บทที่ 5

วิจารณ์ผลและสรุปผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

เซลล์ลูกผสม (hybridoma cell) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นเซลล์ลูกผสมหมายเลข 8E2 โดยสามารถผลิตแอนติบอดีชนิดอิมมูนโนโกลบูลิน จี (IgG) ปริมาณ 1 ~ 4 มก./10 มล.ของอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นปริมาณแอนติบอดีที่ค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Claycomb *et al.* (1998) ที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ถึง 10 มก./มล. กลุ่มเซลล์นี้ในขณะเลี้ยงภายในตู้เลี้ยงเซลล์จะเจริญได้ปานกลางเมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มเซลล์อื่น ๆ รูปร่างและสุขภาพของเซลล์ค่อนข้างดี แต่เมื่อเทียบอัตราการเจริญแล้วกลุ่มเซลล์ B11 และ C12 มีความสามารถในการเจริญเร็วกว่ากลุ่มเซลล์อื่น ๆ แต่กลุ่มเซลล์ทั้งสองนี้จะตายง่าย และมีรูปร่างเซลล์ไม่ค่อยกลมโต ผิวค่อนข้างขรุขระ สาเหตุที่ทำให้ปริมาณแอนติบอดีค่อนข้างต่ำ เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้เป็นแอนติบอดีที่สกัดจากน้ำเลี้ยงเซลล์ (10 % fetal calf serum) ที่เลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมี 5 % คาร์บอนไดออกไซด์ (*in vitro* culture) ไม่ใช่แอนติบอดีที่ได้จากการฉีดเซลล์ลูกผสมเข้าในช่องท้องหนูแล้วสกัดแอนติบอดีจากของเหลวในช่องท้องหนู (ascitic fluid) วิธีนี้เป็นการสร้างแอนติบอดีในร่างกายสัตว์ (*in vivo* culture) ซึ่งจะได้ปริมาณแอนติบอดีมากกว่า Crowther (2001) ได้สรุปว่าปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก ascitic fluid จะมีปริมาณแอนติบอดี 1 ~ 15 มก./มล. และมีความจำเพาะเจาะจงสูงถึง 90 % แต่สำหรับการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถผลิต ascitic fluid ได้ เนื่องจากเมื่อฉีดเซลล์เข้าช่องท้องหนูแล้วเซลล์ไม่เจริญ ซึ่งสังเกตได้จากขนาดท้องหนูไม่ขยายใหญ่ขึ้น แต่ไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดว่าทำไมเซลล์จึงไม่เพิ่มจำนวนในท้องหนู ดังนั้นถ้าหากสามารถผลิตได้อาจจะได้ปริมาณแอนติบอดีเพิ่มขึ้น นอกจากสาเหตุเนื่องจากแหล่งที่มาของแอนติบอดีแล้วปริมาณแอนติบอดียังขึ้นอยู่กับขั้นตอนการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้วิธีที่เรียกว่า thiophilic resin column chromatography เป็นการทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ที่ใช้เจลชนิด thiophilic resin ซึ่งผ่านการใช้งานมาหลายครั้ง ปริมาณแอนติบอดีที่ได้แต่ละครั้งมีปริมาณไม่สม่ำเสมอ ข้อจำกัดของวิธีนี้คือบัฟเฟอร์ที่ใช้ต้องอาศัยความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเป็นตัวแยกโปรตีน ดังนั้นจะต้องระมัดระวังกับการเตรียมสารให้มาก เนื่องจากโปแตสเซียมซัลเฟสละลายน้ำยาก รวมทั้งเจลไม่สามารถใช้ได้หลายครั้ง ถ้าใช้เป็นเวลานานจะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีผลทำให้ค่าเปอร์เซนต์ recovery ลดลง เจลมีราคาแพง และเก็บรักษายาก เนื่องจากขึ้นรางง่าย จึงแนะนำให้ใช้คอลัมน์สำเร็จรูปซึ่งมีราคาไม่แตกต่างกันมากนักแต่ประสิทธิภาพสูงกว่า

