

บทที่ 1

บทนำ

เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมส่วนใหญ่จะประสบปัญหาในเรื่องของระบบสืบพันธุ์ของโคนมมาก เช่น อัตราการผสมติด (conception rate) ต่ำ การแท้งลูกและไม่แสดงการเป็นสัด (anestrus) เป็นต้น การวินิจฉัยการตั้งท้องในระยะแรกของการตั้งท้องมีส่วนสำคัญอย่างมาก เพราะมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการผลิตของฝูงโคนมและรายได้ของเจ้าของฟาร์ม Nebel *et al.* (1987) รายงานว่าการที่โคนมมีระยะห่างระหว่างการคลอดลูก (calving interval) ในช่วง 12 – 13 เดือน จะเป็นช่วงระยะเวลาที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจมากที่สุด

การยืนยันการเป็นสัดและการตั้งท้องให้ได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว จะมีส่วนช่วยลดระยะเวลาในการจัดการให้เร็วขึ้น ได้ข้อมูลที่ใช้ในการประเมินผล หรือบ่งบอกประสิทธิภาพความสมบูรณ์พันธุ์ของฝูงได้เร็วที่สุด คือช่วงระยะเวลาคลอดถึงการเป็นสัดครั้งแรก หรือช่วงระยะเวลาคคลอดจนถึงผสมติด โดยข้อมูลเหล่านี้จะขึ้นกับการจับสัดที่ดี เช่น ถ้าค่าเฉลี่ยของระยะเวลาคคลอดจนถึงผสมครั้งแรก คือ 80 วัน และค่าเฉลี่ยของอัตราการผสมติดเท่ากับ 80% ค่าระยะเวลาดังแต่คลอดจนถึงผสมติดจะเท่ากับ 106 วัน โดยที่อัตราการจับสัดเท่ากับ 80% แต่ถ้าอัตราการจับสัดเท่ากับ 50% จะทำให้ระยะเวลาดังแต่คลอดจนถึงผสมมีค่าเท่ากับ 122 วัน (สุวิชัยและคณะ, 2538)

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone, P_4) เป็นฮอร์โมนที่ผลิตจากรังไข่ รก และต่อมหมวกไต (adrenal cortex) ทำหน้าที่หลักคือ มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเตรียมความพร้อมของมดลูกเพื่อการฝังตัวของตัวอ่อน (zygote) และการคงสภาพการตั้งท้อง ในวงจรการเป็นสัด P_4 จะมีการเปลี่ยนแปลงแบบผกผันกับฮอร์โมนเอสโตรเจน ความเข้มข้นของ P_4 ใน corpus luteum (CL) จะสัมพันธ์กับการเจริญและฝ่อตัวของ CL ดังนั้นฮอร์โมน P_4 จะมีระดับต่ำในช่วงของ follicular phase และจะเพิ่มขึ้นในช่วง luteal phase และจะมีระดับสูงสุดตลอดระยะเวลาการตั้งท้อง ในโคนมที่มีการตั้งท้องระดับของ P_4 จะมีค่าประมาณ 6 - 15 ng/ml การเปลี่ยนแปลงของระดับ P_4 ช่วยในการทำนายรอบการเป็นสัดได้เช่นกัน Eddy and Clark (1987) ใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปวัดระดับ P_4 ในน้ำนมเพื่อทำนายการเป็นสัด และดูผลของการผสม พบว่าช่วยเพิ่มความถูกต้องในการทำนายรอบการเป็นสัดครั้งต่อไปและลดช่วงเวลาจากคลอดลูกถึงตั้งท้องครั้งต่อไป (calving to conception interval) ให้สั้นลงจาก 115 วัน เป็น 84 วัน William and Esslemont (1993) ใช้การทดสอบ P_4 ในน้ำนมร่วมกับใช้โปรแกรม management of insemination through routine analysis (MOIRA) พบ

ว่าจำนวนของโคที่ไม่เป็นสัตว์ และไม่ต้องทิ้งลดลงจาก 29 % เป็น 15.3 % ซึ่งเป็นผลจากการตรวจการเปลี่ยนแปลงของระดับ P_4 โดยในวันที่ 3 ของการลดลงของ P_4 จะเป็นวันที่เหมาะสมต่อการผสมและมีอัตราการตั้งท้องสูงที่สุด

อิทธิพลที่มีผลต่อระดับ P_4 ประการหนึ่งคืออุณหภูมิ บางรายงานพบว่าความเข้มข้นของ P_4 จะเพิ่มขึ้นในช่วง heat stress แต่บางรายงานพบว่าความเข้มข้นของ P_4 จะลดลงหลังจากผ่านช่วง heat stress Wise *et al.* (1988) ได้ศึกษาสภาพแวดล้อมภายในฟาร์มที่มีการติดตั้งเครื่องปรับอากาศเปรียบเทียบกับสภาพปกติ พบว่าระดับ P_4 ในซีรัมของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน แต่มีแนวโน้มสูงขึ้นในวันที่ 3 และ 5 ของการทดลองในกลุ่มที่เลี้ยงในสภาพเย็น Howell *et al.* (1994) ศึกษาผลของอากาศและความชื้นในช่วงฤดูร้อนและฤดูใบไม้ผลิ พบว่าระดับ P_4 ในช่วงวันที่ 6 และ 18 ของรอบการเป็นสัตว์ในฤดูร้อนมีค่าต่ำ (4.8 ± 9 ng/ml) กว่าในช่วงฤดูใบไม้ผลิ (7.4 ± 9 ng/ml)

