



### บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการร่วมมือกันจาก 3 หน่วยงาน คือ กรมปศุสัตว์ บริษัท เครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด (มหาชน) และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีหน้าที่รับผิดชอบ ดังนี้คือ

กรมปศุสัตว์ สนับสนุนเจ้าหน้าที่เพื่อติดต่อเกษตรกรและส่งเสริมโครงการวิจัย บริษัท เครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด (มหาชน) โครงการอนุรักษ์และพัฒนาควายไทย ได้สนับสนุนพ่อกระบือปลักไทยพันธุ์ดีที่ชนะการประกวดพ่อพันธุ์กระบือปลักระดับประเทศ เพื่อ รีดเก็บน้ำเชื้อและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับใช้ในโครงการและสนับสนุนเจ้าหน้าที่ส่งเสริมโครงการวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ นิสิตปริญญาโท 1 คน รับผิดชอบ การวางแผนโครงการวิจัย ทำการวิจัย ประสานงานแต่ละหน่วยงาน การตรวจวิเคราะห์ทาง ห้องปฏิบัติการ รวบรวมข้อมูล และรายงานผล

### รูปแบบการวิจัย

การศึกษาเชิงคลินิก (clinical study)

### ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

12 เดือน

### สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
2. ศูนย์อนุรักษ์และพัฒนาควายไทย อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี
3. ฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงกระบือรายย่อยในเขตจังหวัดชลบุรี

## ประชากร

คัดเลือกกระบือเพศเมียท้องว่าง จำนวน 95 ตัว จากกระบือที่ได้รับการสำรวจทั้งหมด 240 ตัว โดยการสุ่มตัวอย่าง จากฟาร์มเกษตรกรรายย่อยทั้งหมด 42 ราย ในเขตพื้นที่จังหวัด ชลบุรี อำเภอบ้านบึง อำเภอพนัสนิคม อำเภอพานทอง และกิ่งอำเภอเกาะจันทร์ ดังแสดงในรูปที่ 3 ที่ให้ความร่วมมือในการวิจัย ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2549 ถึงเดือนพฤษภาคม 2550 ซึ่งมีรูปแบบการเลี้ยงโดยปล่อยแปลงหญ้าในท้องถิ่นร่วมกับการให้ฟางในช่วงกลางวัน และผูกในบริเวณบ้านหรือโรงเรือนในช่วงกลางคืน และต้องเป็นฟาร์มที่ไม่มีพ่อพันธุ์คุมฝูง โดยกำหนดให้มีคุณสมบัติก่อนคัดเลือกเข้าสู่กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ดังนี้

1. กระบือสาวมีอายุตั้งแต่ 3 ปีขึ้นไป (ตรวจอายุด้วยการดูฟัน)
2. แม่กระบือหลังคลอดตั้งแต่ 60 วันขึ้นไป
3. คัดเลือกเฉพาะพันธุ์กระบือปลักไทย
4. สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงไม่มีประวัติป่วยหรือมีความผิดปกติทางระบบสืบพันธุ์
5. มีความสมบูรณ์พันธุ์และมีวงรอบการเป็นสัดโดยผ่านการตรวจความสมบูรณ์ของระบบสืบพันธุ์ด้วยการล้างตรวจและอัลตราซาวด์ลักษณะมดลูกและรังไข่ก่อนคัดเลือกเข้าสู่การทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์

6. บันทึกประวัติกระบือ ได้แก่ อายุ สถานภาพทางระบบสืบพันธุ์ จำนวนวันท้องว่าง ลำดับท้อง จำนวนกระบือที่เลี้ยงในฟาร์ม และลักษณะการเลี้ยง (เจ้าของเลี้ยงเองหรือจ้างเลี้ยง) ในวันที่เข้าสำรวจฟาร์มครั้งแรก กระบือทุกตัวจะได้รับการดูแลสุขภาพโดยการถ่ายพยาธิ และให้วิตามินแร่ธาตุน้ำแร่ เพื่อเตรียมสภาพร่างกายให้พร้อมก่อนทำการศึกษา

ทำการคัดเลือกกระบือเข้าสู่กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง โดยมีหลักเกณฑ์ ดังนี้

(1) กลุ่มควบคุม สุ่มคัดเลือกกระบือเพศเมียที่ผ่านการกำหนดคุณสมบัติข้างต้น ที่ได้รับการแจ้งผสมเทียมจากการเป็นสัดธรรมชาติ (conventional artificial insemination) ในช่วงระยะเวลาเดียวกันกับการศึกษาในกลุ่มทดลอง ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์ตัวเดียวกับที่ใช้ในกลุ่มทดลอง พร้อมทั้งบันทึกข้อมูลอาการเป็นสัด