การพัฒนาเทคนิค ELISA สำหรับวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone, P_4) เริ่มต้นในปี 1983 โดยการศึกษาของ Munro and Stabenfeldt โดยได้พัฒนาวิธีนี้เพื่อใช้วิเคราะห์ P_4 ใน ซีรั่มกระต่าย ต่อมามีการพัฒนาวิธีนี้เพื่อใช้วิเคราะห์ P_4 ในซีรั่ม และน้ำนมโค (Marcus and Hacket, 1986) วิธีการ ELISA มีอยู่หลายแบบ แต่การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธี indirect sandwich ELISA (Crowther, 1995) วิธี sandwich ELISA มีความไวกว่าวิธีอื่น ๆ ใช้ได้ดีโดยเฉพาะกับตัวอย่างที่มีความปนเปื้อนด้วยสารอื่นสูง ซึ่งต้องการความจำเพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น แต่ข้อเสียของวิธี sandwich ELISA ทั่วไปคือ จะต้องเชื่อมแอนติบอดีตัวที่สองด้วยเอนไซม์ ซึ่งส่วนใหญ่ต้องทำการเชื่อมเอง ซึ่งจะทำให้เกิดข้อผิดพลาดบ่อยครั้ง เช่น เชื่อมเอนไซม์กับแอนติบอดีไม่ได้ หรือเชื่อมได้ปริมาณน้อย ดังนั้นจึงประยุกต์ใช้วิธี indirect sandwich ELISA เพื่อตัดปัญหาดังกล่าว ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถเปลี่ยนแปลงแอนติบอดีได้ตามต้องการ ทั้งตัวที่ใช้เคลือบเพลท แอนติบอดีตัวที่สองและแอนติบอดีตัวที่สามที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งหาซื้อได้จากบริษัททั่วไป แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ แอนติบอดีที่ใช้จะต้องมาจากสัตว์ต่างสปีชีส์กัน หรือถ้าเลือกใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งเป็นตัวเคลือบเพลท และเป็นแอนติบอดีตัวที่สองจะต้องเป็นแอนติบอดีจากกลุ่มเซลล์ต่างชนิดกัน การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้จากการสกัดมีเพียงกลุ่มเซลล์เดียวที่ให้ปริมาณแอนติบอดีสูงที่สุด คือ กลุ่มเซลล์ 8E2 และจากการทดลองใช้แอนติบอดีกลุ่มเซลล์เดียวกันจะไม่สามารถวิเคราะห์ได้ ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จะต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nikulina *et al.* (1999) เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์กลุ่มเซลล์เดียวกันจะมีส่วนที่เรียกว่า paratope เดียวกัน ทำให้จับกับแอนติบอดีที่บริเวณเดียวกัน และการอ่านผลจากการวัดด้วยวิธี indirect sandwich ELISA อ่านผลได้โดยตรงคือ ถ้าสีน้ำตาลเข้มแสดงว่ามีปริมาณ P_4 มาก แต่ถ้าสีน้ำตาลอ่อนแสดงว่ามี P_4 น้อย สำหรับการศึกษาครั้งนี้ความไวของปฏิกิริยาอยู่ที่ 10 นก./100 ไมโครลิตร จะส่งผลเสียในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณ P_4 น้อย (ในระดับพิโคกรัม) จะไม่สามารถตรวจวัดได้ ส่วนหนึ่งเนื่องมาจากปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยดังที่กล่าวข้างต้น จึงมีผลทำให้ใช้อัตราเจือจางมากคือ 1:32 (100 ไมโครลิตร ของแอนติบอดี 40 ไมโครกรัม/มล.) เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Claycomb *et al.* (1998) ที่ใช้เพียง 100 ไมโครลิตรของแอนติบอดี 10 ไมโครกรัม/มล. และต้องใช้ตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองอื่น ๆ ที่ใช้เพียง 50 ไมโครลิตร (Claycomb *et al.*, 1998) และ 20 ไมโครลิตร (O'Roke *et al.*, 1994) การหา intra และ inter coefficient assay พบว่ามีค่าเท่ากับ 13.18 % และ 7.22 % ตามลำดับ ข้อดีของการหาค่า intra และ inter assay คือ เป็นดัชนีในการวัดความแม่นยำในการทำงานทางด้าน ELISA ซึ่งค่า intra assay ช่วยประเมินความแม่นยำในการวัดของตัวอย่างเดียวกันในเพลทเดียวกัน โดยผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน ในเวลาเดียวกัน ซึ่งค่าที่ยอมรับได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต้องไม่เกิน 15 % ซึ่งถ้าหากค่าที่วัดได้ไม่เกินข้อกำหนดดังกล่าวแสดงว่าข้อมูลที่ได้จากการวัดน่าเชื่อถือในระดับหนึ่ง เช่นเดียวกันกับค่า inter assay จะใช้ประเมินเช่นกัน โดยค่าที่ยอมรับได้ต้องไม่เกิน 10 %

