 2.5 ฟอ์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์
 - 2.6 น้ำแข็งและกระติกน้ำแข็ง
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
4. ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง
5. เวชภัณฑ์สำหรับรักษาสัตว์ป่วย
6. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไอบีอาร์ โดยวิธี serum neutralization test

2. วิธีการทดลอง

ประชากรและตัวอย่าง

1. โคนมสาวทดแทนและแม่โคนมภายในฟาร์มโคนม ของสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรสกลนคร สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ที่มีระดับสายเลือดพันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเซียนมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 164 ตัว เป็นโคนมสาวทดแทนอายุตั้งแต่ 12 เดือนขึ้นไป แต่อายุไม่เกิน 31 เดือน จำนวน 61 ตัวและเป็นแม่โคนมกำลังรีดนม (lactation) อยู่ระหว่างครั้งที่ 1-7 จำนวน 103 ตัว
2. โคนมทุกตัวได้รับการดูแลภายใต้โปรแกรมการจัดการสุขภาพของฟาร์มฯ ดังนี้ ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคแท้งติดต่อ เมื่ออายุ 4-8 เดือน 1 ครั้ง ฉีดวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้า

เป็ยและวัคซีนป้องกันโรคคอบวม ครั้งที่ 1 เมื่ออายุ 4-6 เดือนและฉีดซ้ำทุก ๆ 6 เดือน สํารวจโรค
แท้งติดตอและโรคผิวหนังโรคปีละครั้ง ถ่ายพยาธิภายในเมื่ออายุ 1 3 6 และ 12 เดือนในโคสาวและ
เมื่อหยูตรีดในแม่โค กำจัดพยาธิภายนอกเดือนละครั้งหรือขึ้นอยู่กัฤดูกาลระบาดของพยาธิ และ
ฉีดวิตามินเอ ดี อี ในโคสาวเมื่ออายุ 12 เดือนและในแม่โคพักรีดทุก ๆ 14 วัน

3. โคสาวและแม่โคอยู่ภายใต้การจัดการเลี้ยงดูที่ซังคอกแยกจากกัน โดยที่โคสาวและแม่
โคยังมีโอกาสใกล้ชิดหรือสัมผัสกันได้เป็นบางครั้ง เนื่องจากคอกเลี้ยงแยกอยู่บริเวณเดียวกัน

4. โคทุกตัวไม่เคยมีประวัติว่าได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคไวรัสไอบีอาร์ บีวีดี พีไอ-3 และ
บีอาร์เอสมาก่อน

2.2 เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าทดลอง

1. โคนมที่มีสุขภาพแข็งแรงและถูกพิจารณาเบื้องต้นว่า สามารถมีความสมบูรณ์พันธุ์ได้
2. โคนมที่ไม่อยู่ระหว่างการพิจารณาคัดออกจากฝูงหรือจำหน่าย

2.3 เกณฑ์ในการตัดออกจากการทดลอง

1. โคนมสาวทดแทนที่มีอายุน้อยกว่าหรือมากกว่าที่กำหนดในเกณฑ์การคัดเลือกเข้า
ศึกษาและแม่โคที่ให้นมมาแล้วมากกว่า 7 ครั้ง
2. โคนมสาวทดแทนและแม่โคนมที่ถูกตรวจพบในภายหลังว่า มีความไม่สมบูรณ์พันธุ์
แบบถาวรที่ไม่สามารถแก้ไขได้ ป่วยตายจากโรคที่ถูกวินิจฉัยว่าไม่ได้มีสาเหตุเกี่ยวข้อง
กับการติดไวรัสระบบทางเดินหายใจและระบบสืบพันธุ์ เป็นโรคที่จำเป็นต้องคัดทิ้งเร่ง
ด่วน หรือเกิดอุบัติเหตุที่มีผลกระทบต่อการดำเนินชีวิตปกติในระหว่างการศึกษา

2.4 ขั้นตอนการศึกษา

1. ทำการสำรวจสถานภาพภูมิคุ้มต่อไวรัสไอบีอาร์ของโคนมทุกตัวก่อนการทดลอง โดย
เจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณโคนหาง (coccygeal vein) จากนั้นปั่นแยกซีรัม (serum)
เพื่อนำไปตรวจหาและแบ่งระดับของแอนติบอดีต่อไวรัสไอบีอาร์ โดยวิธี serum neutralization
test ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนูเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทย-
ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยแบ่งระดับของแอนติบอดีที่ตรวจพบเป็น 2 ระดับ ดังนี้

ระดับที่ 1 ไม่มีแอนติบอดีต่อไวรัสไอบีอาร์ (titer < 2)

ระดับที่ 2 มีแอนติบอดีต่อไวรัสไอบีอาร์ (titer \geq 2)

2. ทำการแบ่งกลุ่มโคออกเป็น 2 กลุ่มเท่า ๆ กัน โดยการสุ่มแบบง่าย (simple sampling) เพื่อเข้ากลุ่มทดลอง ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 ได้รับการฉีดวัคซีนไวรัสรวม (ประกอบด้วยไวรัสไอบีอาร์ บีวีดี พีไอ-3 และ บีอาร์เอส ; Cattle Master[®] 4) 2 มิลลิลิตร เข้ากล้ามเนื้อบริเวณคอและ ฉีดกระตุ้นซ้ำอีกครั้งหลังจากฉีดครั้งแรก 14 วัน