(2) กลุ่มทดลอง สุ่มคัดเลือกกระบือที่ตรวจพบฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องคลื่นความถี่สูง โดยไม่มีอาการเป็นสัด ณ วันเริ่มต้นโปรแกรม เข้าสู่โปรแกรม

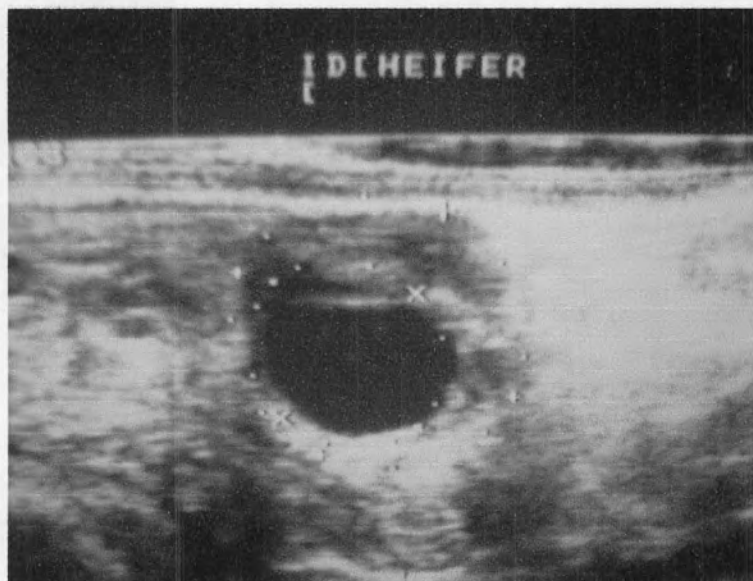




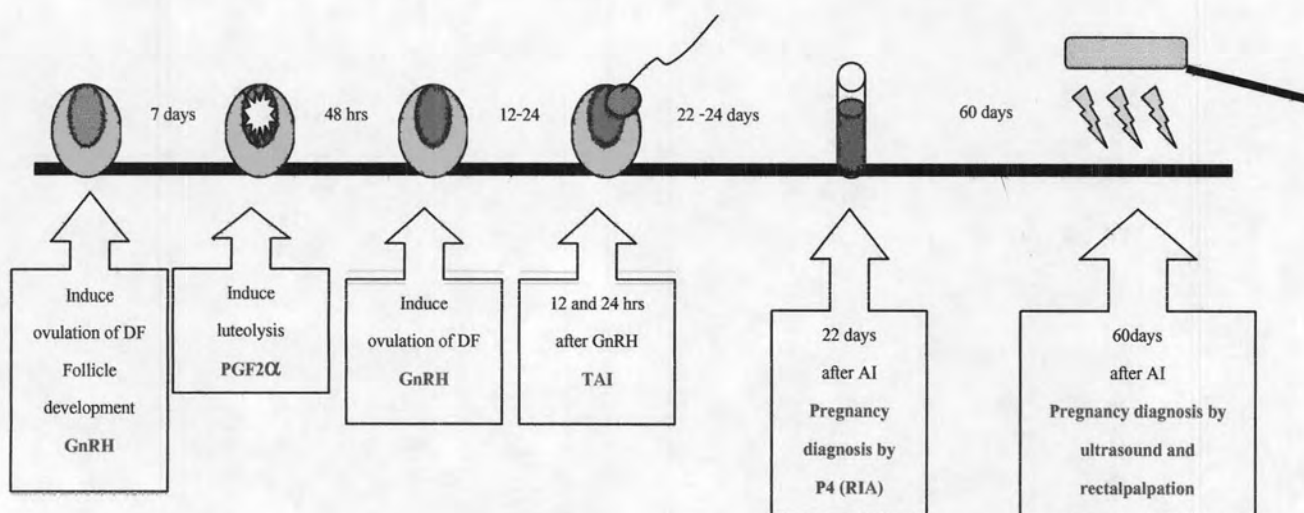
รูปที่ 4 การตรวจคัดเลือกกระบือในภาคสนามด้วยเครื่องอัลตราซาวด์แบบเคลื่อนที่เพื่อตรวจอวัยวะสืบพันธุ์