การพัฒนา strip ELISA kit ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Matsumoto *et al.* (1997) ที่ผลิต dip-strip สำหรับวัดสารตกค้างเนื่องจากยาปฏิชีวนะ bacitracin ในพลาสม่าของไก่ แต่กระดาษกรองที่ใช้เป็นคนละชนิดกัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้กระดาษกรองชนิด polyvinylydene fluoride (PVDF) อ้างอิงจากกนกวรรณ (2542) สาเหตุที่เลือกใช้เนื่องจากมีราคาถูกกว่ากระดาษกรองชนิดอื่น ๆ แต่ประสิทธิภาพการทำงานใกล้เคียงกัน การผลิต strip ELISA kit สำหรับการทดสอบปริมาณ P_4 ในน้ำนมตัวอย่างพบว่าสามารถใช้ strip ELISA kit ในการวัดระดับ P_4 ในน้ำนมได้ ให้ผลใกล้เคียงกับการวัดโดยใช้วิธี indirect sandwich ELISA ถึงแม้ว่าจะให้ผล false positive จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 20 % ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากน้ำนมที่ใช้ทดสอบเป็นน้ำนมที่เก็บมานาน เกิดการแยกชั้นของไขมันซึ่งมีมากจึงทำให้โอกาสที่ไขมันจะเกาะติดอยู่บริเวณขอบกระดาษมีสูง โดยเฉพาะในกรณีที่ล้างออกไม่หมด และทำให้บริเวณนั้นเป็นบริเวณที่มีการตั้งค้างของเอนไซม์ การพัฒนาสีจะเกิดสีบริเวณดังกล่าวมากกว่าบริเวณอื่น ๆ ในช่วงต้นของการพัฒนาวิธี strip ELISA kit ได้พัฒนาเพื่อให้ใช้สารตั้งต้นที่ทำให้เกิดสีเป็นของแข็ง แต่ไม่สำเร็จเนื่องจากสีที่เกิดขึ้นจางมากไม่สามารถแยกได้ด้วยตาเปล่า และปริมาณแอนติบอดีที่ใช้มีน้อยทำให้ ความไวของปฏิกิริยาลดลง

ข้อควรปรับปรุงสำหรับวิธี strip ELISA kit คือ ควรหาสารตั้งต้นที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่เป็นของแข็งซึ่งจะลดความยุ่งยากในการวิเคราะห์ภายในฟาร์มได้มากขึ้น และลดขั้นตอนการเตรียมแผ่น strip ELISA ให้ง่ายขึ้น เนื่องจากปัจจุบันจะต้องคีบกระดาษที่ผ่านการเคลือบ และการ block ปฏิกิริยาแล้วออกจากไมโครเพลท ซึ่งถ้าไม่ระวังอาจเกิดการฉีกขาดได้ และการติดกระดาษกับแผ่นพลาสติด เนื่องจากจะต้องติดให้เรียบเป็นเนื้อเดียวกัน เนื่องจากถ้าเกิดช่องว่างโอกาสที่จะเกิด fasle positive จะมีมากขึ้น ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นเพียงการศึกษาขั้นต้นสำหรับการพัฒนาต่อไป