การวัดระดับ P_4 สามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมกันมากคือ เรดิโออิมมูโนแอสเซซ (radioimmunoassay, RIA) และเอนไซม์อิมมูโนแอสเซซ (enzyme immunoassay, EIA) ข้อดีของทั้งสองวิธีคือ ความแม่นยำ รวดเร็ว และความถูกต้องสูง แต่ข้อเสียของวิธี RIA คือ สารกัมมันตรังสีมีราคาแพง และอาจเป็นอันตรายต่อผู้วิเคราะห์ เครื่องมือมีราคาแพง เกิดการปนเปื้อนของกัมมันตรังสี และปัญหาในการกำจัดสารกัมมันตรังสี นอกจากนั้นยังยากต่อการนำไปใช้จริงในฟาร์ม ดังนั้นวิธี EIA จึงเป็นวิธีที่ง่ายต่อการจัดการและมีราคาถูกกว่า RIA เพราะอาศัยคุณสมบัติระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้เอนไซม์ตัวบ่งชี้ (marker) เอนไซม์ที่นิยมใช้ เช่น อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) และเปอร์รอกซิเดส (peroxidase) มีผู้นิยมนำเอาเทคนิคนี้ไปใช้จริงในฟาร์ม โดยการผลิตเป็นชุดสำเร็จ (ELISA test kit) โดยแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันไปตามวิธีการวิเคราะห์ Nebel (1987) ได้รวบรวมชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับตรวจวัด P_4 ของบริษัทต่าง ๆ โดย ชุดตรวจของแต่ละบริษัทจะมีคุณสมบัติการวิเคราะห์ และความไวแตกต่างกันออกไป ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความไวของวิธีการ ELISA คือแอนติบอดี แอนติบอดีที่นิยมใช้กันมากคือ โพลีโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดี และอีกปัจจัยหนึ่งคือชนิดของพื้นผิว (phase) ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Phase คือ ส่วนที่ใช้ยึดติดตัวแอนติบอดี หรือแอนติเจน มีอยู่สองชนิดคือ liquid phase และ solid phase ที่นิยมใช้กันมากคือ solid phase มีหลายชนิดเช่น polystyrene microtitreplate, filter paper plasticized, cellulose acetate membrane หรือ nitrocellulose membrane เป็นต้น solid phase แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติต่างกันไป ข้อเสียของ microtitreplate คือไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ และไม่สามารถนำไปใช้ภาคสนามได้ สำหรับกระดาษกรอง หรือเมมเบรนต่าง ๆ สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้ เพราะมีขนาดเล็ก และสามารถใส่สารซับสเตรทที่ทำให้เกิดสีแบบของแข็งได้ (insoluble substrate) ซึ่งสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าจากสีที่เกิดขึ้น นักวิจัยจึงนิยมนำมาผลิตเป็น dip-stick หรือ strip ELISA เพื่อใช้ในภาคสนาม

สำหรับการศึกษานี้ให้ความสนใจกับ โมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง เนื่องจากเซลล์ลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมระหว่างเซลล์ไมอีโลมา (myeloma) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวได้เป็นจำนวนมากแต่ไม่ผลิตแอนติบอดี กับเซลล์สัตว์ที่ทำหน้าที่ผลิตแอนติบอดี โดยส่วนมากนิยมใช้เซลล์ลิมโฟไซต์ ชนิดบี (B lymphocyte) จากม้ามของสัตว์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการตรวจวัดแล้ว เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมโค รวมทั้งศึกษาถึงผลของสภาพอากาศที่มีต่อระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และระบบสืบพันธุ์ของโคนม และยังมีมุ่งเน้นที่จะผลิต strip ELISA kit ซึ่งเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปที่จะสามารถนำไปใช้วิเคราะห์ P_4 ในน้ำนมโคโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีได้จริงในฟาร์ม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อพัฒนาวิธี indirect sandwich ELISA สำหรับวัดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมโค โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของระบบสืบพันธุ์ในช่วงเดือนตุลาคม-มีนาคม และเดือนเมษายน-มิถุนายน
- 2) เพื่อพัฒนา strip ELISA kit สำหรับวัดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมโคที่ฟาร์มได้

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

- 1) สามารถเรียนรู้ถึงประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนมลูกผสม และพันธุ์แท้ฟรีเซียนต่อสภาพอากาศในช่วงเดือนตุลาคม - มีนาคม และเดือนเมษายน - มิถุนายน
- 2) สามารถเรียนรู้ถึงผลของระดับการให้ผลผลิตน้ำนม ต่อประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนมลูกผสม และพันธุ์แท้ฟรีเซียน
- 3) คาดว่าจะสามารถนำเอา strip ELISA kit ไปใช้ได้จริงในฟาร์มโคนม