## 2. การเหนี่ยวนำการตกไข่และผสมเทียมแบบกำหนดเวลาในกลุ่มทดลอง

คัดเลือกกระบือที่ตรวจพบฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร โดยไม่มีอาการเป็นสัด ณ วันเริ่มต้นโปรแกรม ดังรูปที่ 4 จะถูกจัดเข้าสู่โปรแกรมเหนี่ยวนำการตกไข่และผสมเทียมแบบกำหนดเวลา (Ovsynch-TAI) ดังรูปที่ 5 โดยฉีด GnRH 10 ไมโครกรัม (buserelin acetate) ในวันที่ 0 และ 9 ฉีดฮอร์โมน PGF2 $\alpha$  500 ไมโครกรัม (cloprostenol) ในวันที่ 7 โดยผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนที่ใช่แสดงในรูปที่ 6 จากนั้นกระบือทุกตัวจะได้รับการผสม ในช่วงเวลาที่ 12 $\pm$ 4 และ 24 $\pm$ 4 หลังฉีด GnRH ครั้งที่ 2 ในกลุ่มทดลอง ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งคุณภาพดีซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่รายตัวหลังจากแช่แข็ง (individual motility) 60% จากพ่อพันธุ์ตัวเดียวกัน โดยเป็นพ่อพันธุ์ที่ได้เลี้ยงไว้ที่ศูนย์อนุรักษ์และพัฒนาควายไทย เครือเจริญโภคภัณฑ์ จังหวัดชลบุรี และทำการผสมเทียม ทำการจดบันทึกเวลาและปฏิบัติงานทุกขั้นตอนของโปรแกรม และสังเกตพร้อมกับจดบันทึกลักษณะอาการเป็นสัดขณะผสมเทียม ได้แก่ อวัยวะเพศบวมแดง มีเมือกใสไหลจากช่องคลอด สัตว์ยืนนิ่ง มดลูกหดเกร็ง และสามารถสอดปืนผสมเทียมผ่านเข้าบริเวณปากมดลูกได้ (cervix) แสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 5 ลักษณะฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร จากการตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวนด์



รูปที่ 6 โปรแกรมเหนี่ยวนำการตกไข่และผสมเทียมแบบกำหนดเวลา (Ovsynch-TAI)

ดัดแปลงจาก Paul, V. and Prakash, 2005 และ De Rensis and López-Gatius, 2006





รูปที่ 7 ผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนที่ใช้ในโปรแกรม Ovsynch-TAI



รูปที่ 8 ลักษณะอาการเป็นสัตที่สามารถสังเกตเห็นขณะผสมเทียม ได้แก่ อวัยวะเพศบวมแดง มีเมือกใสบริเวณปากช่องคลอด

3. การจับสัตและการผสมเทียมจากการเป็นสัตธรรมชาติในกลุ่มควบคุม  
 กระบือเพศเมียที่ไม่ได้ถูกคัดเลือกให้อยู่ในกลุ่มทดลองจะรอให้เป็นสัตตามธรรมชาติ ซึ่ง  
 เจ้าของจะแจ้งต่อเจ้าหน้าที่ผสมเทียมเมื่อสังเกตพบว่ากระบือเป็นสัต โดยลักษณะอาการเป็นสัต

ในกระป๋องแต่ละตัวจะแตกต่างกันออกไป ซึ่งเจ้าของหรือผู้เลี้ยงจะสามารถสังเกตได้ด้วยตัวเอง ยกตัวอย่างเช่น กระป๋องกระวนกระวาย ไม่ค่อยกินอาหาร ถูกตัวอื่นปิ่นและยี่หนิง มีเมือกใสไหลออกมาจากช่องคลอด และอวัยวะเพศบวมแดง เจ้าหน้าที่ผสมเทียมจะเข้าฟาร์มเพื่อให้บริการผสมเทียมหลังจากได้รับแจ้งประมาณ 12 ชั่วโมง ตามรูปแบบที่กรมปศุสัตว์กำหนดไว้ ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์กระป๋องปลักไทยตัวเดียวกันตลอดการศึกษา พร้อมสังเกตอาการเป็นสัตว์ดังที่กล่าวมาในข้างต้น

อนึ่ง เจ้าหน้าที่ผสมเทียมที่ให้บริการในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนทั้งหมด 5 คน ซึ่งได้ผ่านการอบรมตามหลักสูตรการผสมเทียมของกรมปศุสัตว์และมีประสบการณ์ผสมเทียมมากกว่า 3 ปี

## การวัดผล

พิจารณาจากผลของอัตราการผสมติดด้วยการตรวจหาระดับของฮอโมน โปรเจสเตอโรน การตรวจด้วยเครื่องคลื่นความถี่สูง และการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนัก ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

### 1. การตรวจวิเคราะห์ระดับโปรเจสเตอโรน

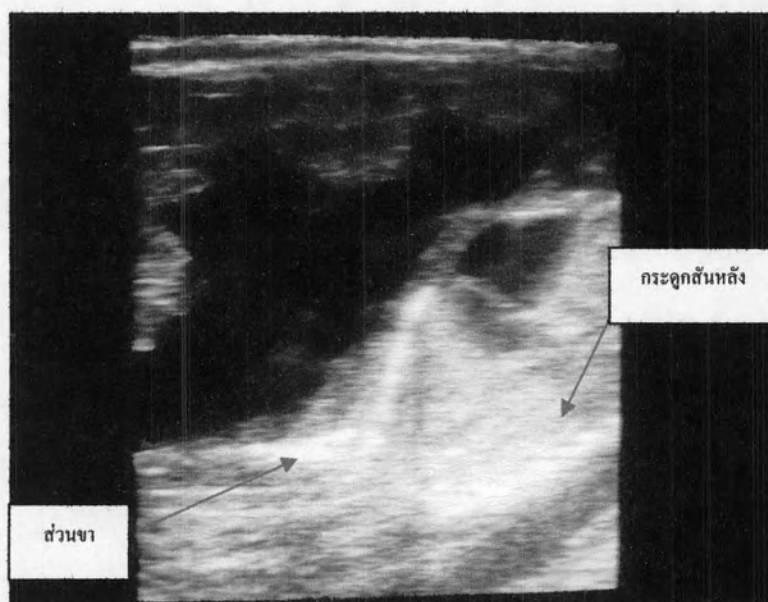
ทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมวันที่ 22-24 หลังผสม โดยเก็บเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณคอ (jugular vein) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยหลอดเก็บซีรัม (Monovette®) ดังรูปที่ 8 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง และแยกซีรัมด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 3,000 รอบ 5 นาที เก็บซีรัมปริมาณ 1 มิลลิลิตร ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของฮอโมนโปรเจสเตอโรนด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ ด้วยชุดตรวจระดับฮอโมนโปรเจสเตอโรนสำเร็จรูป (Hegstad, 1992) ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ ภาควิชาเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กระป๋องที่คาดว่าการตั้งท้องจะมีระดับฮอโมนโปรเจสเตอโรนในซีรัมมากกว่า 1.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงว่ามีคอร์ปัส ลูเตียม ในรังไข่ โดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการในการศึกษานี้มีค่าความไว (sensitivity) 0.02 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความจำเพาะ (specitivity) 100% และ Intra assay เท่ากับ 6.2%

### 2. การตรวจท้อง

ทำการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนักหลังผสมประมาณ 60 วัน และยืนยันผลการตรวจท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวนด์ ดังรูปที่ 9



**รูปที่ 9** การเจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณคอกระบือ



**รูปที่ 10** ผลการตรวจท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ในกระบือหลังการผสมประมาณ 2 เดือน พบปีกมดลูกมีช่องว่างสีดำซึ่งเป็นถุงน้ำหุ้มตัวลูก กระดูกสันหลัง และขาของลูก



### การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์อัตราการผลิตจากการตรวจท้องด้วยวิธีการตรวจระดับโปรเจสเตอโรน การตรวจท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ และ/หรือการตรวจท้องด้วยการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนัก ด้วยการหาค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบอัตราการผลิตระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม และอัตราการผลิตระหว่างกระบือสาวกับกระบือนาง ด้วยการทดสอบไค สแควร์ ( $\chi^2$ -test) วิเคราะห์ข้อมูลกระบือในกลุ่มทดลองเพื่อหาปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการผลิตด้วยวิธีโลจิสติก รีเกรสชัน (logistic regression analysis) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ ) ด้วยโปรแกรม SPSS<sup>®</sup> โดยแบ่งระดับของปัจจัยต่างๆ ดังนี้

#### 1. อายุ

ระดับ 1	หมายถึง	อายุน้อยกว่า 5 ปี
ระดับ 2	หมายถึง	อายุระหว่าง 5 – 10 ปี
ระดับ 3	หมายถึง	อายุระหว่าง 10 – 15 ปี

#### 2. ลำดับท้อง

ระดับ 1	หมายถึง	ลำดับท้องที่ 0 (heifer)
ระดับ 2	หมายถึง	ลำดับท้องที่ 1 (primiparus)
ระดับ 3	หมายถึง	ลำดับท้องที่ 2 – 8 (multiparus)

#### 3. ลักษณะการเลี้ยง

ระดับ 1	หมายถึง	เจ้าของเลี้ยงเอง
ระดับ 2	หมายถึง	จ้างคนเลี้ยง

#### 4. สถานภาพ

ระดับ 1	หมายถึง	แม่เลี้ยงลูก (suckling)
ระดับ 2	หมายถึง	แม่หย่านมหรือกระบือสาว

#### 5. การสอดผ่านของป็นผสมเทียมขณะผสม

ระดับ 1	หมายถึง	สอดผ่านถึง internal os
ระดับ 2	หมายถึง	สอดไม่ผ่านถึง internal os

#### 6. จำนวนวันท้องว่าง

ระดับ 1	หมายถึง	จำนวนวันท้องว่าง 2 - 6 เดือน
ระดับ 2	หมายถึง	จำนวนวันท้องว่าง 6 - 12 เดือน
ระดับ 3	หมายถึง	จำนวนวันท้องว่าง 12 - 24 เดือน