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (P_4) เป็นฮอร์โมนที่มีหน้าที่ที่สำคัญต่อการคงสภาพการตั้งท้อง สามารถวัดระดับ P_4 เพื่อบ่งชี้สภาพการตั้งท้อง รอบการเป็นสัด เปอร์เซนต์การผสมติด และสภาพการทำงานของระบบสืบพันธุ์ได้ การศึกษาของ Schiavo (1974), Smith (1986) และ Robinson *et al.* (1989) ได้ใช้ประโยชน์จาก P_4 เพื่อวัดประสิทธิภาพการทำงานของระบบสืบพันธุ์ การวัด P_4 ช่วยทำให้ทราบถึงระยะลูเทียลหลังคลอดได้ การศึกษาครั้งนี้แบ่งระยะลูเทียลออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะลูเทียลสั้น (< 15 วัน) ระยะลูเทียลปกติ (17 ~ 18 วัน) และระยะลูเทียลยาว (19 ~ 26 วัน) ซึ่งถ้าหากระยะลูเทียลยาวกว่า 26 วัน แสดงว่าเกิดความผิดปกติ เช่น เกิดถุงน้ำรังไข่แบบ luteal cyst หรืออาจเกิดการตายของตัวอ่อนในระยะแรก (early embryonic death) ปัจจัยที่มีผลทำให้ระยะลูเทียลของโคนมแต่ละตัวแตกต่างกันจากการทดลองนี้พบว่า ระยะลูเทียลมีความสัมพันธ์กับสภาพภูมิอากาศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในช่วงเดือนตุลาคม 2543 – เดือนมิถุนายน 2544 โดยแบ่งออกเป็น 2 ช่วงตามค่า THI คือช่วงเดือนตุลาคม – เดือนมีนาคม (THI = 23.7) และช่วงเดือนเมษายน – มิถุนายน (THI = 26.4) เหตุผลที่แบ่งออกเป็น 2 ช่วงดังกล่าวเนื่องจากการวิเคราะห์อิทธิพลเนื่องจาก THI ต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์พบว่า มีจุดวิกฤตเท่ากับ 24.1 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Curtis (1983) ซึ่งได้สรุปค่า THI ที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ได้ 3 ค่าคือ ค่า THI ต่ำกว่า 23.5 จะไม่ก่อให้เกิดความเครียดต่อโคนม ค่า THI ประมาณ 25 จะก่อให้เกิดความเครียดต่อโคนมแต่ไม่ถึงขั้นรุนแรง และค่า THI สูงกว่า 26 จะก่อให้เกิดความเครียดอย่างรุนแรง สำหรับผลเนื่องจากสภาพอากาศในช่วงเดือนตุลาคม – มีนาคม พบว่ามีจำนวนโคตั้งท้องทั้งโคนมลูกผสม และพันธุ์แท้มากกว่าในช่วงเดือนเมษายน – มิถุนายน แสดงว่าสภาพอากาศที่มีค่า THI ในช่วง 23.7 เหมาะสมต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ของโคนมลูกผสม และพันธุ์แท้ ในช่วงเดือนเมษายน – มิถุนายนพบว่า โคนมพันธุ์แท้ที่มีระยะลูเทียลสั้นมีจำนวนมากกว่าโคนมลูกผสม และโคนมพันธุ์แท้ที่มีระยะลูเทียลปกติมีจำนวนน้อยกว่าโคนมลูกผสม ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสภาพที่มีค่า THI สูงไม่เหมาะสมต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ของโคนมพันธุ์แท้ ซึ่งสังเกตได้จากผลจากการวิเคราะห์ปัจจัยเนื่องจากอุณหภูมิ ความชื้น และค่า THI ในช่วงก่อน และหลังผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอด ซึ่งจะมีผลต่อจำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติดและระยะเวลาระหว่างคลอดจนถึงผสมติดในกลุ่มโคนมพันธุ์แท้มากกว่าโคนมลูกผสม

การศึกษาถึงผลเนื่องจากปริมาณน้ำนมในการทดลองนี้ใช้ข้อมูลในช่วง 100 วันของการให้นม เนื่องจากโคนมบางตัวจะหยุดให้น้ำนมก่อนตั้งท้อง หรือให้นมไม่ถึง 200 วัน เพราะสุขภาพไม่ดี มีปัญหาเรื่องเต้านมอักเสบ มดลูกอักเสบ กีบอักเสบ และมีระยะการให้นมมาก ปัจจัยเนื่องจากปริมาณน้ำนมพบว่ากลุ่มโคนมลูกผสมที่ให้น้ำนมปานกลางจะมีจำนวนโคที่มีระยะลูเทียลปกติมากกว่ากลุ่มอื่น ๆ แต่ไม่สามารถพิสูจน์ได้จากการทดลองนี้เนื่องจากไม่ได้ทำการบันทึกน้ำหนัก และการให้คะแนนรูปร่าง (body condition score) ของโคนมแต่ละตัวในช่วงทำการทดลอง ซึ่งจากรายงานของ Rabiee *et al.* (2002) พบว่าความสามารถในการให้ผลผลิตไม่มีผลต่อระดับ P_4 ในน้ำนมและอุจจาระ สำหรับความผิดปกติเนื่องจากความไม่สมดุลย์ของพลังงานส่วนมากเกิดขึ้นกับโคนมที่ให้ผลผลิตสูง (Hooijer *et al.*, 2002) ความผิดปกตินี้นอกจากจะวัดจากน้ำหนักตัวและคะแนนร่างกายแล้ว สามารถดูได้จากปริมาณไขมันในน้ำนมได้ (Waldmann *et al.*, 2001) และเมื่อศึกษาปัจจัยเนื่องจากปริมาณน้ำนมต่อวันก่อน และหลังผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอดพบว่า ปริมาณน้ำนมในช่วง 1 วันก่อนผสม และวันผสมมีผลต่อระยะเวลาระหว่างคลอดจนถึงผสมติดของโคนมลูกผสม ปริมาณน้ำนมที่อยู่ในช่วงวิกฤตคือ 12 ~ 20 กก. มีผลทำให้จำนวนวันผสมติดเพิ่มขึ้น ประโยชน์ของการศึกษาช่วยให้ทราบถึงช่วงวิกฤตที่ผู้เลี้ยงควรระวังกลุ่มโคนมลูกผสมที่ให้ปริมาณน้ำนมในช่วงนี้เช่นตรวจสัดให้บ่อยขึ้น เป็นต้น