กลุ่มทดลองที่ 2 ได้รับการฉีดสารละลายน้ำเกลือ (normal saline, 0.9 เปอร์เซ็นต์) 2 มิลลิลิตร เข้ากล้ามเนื้อคอ หลังจากนั้น 14 วัน ฉีดซ้ำอีกครั้ง

เจาะเก็บเลือดโคทุกตัว เพื่อตรวจหาระดับของแอนติบอดีต่อไวรัสไอบีอาร์อีกครั้ง หลังจากเริ่มทดลองไปแล้ว 1 6 และ 12 เดือน ตามลำดับ

3. การสังเกตและการรวบรวมข้อมูล

3.1 บันทึกข้อมูลอาการที่บ่งบอกถึงการแพ้วัคซีนขณะฉีดวัคซีนฯ หรือสารละลายน้ำเกลือ ข้อมูลปริมาณน้ำนม 5 วัน (10 คาบ) ก่อนและหลังฉีดในแม่โคที่กำลังให้นม และการอักเสบ (บวม) ในตำแหน่งที่ฉีดภายใน 3 วันหลังฉีด

3.2 บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับสมรรถภาพการสืบพันธุ์ ประกอบด้วย วันผสมพันธุ์ วันตั้งท้อง (ตรวจการตั้งท้องโดยการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนักในวันที่ 60 หลังผสมพันธุ์) วันคลอดลูก การแท้งลูก การเกิดลูกรกออก การคลอดก่อนกำหนด ลูกตายระหว่างคลอด ลูกอ่อนแอหรือพิการ

3.3 บันทึกข้อมูลสุขภาพและการเกิดโรคต่าง ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจโดยนายสัตวแพทย์ประจำฟาร์ม

3.4 เก็บตัวอย่างเลือดของแม่โคที่แท้งลูกหรือลูกตายระหว่างคลอด 2 ครั้ง คือ วันแรกที่พบ และหลังจากนั้นอีก 14 วัน เพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไอบีอาร์ และเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ (รกและอวัยวะภายในของลูก เช่น หัวใจ ปอด ตับ ไต) ในลักษณะแช่แข็งและเก็บในฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์เพื่อตรวจหาแอนติเจนต่อไวรัสไอบีอาร์

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลของลักษณะต่าง ๆ ที่ศึกษา ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SAS (1996) ดังนี้

1. วิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนโคนมที่ตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสไอบีอาร์ ก่อนเข้าทดลองและหลังทดลองได้ 1 เดือน ด้วย Chi-Square Test (จากตาราง 2x2)
2. วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลีสต์สแควร์ของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสไอบีอาร์ ที่ตรวจพบระหว่างกลุ่มไม่ฉีดวัคซีนและกลุ่มฉีดวัคซีนและระหว่างช่วงเวลาต่าง ๆ ด้วยคำสั่ง PROC. MIXED. มีหุ่นจำลองทางสถิติดังนี้

$$Y_{ijkl} = \mu + CAH_i + VAC_j + Time_k + CAH_i * VAC_j + CAH_i * VAC_j * Time_k + \epsilon_{ijkl}$$

เมื่อ Y_{ijkl} = ค่าสังเกตของลักษณะระดับแอนติบอดี

μ = ค่าเฉลี่ยของค่าสังเกตทั้งหมด

CAH_i = อิทธิพลคงที่ของสถานภาพของโคที่ i ($i = 1, 2$)

โดยที่ 1 = โคนสาว

2 = แม่โค

VAC_j = อิทธิพลคงที่ของการฉีดวัคซีนที่ j ($j = 1, 2$)

โดยที่ 1 = ไม่ฉีดวัคซีน (ฉีดสารละลายน้ำเกลือ 0.9

เปอร์เซ็นต์)

2 = ฉีดวัคซีน

$Time_k$ = อิทธิพลคงที่ของช่วงเวลาเก็บตัวอย่างเลือดที่ k ($k=1,2,3,4$)

โดยที่ 1 = ก่อนเข้าทดลองหรือ 0 วัน

2 = หลังฉีดวัคซีน 1 เดือน

3 = หลังฉีดวัคซีน 6 เดือน

4 = หลังฉีดวัคซีน 12 เดือน

ϵ_{ijkl} = อิทธิพลสุ่มอื่นที่ค่าสังเกตได้รับ โดยที่ $\epsilon_{ijkl} \sim \text{NID}(0, \delta^2)$

3. วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลีสต์สแควร์ของปริมาณน้ำนมรวม 5 วัน (10 คาบ) ก่อนและหลังฉีดวัคซีน ด้วยคำสั่ง PROC. MIXED. มีหุ่นจำลองทางสถิติดังนี้

$$Y_{ijkl} = \mu + VAC_i + Time_j + VAC_i * Time_j + \epsilon_{ijk}$$

เมื่อ Y_{ijkl} = ค่าสังเกตของลักษณะปริมาณน้ำนมรวม

μ = ค่าเฉลี่ยของค่าสังเกตทั้งหมด

VAC_i = อิทธิพลคงที่ของการฉีดวัคซีนที่ i ($i = 1, 2$)

โดยที่ 1 = ไม่ฉีดวัคซีน

2 = ฉีดวัคซีน

Time_j = อิทธิพลคงที่ของเวลาที่ฉีดวัคซีนหรือสารละลายน้ำเกลือที่ j (j=1,2)

โดยที่ 1 = การฉีดครั้งแรก

2 = การฉีดกระตุ้น (ครั้งที่ 2)

ϵ_{ijk} = อิทธิพลสุ่มอื่นที่ค่าสังเกตได้รับ โดยที่ $\epsilon_{ijk} \sim \text{NID}(0, \delta^2)$

4. ลักษณะสมรรถภาพการสืบพันธุ์และสุขภาพ

4.1 วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลีสต์สแควร์ระยะท้องว่าง ด้วยคำสั่ง PROC.GLM มีหุ่นจำลองทางสถิติดังนี้

$$Y_{ijklm} = \mu + BR_i + LAC_j + VAC_k + Ab_l + VAC_k * Ab_l + \epsilon_{ijklm}$$

เมื่อ Y_{ijklm} = ค่าสังเกตของลักษณะระยะท้องว่าง

μ = ค่าเฉลี่ยของค่าสังเกตทั้งหมด

BR_i = อิทธิพลคงที่ของกลุ่มพันธุ์ที่ i (i = 1,2)

โดย 1 = ระดับเลือดขาวดำ $\leq 75\%$

2 = ระดับเลือดขาวดำ $> 75\%$

LAC_j = อิทธิพลคงที่ของจำนวนครั้งที่คลอดลูกที่ j (j = 1,2,3,4)

โดย 1 = ให้ลูกมาแล้ว 1 ตัว

2 = ให้ลูกมาแล้ว 2 ตัว

3 = ให้ลูกมาแล้ว 3 ตัว

4 = ให้ลูกมาแล้วไม่ต่ำกว่า 4 ตัว

VAC_k = อิทธิพลคงที่ของการฉีดวัคซีนที่ k (k = 1,2)

โดย 1 = ไม่ฉีดวัคซีน

2 = ฉีดวัคซีน

Ab_l = อิทธิพลคงที่ของระดับแอนติบอดีก่อนทดลองที่ l (l = 1,2)

โดย 1 = ไม่มีแอนติบอดี

2 = มีแอนติบอดี

ϵ_{ijklm} = อิทธิพลสุ่มอื่นที่ค่าสังเกตได้รับ โดยที่ $\epsilon_{ijklm} \sim \text{NID}(0, \delta^2)$

4.2 วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลิสต์สแควร์จำนวนครั้งของการผสมต่อการผสมติด อัตราการผสมติดครั้งแรก การสูญเสียลูกขณะตั้งท้องหรือคลอดลูก ลูกคลอดใหม่อ่อนแอหรือพิการ และความชุกของโรคที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจ ด้วย logistic regression

$$Y_{ijkl} = \mu + VAC_i + Ab_j + BR_k + LAC_l + \epsilon_{ijkl}$$

เมื่อ Y_{ijkl} = ค่าสังเกต (0, 1) ของลักษณะจำนวนครั้งของการผสมต่อการผสมติด อัตราการผสมติดครั้งแรก การสูญเสียลูกขณะตั้งท้องหรือคลอดลูก ลูกคลอดใหม่อ่อนแอหรือพิการ ความชุกของโรคที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจ

μ = ค่าเฉลี่ยของค่าสังเกตทั้งหมด

VAC_i = อิทธิพลคงที่ของการฉีดวัคซีนที่ i ($i = 1, 2$)

โดย 1 = ไม่ฉีดวัคซีน

2 = ฉีดวัคซีน

Ab_j = อิทธิพลคงที่ของระดับแอนติบอดีก่อนทดลองที่ j ($j = 1, 2$)

โดย 1 = ไม่มีแอนติบอดี

2 = มีแอนติบอดี

BR_k = อิทธิพลคงที่ของกลุ่มพันธุ์ที่ k ($k = 1, 2$)

โดย 1 = ระดับเลือดขาวดำ $\leq 75\%$

2 = ระดับเลือดขาวดำ $> 75\%$

LAC_l = อิทธิพลคงที่ของจำนวนครั้งที่คลอดลูกที่ l ($l = 0, 1, 2, \dots, 4$)

โดย 0 = ยังไม่เคยมีลูก (โคสาว)

1 = ให้ลูกมาแล้ว 1 ตัว

2 = ให้ลูกมาแล้ว 2 ตัว

3 = ให้ลูกมาแล้ว 3 ตัว

4 = ให้ลูกมาแล้วไม่ต่ำกว่า 4 ตัว

ϵ_{ijkl} = อิทธิพลสุ่มอื่นที่ค่าสังเกตได้รับ โดยที่ $\epsilon_{ijkl} \sim NID(0, \sigma^2)$