การศึกษาถึงผลเนื่องจากอุณหภูมิ ความชื้น และ THI ในช่วงวันก่อน และหลังผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอดพบว่ามีผลต่อจำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติด และระยะเวลาระหว่างคลอดจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถึงผสมติดในโคนมพันธุ์แท้เป็นส่วนมาก โดยเฉพาะปัจจัยเนื่องจากอุณหภูมิสูงสุดในวันที่ 10 หลังผสม และความชื้นสูงสุดในวันที่ 3 วันก่อน และวันที่ 20 หลังผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอด จากการศึกษาพบว่าระดับอุณหภูมิในแต่ละวันมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก โดยเฉพาะช่วงเช้าเวลา 06.00 น. จะเป็นช่วงที่มีอากาศค่อนข้างเย็น แต่ในช่วงกลางวัน และบ่ายอุณหภูมิจะเพิ่มสูงขึ้น 5 – 6 องศาเซลเซียส และความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิตุ้มเปียก และตุ้มแห้งต่างกันประมาณ 4 - 5 องศาเซลเซียสในช่วงกลางวัน และบ่าย ด้วยสาเหตุนี้จึงเป็นไปได้ที่ความต่างของอุณหภูมิในช่วงวันนั้นแตกต่างกันมากเกินไปอาจส่งผลให้ร่างกายปรับตัวไม่ทัน ก่อให้เกิดความเครียด จึงส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบต่าง ๆ ภายในร่างกายเปลี่ยนแปลงไป รวมทั้งระบบสืบพันธุ์ด้วยเช่นกัน นอกจากนั้นยังมีปัจจัยเนื่องจากความชื้นสูงสุดในแต่ละวันด้วย หลายรายงานทำการศึกษาถึงผลเนื่องจากความเครียดเนื่องจากความร้อน (McDowell *et al.* (1975), Bedrak *et al.* (1975), Fuquay (1981), Gwazdauskas *et al.* (1983), Lewis *et al.* (1984), Wise *et al.* (1988), Rodtian *et al.* (1996), Wolfenson *et al.* (1997), Josson *et al.* (1997), Trout *et al.* (1998), Wolfenson and Meidan (2000), Dobson and Smith (2000), Ronchi *et al.* (2001) and Kadzere *et al.* (2002)) ซึ่งทุกรายงานจะระบุถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นเนื่องจากความเครียดเนื่องจากความร้อนคล้ายคลึงกันคือ มีผลต่อระดับฮอร์โมนที่สำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ เช่น P_4 , LH หรือ FSH เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีผลต่อความสามารถในการหลั่งฮอร์โมนของเซลล์ theca และ granulosa อัตราการผสมติดต่ำลง การตรวจสัดหรือรอบการเป็นสัดล่าช้า จำนวนครั้งผสมต่อการผสมติดเพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อทราบว่าช่วงอุณหภูมิความชื้น หรือ THI ใดเป็นช่วงวิกฤติก็ควรมีการปรับปรุงสภาพแวดล้อม เช่นการระบายอากาศภายในโรงเรือน หรือลดความชื้น และอุณหภูมิภายในโรงเรือน เป็นต้น การศึกษาของ Her *et al.* (1988) แนะนำให้มีการควบคุมอุณหภูมิภายในโรงเรือนนานกว่า 10 วันก่อนผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอดจะช่วยเพิ่มอัตราการผสมติดได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยวิธี indirect sandwich ELISA มีความไวของปฏิกิริยาอยู่ระหว่าง 250 นก. ~ 100 พก. โดยมี 50 % binding อยู่ที่ 10 นก. ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับซีรั่มกระต่ายในการเคลือบเพลทคือ 1:100 สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีคือ 1:32 และ goat anti mouse Ig G conjugated horseradish peroxidase คือ 1:4,000 ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 8 ชั่วโมง ค่า inter และ intra assay เท่ากับ 13.18 % และ 7.22 % ตามลำดับ ผลของประสิทธิภาพการทำงานของระบบสืบพันธุ์พบว่าระยะลูเทียล และการตั้งท้องมีความสัมพันธ์กับสภาพภูมิอากาศ (ร้อน-ชื้น และเย็น-แห้ง) ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) สภาพเย็น-แห้งมีผลต่อการทำงานของรังไข่ครั้งแรกหลังคลอดของโคนมพันธุ์แท้ (29.62 $\pm$ 1.83 วัน) เร็วกว่ากลุ่มโคนมลูกผสม (50.43 $\pm$ 26.39 วัน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การพัฒนา strip ELISA kit พบว่าสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนได้ โดยมี cut off point ที่ 5 นก./มล. ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 2 ชั่วโมง ไม่พบ cross reactivity กับฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ และเมื่อเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับวิธี indirect sandwich ELISA พบว่า strip ELISA kit ให้ผล false positive จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 20 % ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด และให้ผล false negative จำนวน 1 ตัวอย่างคิดเป็น 0.07 %

การศึกษาผลเนื่องจากสภาพอากาศในช่วงเดือนตุลาคม 2544 – เดือนมิถุนายน 2545 โดยแบ่งออกเป็น 2 ช่วงคือ เดือนตุลาคม – มีนาคม และเดือนเมษายน – มิถุนายน ผลการศึกษาพบว่าในช่วงเดือนตุลาคม – มีนาคม มีจำนวนโคนมที่ตั้งท้องทั้งโคนมลูกผสม และพันธุ์แท้มากกว่าในช่วงเดือนเมษายน – มิถุนายน ในช่วงเดือนเมษายน – มิถุนายน โคนมลูกผสมที่มีระยะลูเทียลปกติมีจำนวนมากกว่าโคนมพันธุ์แท้ และโคนมพันธุ์แท้ที่มีระยะลูเทียลสั้นมีจำนวนมากกว่าโคนมลูกผสม สำหรับการทำงานของรังไข่ครั้งแรกหลังคลอดในกลุ่มโคนมพันธุ์แท้เร็วกว่าโคนมลูกผสม จำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติด และระยะเวลาระหว่างวันคลอดจนถึงผสมติด ในกลุ่มโคนมลูกผสมเร็วกว่าโคนมพันธุ์แท้ ปัจจัยเนื่องจากปริมาณน้ำนมภายใน 100 วัน (100 days in milk) ต่อระยะลูเทียลในกลุ่มโคนมพันธุ์แท้พบว่าโคนมที่ให้ปริมาณน้ำนมปานกลางที่มีระยะลูเทียลยาว มีจำนวนมากกว่ากลุ่มที่ให้น้ำนมสูง และต่ำ โคนมพันธุ์แท้ที่ให้ปริมาณน้ำนมสูงจะมีวันผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอดเร็วกว่ากลุ่มโคนมที่ให้ปริมาณน้ำนมต่ำ และปานกลาง ในกลุ่มโคนมลูกผสมพบว่า กลุ่มที่ให้ปริมาณน้ำนมปานกลาง มีจำนวนโคที่มีระยะลูเทียลปกติ และระยะลูเทียลยาวมากกว่ากลุ่มที่ให้ปริมาณน้ำนมต่ำ และกลุ่มที่ให้ปริมาณน้ำนมสูง และมากกว่าโคนมพันธุ์แท้ที่ให้ปริมาณน้ำนมต่ำ กลุ่มที่ให้ปริมาณน้ำนมปานกลาง มีจำนวนโคที่มีระยะลูเทียลยาวมากกว่ากลุ่มที่ให้ปริมาณน้ำนมต่ำ สำหรับการศึกษาถึงผลเนื่องจากอุณหภูมิ ความชื้น และ THI พบว่าอุณหภูมิสูงสุดในวันที่ 10 หลังการผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอดมีอิทธิพลต่อจำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และระยะเวลาระหว่างวันคลอดจนถึงผสมติดในกลุ่มโคนมพันธุ์แท้ ความชื้นสูงสุดในวันที่ 3 ก่อนและวันที่ 20 หลังผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอดมีอิทธิพลต่อจำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติด และระยะเวลาระหว่างวันคลอดจนถึงผสมติดในกลุ่มโคนมพันธุ์แท้ และความชื้นสูงสุดในวันที่ 3 ก่อนผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอดมีอิทธิพลต่อจำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติดในกลุ่มโคนมลูกผสม และค่า THI ในวันที่ 3 และ 30 หลังผสมมีผลต่อระยะเวลาระหว่างคลอดจนถึงผสมติด และจำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติดในกลุ่มโคนมลูกผสมตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้อเสนอแนะ

1. การพัฒนาระบบ ELISA แบบ indirect sandwich ELISA มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้แอนติบอดีที่ได้มาจากสัตว์ต่างสปีชีส์เท่านั้น ดังนั้นควรที่จะวางแผนก่อนว่าจะใช้แอนติบอดีแบบใดเป็นแอนติบอดีสำหรับเคลือบเพลท และใช้แบบใดเป็น capture antibody

2. การเตรียมตัวอย่างน้ำนมสำหรับการทำ ELISA ควรที่จะเป็นตัวอย่างแบบเดียวกัน นั่นคือถ้าหากใช้น้ำนมที่มีไขมันปนก็ควรที่จะเป็นแบบเดียวกันตลอดการวิเคราะห์ หรือถ้าหากแยกไขมันออกก่อนการวิเคราะห์ควรที่จะทำเช่นเดียวกันตลอดการวิเคราะห์ เนื่องจากไขมันมีผลต่อการวิเคราะห์

3. ควรเปลี่ยนคอลัมน์ที่ใช้ในการสกัดแอนติบอดี อิมมูนโนโกลบูลินบ่อยครั้งเท่าที่จะทำได้ เพื่อให้ได้ปริมาณแอนติบอดีมากที่สุด

4. ควรพัฒนาวิธีที่สามารถสกัดแอนติบอดีให้ได้ปริมาณมากที่สุด ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้วิธี column chromatography ซึ่งอาศัยการแยกสารด้วยขนาดที่ต่างกัน ดังนั้นชนิดเจลที่ใช้ในการแยกจึงมีผลมาก จึงควรศึกษาวิธี chromatography แบบอื่น ๆ ที่อาจจะมีวิธีการอื่นที่สามารถแยกสารได้ละเอียดกว่านี้ เช่น ion exchange chromatography เป็นต้น

5. การเก็บข้อมูลเพื่อนำมาใช้ในงานทดลองควรจะเก็บข้อมูลให้ครอบคลุมที่สุด เช่นน้ำหนักตัว วันที่แสดงอาการเป็นสัดครั้งแรก หรือเปอร์เซนต์ไขมันในน้ำนม เป็นต้น เพราะจะช่วยทำให้ทราบสถานภาพของโคแต่ละตัวที่ใช้ในการทดลอง เพื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ร่วมกับการวิจารณ์ผลการทดลอง

6. การพัฒนาระบบ strip ELISA ขั้นตอนการล้างควรจะล้างไขมันจากน้ำนมออกให้หมด เพราะมีผลต่อการพัฒนาสี

7. จากการศึกษาจะพบว่าสภาพภูมิอากาศ อุณหภูมิ ความชื้น THI และปริมาณน้ำนม มีผลต่อโคนมลูกผสม และพันธุ์แท้ต่าง ๆ กันไป ดังนั้นจึงควรนำข้อมูลที่ได้ไปร่วมกับการจัดการฟาร์มเพื่อแก้ไขข้อเสีย หรือปรับปรุงสมรรถภาพการผลิตของโคนมฝูงดังกล่าว โดยเฉพาะในโคนมพันธุ์แท้ที่ได้รับอิทธิพลเนื่องจากอุณหภูมิ ความชื้น และ THI มาก ซึ่งส่งผลให้ระยะเวลาระหว่างคลอดจนถึงผสมติดมีระยะเวลายาวนานออกไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved