



ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการ สัตวแพทยศาสตร์ มทม. ครั้งที่ 1 ประจำปี 2550



18-19 ตุลาคม 2550
ณ. โรงแรมรามาการ์เดน



“
สัตวแพทย์ก้าวหน้า
ปศุสัตว์ก้าวหน้า
ได้ด้วยเทคโนโลยี
”

**ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการ
สัตวแพทยศาสตร์ มทม.
ครั้งที่ 1 ประจำปี 2550**

18-19 ตุลาคม 2550 ณ. โรงแรมรามารักษ์ใต้

รายชื่อคณะกรรมการจัดงานประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ มกม. ครั้งที่ 1 ประจำปี 2550

1. รศ.น.สพ.ดร.ไพบูลย์	ยุติศรี	กรรมการที่ปรึกษา
2. รศ.ดร.อธิคม	ฤกษ์บุตร	กรรมการที่ปรึกษา
3. รศ.ดร.สาโรช	คำเจริญ	กรรมการที่ปรึกษา
4. อ.น.สพ.ดร.สำราญ	บรรณจิรกุล	ประธานคณะกรรมการจัดงาน
5. ผศ.น.สพ.ดร.จตุพร	กระจายศรี	รองประธานฝ่ายวิชาการ
6. อ.น.สพ.ดร.ทงศักดิ์	มะมม	รองประธานฝ่ายการจัดงาน
7. อ.สพ.ญ.อุมาพร	รุ่งฤกษ์ฤทธิ์	ประธานฝ่ายเอกสารและสถิติ
8. อ.น.สพ.ดร.เอกชาติ	พรหมดิเรก	ประธานฝ่ายวิชาการ
9. อ.สพ.ญ.พินิตดา	ชะอุ่มผล	ประธานฝ่ายทะเบียนและประเมินผล
10. อ.น.สพ.กฤษฎา	ชำพูล	ประธานฝ่ายปฎิคม
11. อ.น.สพ.สมชาย	จันทร์เกษ	ประธานฝ่ายประชาสัมพันธ์
12. อ.สพ.ญ.ดร.อารยา	อนุไพวรรณ	ประธานฝ่ายดำเนินการประชุม
13. อ.ธีรวัฒน์	พัฒนรัชต์	ประธานฝ่ายอาคารสถานที่
14. อ.น.สพ.ดร.เจษฎา	รุ่งภูประดิษฐ์	ประธานฝ่ายจัดหาทุน
15. อ.จุฬารักษ์	สอนกลิ่น	ประธานฝ่ายเหรียญ
16. อ.สพ.ญ.ชาธิณี	โสภารัตน์	เลขานุการ
17. อ.สพ.ญ.สุกัญญา	ผลิตกุล	เลขานุการ
18. คุณพัชรี	กองเป้ง	เลขานุการ

คณะกรรมการฝ่ายวิชาการ

อ.น.สพ.ดร.เอกชาติ	พรหมดิเรก	ประธานอนุกรรมการฝ่ายวิชาการ
อ.น.สพ.จำลอง	มิตรชาวไทย	อนุกรรมการ
อ.สพ.ญ.ธัญญาพร	ไชยคุณ	อนุกรรมการ
อ.สพ.ญ.ทรรศนีย์	บุญยทรรศนีย์	อนุกรรมการ
อ.สพ.ญ.วิธสา	แสงแก้ว	อนุกรรมการ

คณะกรรมการฝ่ายอาคารสถานที่

อ.ธีรวัฒน์	พัฒนรัชต์	ประธานอนุกรรมการฝ่ายอาคารสถานที่
น.สพ.ทักษ์ดนัย	จิรพินธุ์	อนุกรรมการ

คณะกรรมการฝ่ายเหรียญ

อาจารย์จุฬารักษ์	สอนกลิ่น	ประธานอนุกรรมการฝ่ายเหรียญ
อ.สพ.ญ.นันทิตา	ทรัพย์แก้ว	อนุกรรมการ

คณะกรรมการฝ่ายจัดหาทุน

อ.น.สพ.ดร.เจษฎา	รุ่งภูประดิษฐ์	ประธานอนุกรรมการฝ่ายจัดหาทุน
อ.น.สพ.ศักดิ์ชัย	เรือนเพชร	อนุกรรมการ
อ.สพ.ญ.จันทนา	เลาหรัชต์ธานินทร์	อนุกรรมการ
อ.สพ.ญ.สุภรัตน์	วรรณศิลป์	อนุกรรมการ
สพ.ญ.ธนิกานต์	สุวรรณโชติ	อนุกรรมการ
น.สพ.ธเนศ	อนุศักดิ์เสถียร	อนุกรรมการ
คุณเนาวรัตน์	งามเมือง	อนุกรรมการ

คณะกรรมการฝ่ายเอกสารและสื่อบัตร

อ.สพ.ญ.อุมาพร	รุ่งฤกษ์ฤทธิ์	ประธานอนุกรรมการฝ่ายเอกสารและสื่อบัตร
อ.สพ.ญ.จิตรรา	สนิสุวิวงศ์	อนุกรรมการ
อ.สพ.ญ.ทรรศนีย์	บุญทรรศนีย์	อนุกรรมการ
อ.สพ.ญ.โชติกา	ทิวาลัย	อนุกรรมการ

คณะกรรมการฝ่ายประชาสัมพันธ์

อ.น.สพ.สมชาย	จันทร์เกษ	ประธานอนุกรรมการฝ่ายประชาสัมพันธ์
คุณศิริรัตน์	พิมพ์วาปี	อนุกรรมการ

คณะกรรมการฝ่ายทะเบียนและประเมินผล

อ.สพ.ญ.พินิตดา	ชะอุ่มผล	ประธานอนุกรรมการฝ่ายทะเบียนและประเมินผล
อ.น.สพ.สง่า	บุญโสดา	อนุกรรมการ
อ.น.สพ.นฤพนธ์	ญาณประภาศิริ	อนุกรรมการ
อ.น.สพ.ชัยณรงค์	ภูมิตนประพิน	อนุกรรมการ

คณะกรรมการฝ่ายปฎิคม

อ.น.สพ.กฤษฎา	ข้าพุล	ประธานอนุกรรมการฝ่ายปฎิคม
อ.น.สพ.สิทธิชน	รัตนจันทร์	อนุกรรมการ
คุณสามารถ	สุวรรณเคน	อนุกรรมการ
คุณนาตยา	จันทิก	อนุกรรมการ

คณะกรรมการฝ่ายดำเนินการประชุม

อ.สพ.ญ.ดร.อารยา	อนุไพวรรณ	ประธานอนุกรรมการฝ่ายดำเนินการประชุม
อ.ทัศนีย์	ตรัยรัตน์อภิวิน	อนุกรรมการ
อ.สพ.ญ.อภิรัตน์	อินทรพัถร์	อนุกรรมการ
คุณสุวรรณวิไล	สะนิละ	อนุกรรมการ
คุณธัญญารัตน์	เอกตา	อนุกรรมการ
คุณศิริวรรณ	เทพเทียน	อนุกรรมการ
คุณสุนิสา	สุชาติธรรม	อนุกรรมการ

สารจากอธิการบดี

ในปีพุทธศักราช 2550 นี้ ปวงชนชาวไทยถือว่าเป็นปีมหามงคลยิ่งปีหนึ่ง เพราะเป็นปีที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว มีพระชนม์มายุ ครบ 80 พรรษา ดังนั้นในปีนี้พวกเราปวงชนชาวไทยในหลายๆ หน่วยงาน จึงพร้อมใจกันจัดกิจกรรมที่ดีและมีประโยชน์ขึ้น เพื่อถวายเป็นพระราชกุศลแด่องค์พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว รวมทั้งมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานครด้วย

เป็นเรื่องน่ายินดีเป็นอย่างยิ่งที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ได้จัดการประชุมวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 1 ประจำปี 2550 ขึ้นในวันที่ 18-19 ตุลาคม 2550 นี้ ซึ่งนับได้ว่าเป็นส่วนหนึ่งในการจัดกิจกรรมที่เป็นประโยชน์ต่อสังคมส่วนรวม เพื่อเผยแพร่ความรู้ ความก้าวหน้าทางวิชาการสู่สังคม และเป็นการพัฒนาวิชาชีพทางด้านสัตวแพทย์ ในสาขาต่างๆ อีกด้วย ทั้งยังเป็นการเปิดโอกาสให้นักวิชาการ ผู้เชี่ยวชาญ ได้ร่วมแลกเปลี่ยนความรู้ ความคิดเห็น ประสบการณ์ ที่เป็นประโยชน์ต่อกัน และยังเป็นการพบปะสังสรรค์กันอีกด้วย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร มีนโยบายชัดเจนที่จะส่งเสริมให้บุคลากรทำงานวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่องเสมอมา การจัดประชุมวิชาการต่างๆ จึงถือเป็นเวทีสำคัญในการรวบรวมหมื่นนักวิจัย ก่อให้เกิดการต่อยอดของงานวิจัย และเป็นจุดเริ่มต้นของการสร้างสรรค์งานวิจัยใหม่ๆ ได้ในอนาคต

กระผมเชื่อว่า ผลที่ได้รับจากการประชุมวิชาการของคณะสัตวแพทยศาสตร์ ในครั้งนี้ จะช่วยกระตุ้นให้การพัฒนาทางด้านวิชาชีพสัตวแพทย์มากขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ทั้งต่อนักวิชาการ ตัวองค์กร สังคม และประเทศชาติในที่สุด



รองศาสตราจารย์ ดร.สุเจตน์ จันทรังษ์

อธิการบดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

สารจากคณบดี

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ได้ก่อตั้งขึ้นเมื่อปี พ.ศ.2535 เป็นต้นมาจนถึงปัจจุบันได้ผลิตบัณฑิตไปรับใช้ประเทศ รวมทั้งสิ้น 10 รุ่น จำนวนประมาณ 400 คน บัณฑิตสัตวแพทย์เหล่านี้ได้เข้าทำงานรับใช้สังคมและประเทศชาติทุกภาคส่วน ทั้งภาครัฐบาลและภาคเอกชนมาเป็นระยะเวลา 15 ปีเศษ และเพื่อเป็นการเฉลิมฉลองเนื่องในวโรกาสมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษาของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ครบรอบ 80 พรรษา 5 ธันวาคม 2550 นอกจากนั้นยังมีความต้องการเป็นส่วนร่วมในการเผยแพร่พัฒนาองค์ความรู้ความชำนาญทางด้านวิชาชีพทางสัตวแพทย์ ในสาขาต่างๆ ให้เทียบเท่าระดับสากล เพื่อบรรลुวัตถุประสงค์ดังกล่าว ทางคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร จึงจัดให้มีการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 1 ขึ้นในวันที่ 18-19 ตุลาคม พ.ศ.2550 ณ โรงแรมรามารการ์เด้น กรุงเทพมหานคร ผมในนามของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ขอต้อนรับผู้เข้าร่วมประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 1 ทุกท่านที่เข้าร่วมประชุม ตามวัน เวลา ดังกล่าวข้างต้นด้วยความยินดียิ่ง

ขอขอบคุณวิทยากรผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านจากหน่วยงานของรัฐบาล และหน่วยงานของเอกชน และขอขอบคุณผู้ให้การสนับสนุนกิจกรรม ทูนทรัพย์ โดยเฉพาะบริษัทห้างร้านต่างๆ สุดท้ายขอขอบคุณคณะกรรมการจัดการประชุมทุกท่านที่เสียสละเวลา กำลังกาย กำลังใจ ทำให้การจัดงานครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี



(รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ไพบูลย์ ยุติศรี)

คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

สารจากประธานคณะกรรมการ จัดการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ มทม. ครั้งที่ 1 ประจำปี 2550

ปีนี้จัดเป็นปีมหามงคลที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงมีพระชนม์มายุครบ 80 พรรษา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร มีความสำนึกในพระมหากรุณาธิคุณของพระองค์ท่านที่มีต่อพสกนิกรชาวไทย และร่วมเฉลิมฉลองในโอกาสมหามงคลยิ่งนี้จึงดำริที่จัดงานประชุมทางวิชาการทางสัตวแพทย์ มทม. ครั้งที่ 1 ประจำปี 2550 (The 1st MUT Veterinary Medicine Conference 2007) กำหนดขึ้นภายใต้หัวข้อเรื่อง “สัตวแพทย์ก้าวหน้า ปศุสัตว์ก้าวหน้า ได้ด้วยเทคโนโลยี (Technology Improved Livestock Development and Animal Life)” ขึ้น ซึ่งการประชุมวิชาการฯ ครั้งนี้ประกอบด้วยการนำเสนอข้อมูลทางวิชาการจากผู้ทรงคุณวุฒิทั้งส่วนของสัตว์เลี้ยง อาทิเช่น การตรวจวินิจฉัยทางจุลชีววิทยาและระบบประสาท การใช้เทคนิคทางรังสีวิทยาช่วยในการวินิจฉัยในช่องอก การจัดการทางคลินิกสำหรับปลาสวยงาม ส่วนทางปศุสัตว์มีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่ทันสมัยสำหรับการส่งเสริมวิชาชีพด้วย เช่น การใช้ไบโอเทคโนโลยีทางด้าน In Vitro Fertilization, Cloning and stem cell การตรวจ Fingerprint รวมทั้ง การประยุกต์ความรู้ทางภูมิคุ้มกันวิทยาสำหรับใช้ในการวินิจฉัยและการพัฒนาวัคซีน นอกจากนี้ยังมีการเสนองานวิจัยจากนักวิชาการในสาขาต่างๆที่น่าสนใจทั้งในส่วนบรรยายและโปสเตอร์

ในฐานะประธานคณะกรรมการจัดประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ มทม. ครั้งที่ 1 ประจำปี 2550 ยินดีต้อนรับท่านผู้เข้าร่วมวิชาการทุกท่าน หวังเป็นอย่างยิ่งที่การจัดการประชุมทางวิชาการในครั้งนี้จะเป็นเวทีทางวิชาการที่จะเป็นประโยชน์สำหรับทุกท่าน



อาจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.สำราญ บรรณจิรกุล
ประธานคณะกรรมการจัดประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ มทม.
ครั้งที่ 1 ประจำปี 2550

คำไว้อาลัย แด่ รองศาสตราจารย์ ดร.สาโรช คำเจริญ



ท่านรองศาสตราจารย์ ดร.สาโรช คำเจริญ อดีตอาจารย์ประจำคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร และที่ปรึกษาคณะกรรมการจัดงานประชุมวิชาการสัตวแพทยมทม. ครั้งที่ 1 ประจำปี 2550 เป็นผู้หนึ่งที่ช่วยให้คำแนะนำ คำติชม ที่ทางคณะกรรมการฯ ได้รับมาปฏิบัติให้เกิดเป็นมรรคผล อาจารย์สาโรชจะเป็นผู้ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนคณะกรรมการฯ ในทุกครั้งที่อยู่ในช่วงวิกฤต นับแต่การประชุมคณะกรรมการฯ ในครั้งแรก ท่านเคยปรารภและแสดงความหวังไว้อย่างจริงใจ ซึ่งผมในฐานะประธานกรรมการฯ รู้สึกประทับใจและมีความปลาบปลื้มที่ท่านได้แสดงน้ำใจให้คณะทำงาน เป็นที่น่าเสียใจและเสียดายเป็นอย่างยิ่งที่ท่านได้จากพวกเราไปอย่างกะทันหัน ผมขอเป็นตัวแทนคณะกรรมการฯ ทุกท่าน ในการแสดงการไว้อาลัยแด่ท่านรองศาสตราจารย์ ดร.สาโรช คำเจริญ หากท่านสามารถรับรู้ด้วยญาณวิถีใดๆ ก็ตาม ขอให้ท่านได้รับรู้ว่าพวกเราแสดงความขอบพระคุณแต่ท่าน และขอให้ท่านได้มีความสุขในสุดท้ายของชีวิต

อาจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.สำราญ บรรณจิรกุล
ประธานคณะกรรมการจัดงานประชุมวิชาการสัตวแพทย มทม.
ครั้งที่ 1 ประจำปี 2550

กำหนดการ

การประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มทม. ครั้งที่ 1 ประจำปี 2550

ในวันที่ 18-19 ตุลาคม พ.ศ.2550 ณ โรงแรม รามการ์เด็น อาคาร Convention center

วันพฤหัสบดีที่ 18 ตุลาคม พ.ศ.2550

เวลา	Convention Room	Lavender Room
08.30-09.00 น.	ลงทะเบียน - พิธีเปิด	
09.15-10.30 น.	Small animal clinical ophthalmology (Clinical management of ulcerative keratitis)	Biotechnology (In Vitro fertilization)
	พัก-อาหารว่าง-ชมโปสเตอร์	
10.45-12.00 น.	Small animal clinical neurology (Rehabilitation for neurogenic patient)	Biotechnology (Cloning and stem cell)
	พักรับประทานอาหารเที่ยง	
13.00-14.30 น.	Ovariohysterectomy: When, Why and its complication	The examination of genetic fingerprint for improvement of the parent in cattle
	พัก-อาหารว่าง-ชมโปสเตอร์	
14.45-16.15 น.	Small animal clinical radiology (Thoracic radiographic interpretation)	Oral Presentation / Special presentation

วันศุกร์ที่ 19 ตุลาคม พ.ศ.2550

เวลา	Convention Room	Lavender Room
08.30-09.00 น.	ลงทะเบียน	
09.15-10.30 น.	Update for the current situation and enhancement of academic affair of Avian Influenza	Immunology of infectious disease (Diagnosis and vaccine development)
	พัก-อาหารว่าง-ชมโปสเตอร์	
10.45-12.00 น.	How to predict the optimal time for insemination in dog ?	Clinical management for ornamental fish
	พักรับประทานอาหารเที่ยง	
13.00-14.30 น.	Success in business management for small animal hospital (Panel discussion)	หลักการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์เลี้ยง (How to use antibiotics in companion animals)
	พัก-อาหารว่าง-ชมโปสเตอร์	
14.45-16.15 น.	Success in business management for small animal hospital (Q & A)	ข้อพิจารณาในการทำวัคซีนในสัตว์เลี้ยง (Vaccine consideration in companion animals)

รายนามวิทยากรผู้ทรงคุณวุฒิ

1.สศ.อ.สพ.ดร.ชัยณรงค์ โลหิต

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่ 18 ตุลาคม 2550 เวลา 13.00-14.30 น.

Convention Room

•Ovariohysterectomy: When, Why and its complication

วันที่ 19 ตุลาคม 2550 เวลา 13.00-14.15 น.

Convention Room

•Success in business management for small animal hospital

2.สศ.อ.สพ.ดร.สุคตสส ศิริไวยพวงศ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่ 19 ตุลาคม 2550 เวลา 10.45-12.00 น.

Convention Room

•How to predict the optimal time for insemination in dog?

3.สศ.อ.สพ.ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์

หน่วยอายุศาสตร์สัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่ 19 ตุลาคม 2550 เวลา 10.45-12.00 น.

Lavender Room

•Clinical management for ornamental fish

4.อ.สพ.บัณฑิต ติระพัฒน์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วันที่ 18 ตุลาคม 2550 เวลา 10.45-12.00 น.

Convention Room

•Small animal clinical neurology

(Rehabilitation for neurogenic patient)

5.สศ.อ.สพ.ดร.ทวีศักดิ์ ส่งเสริม

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วันที่ 19 ตุลาคม 2550 เวลา 09.15-10.30 น.

Convention Room

•Update for the current situation and enhancement of academic affair of Avian Influenza

6.อ.สพ.สมเกียรติ ห้วยจันทิก

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

วันที่ 18 ตุลาคม 2550 เวลา 14.45-16.15 น.

Convention Room

•Small animal clinical radiology

(Thoracic radiographic interpretation)

7.ดร.รังสรรค์ พาสพ่าย

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วันที่ 18 ตุลาคม 2550 เวลา 10.45-12.00 น.

Lavender Room

•Biotechnology (Cloning and stem cell)

8.ศ.สพ.ญ.ดร.วันเพ็ญ ชัยคำพา

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

วันที่ 18 ตุลาคม 2550 เวลา 14.45-16.15 น.

Lavender Room

•Immunology of infectious disease

(Diagnosis and vaccine development)

9.ดร.มาลี อภิเมธีราษฎร์

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

วันที่ 18 ตุลาคม 2550 เวลา 09.15-10.30 น.

Lavender Room

•Biotechnology (In Vitro Fertilization)

10.สพ.ญ.กัลยา เก่งวิทยกรรรม

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

วันที่ 18 ตุลาคม 2550 เวลา 13.00-14.30 น.

Lavender Room

•The examination of genetic fingerprint for improvement of the parent in cattle

11.สพ.ญ.ฉันทนีย์ มงคลศรีสวัสดิ์

บริษัท เอ็น ทู เอ็น อินเตอร์เทรด จำกัด

วันที่ 18 ตุลาคม 2550 เวลา 09.15-10.30 น.

Convention Room

•Small animal clinical ophthalmology

(Clinical management ulcerative keratitis)

12.อ.สพ.บุญชู ทองเจริญบุญพร

โรงพยาบาลสัตว์ทองหล่อ

วันที่ 19 ตุลาคม 2550 เวลา 13.00-16.15 น.

Convention Room

•Success in Business management

for small animal hospital

13.อ.สพ.บุญเลิศ ปรินาตั้งกิจ

โรงพยาบาลสัตว์กรุงเทพนนท์

วันที่ 19 ตุลาคม 2550 เวลา 13.00-16.15 น.

Convention Room

•Success in Business management

for small animal hospital

14.ร.ต.อ.สพ.ญ.อารยา พลสุวรรณ

สัตวแพทย์ 4 โพลีคลินิก

วันที่ 19 ตุลาคม 2550 เวลา 13.00-16.15 น.

Convention Room

•Success in Business management

for small animal hospital

15.อ.สพ.พิเศษ อัครพนธ์เมือง

โรงพยาบาลสัตว์รัตนวิไล

วันที่ 19 ตุลาคม 2550 เวลา 13.00-16.15 น.

Convention Room

•Success in Business management

for small animal hospital

รายนามผู้สนับสนุนงานประชุมวิชาการ สัตวแพทยศาสตร์ มกม. ครั้งที่ 1 ประจำปี 2550

ผู้สนับสนุนหลัก

บริษัท อินเตอร์ เวท (ประเทศไทย) จำกัด

บริษัท เบสท์ อีควิปเมนต์ เซ็นเตอร์ จำกัด

ผู้สนับสนุนรอง

บริษัท เพอร์เฟค คอมพาเนียน จำกัด

บริษัท แอนด์โก โปรแพ็ค จำกัด

บริษัท เซอริง-พราว แอนิมัล เฮลธ์ จำกัด

บริษัท โนวेल อินเตอร์เทรด จำกัด

บริษัท เอ็น ทู เอ็น อินเตอร์เทรด จำกัด

บริษัท ฟอรัท ดอตเจ้ แอนิมัล เฮลธ์ (ไทยแลนด์) จำกัด

บริษัท ยู.เอฟ.โอ.เชียงใหม่ เซอร์จิคอล อินสตรูमेंท จำกัด

บริษัท เวท อะกริเทค จำกัด

บริษัท กิสส์ มาร์เก็ตติ้ง จำกัด

ผู้สนับสนุน

ห้างหุ้นส่วนจำกัด ที.เจ.แอนิมัล เฮลท์

บริษัท เบสท์อะโกร จำกัด

บริษัท บี เอ็น ซุปพีเรียมาร์เก็ตติ้ง จำกัด

บริษัท ดีทแฮล์ม จำกัด

บริษัท ดีทแฮล์ม จำกัด

บริษัท คงศักดิ์เอ็กซ์เรย์การแพทย์ อุตสาหกรรม จำกัด

บริษัท เจนเทค อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด

บริษัท ไฟเซอร์ (ประเทศไทย) จำกัด

บริษัท เพ็ทเวสต์ เซ็นเตอร์ จำกัด

บริษัท สมาร์ทเวท แอนด์ เพ็ท จำกัด

บริษัท แอนิเทค โทเทิล โซลูชั่น จำกัด

ห้างหุ้นส่วนจำกัด ปกรณ์ภัณฑ์ เมดิคอล ซัพพลาย

บริษัท ยูโนเวท เน็ตเวิร์ค จำกัด

บริษัท ไมโอเทค จำกัด

บริษัท แอดวานซ์ เวทราซูติคอล จำกัด

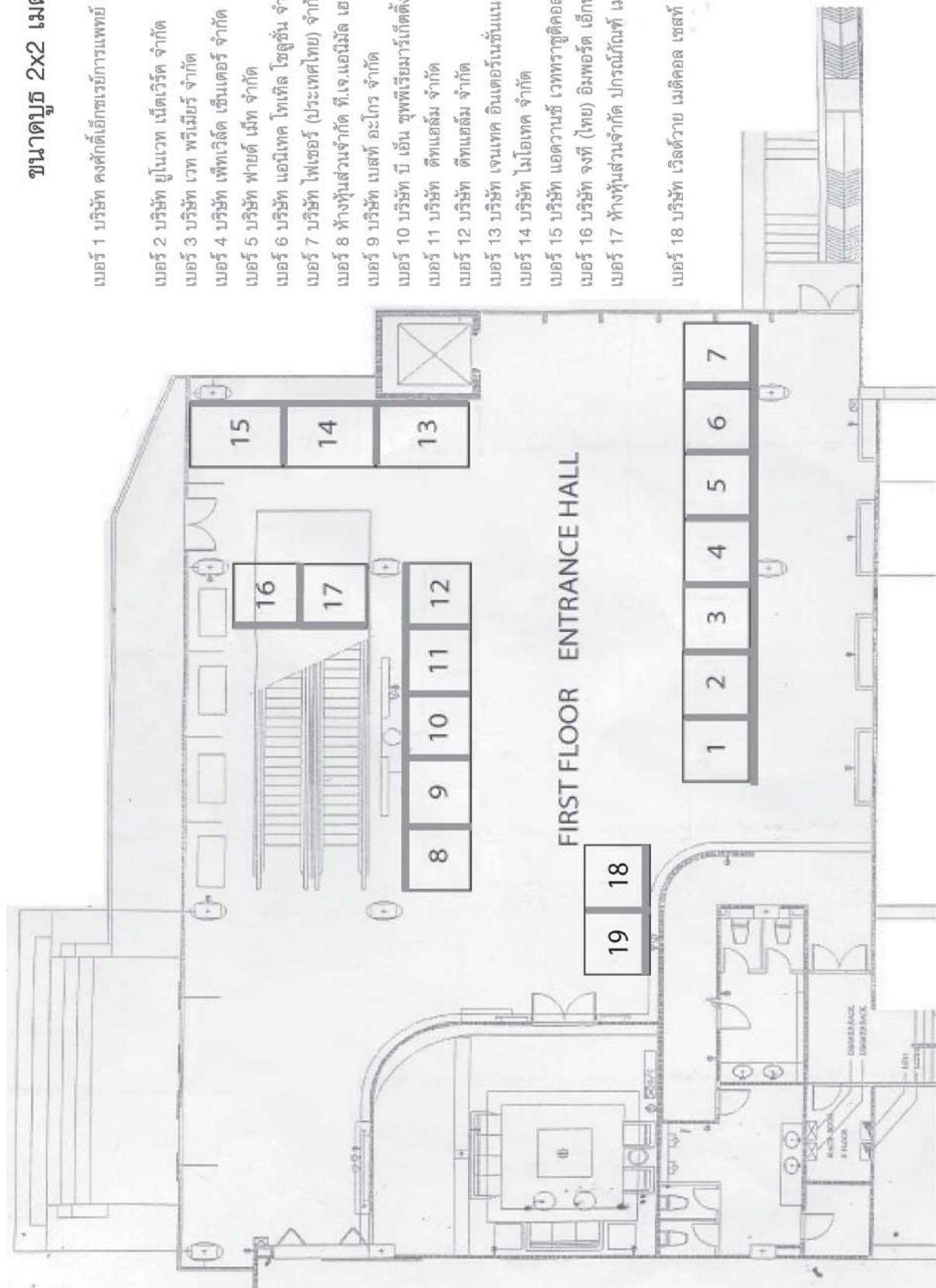
บริษัท จงที (ไทย) อิมพอร์ต เอ็กพอต จำกัด

บริษัท ศูนย์สรรพสินค้าสัตว์เลี้ยว จำกัด (นิตยสาร VPN)

บริษัท เวท พรีเมียร์ จำกัด

ขนาดบูธ 2x2 เมตร

- เบอร์ 1 บริษัท คงศักดิ์เอ็กสเรย์การแพทย์ อุตสาหกรรม จำกัด
- เบอร์ 2 บริษัท ยูโนเวท เมดิเวิร์ด จำกัด
- เบอร์ 3 บริษัท เวท พรีเมียร์ จำกัด
- เบอร์ 4 บริษัท เพ็ทเวลิตี เซ็นเตอร์ จำกัด
- เบอร์ 5 บริษัท ฟายด์ เม็ท จำกัด
- เบอร์ 6 บริษัท แอนิมเทค โทเทิล โซลูชั่น จำกัด
- เบอร์ 7 บริษัท ไฟเซอร์ (ประเทศไทย) จำกัด
- เบอร์ 8 ห้างหุ้นส่วนจำกัด ที.เจ.แอนิมัล เฮลท์
- เบอร์ 9 บริษัท เบสท์ อะโกร จำกัด
- เบอร์ 10 บริษัท บี เอ็น ซูพรีเรียร์เก็ตติ้ง จำกัด
- เบอร์ 11 บริษัท ดีทแอสล์ จำกัด
- เบอร์ 12 บริษัท ดีทแอสล์ จำกัด
- เบอร์ 13 บริษัท เจนเทค อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด
- เบอร์ 14 บริษัท โมโอเทค จำกัด
- เบอร์ 15 บริษัท แอดวานซ์ เวทพราดักคอล จำกัด
- เบอร์ 16 บริษัท จงที (ไทย) อิมพอร์ต เอ็กพอด จำกัด
- เบอร์ 17 ห้างหุ้นส่วนจำกัด ปกรณ์กันท์ เมดิคอล ชัพพลาย
- เบอร์ 18 บริษัท เวลด์วาย เมดิคอล เซลส์ จำกัด



บูธที่	ขนาด	บริษัท
เบอร์ 20 (2x3 เมตร)		บริษัท เวท อะกริเทค จำกัด
เบอร์ 21 (2x3 เมตร)		บริษัท ยู. เอฟ.โอ.เซียงใหม่ เซอร์จิคอล อินสทรูमेंท จำกัด
เบอร์ 22 (2.5x3 เมตร)		บริษัท เพอร์เฟค คอมพานีเยน กรุป จำกัด
เบอร์ 23 (3x2 เมตร)		บริษัท แม็คโก้ โปรแพ็ค จำกัด
เบอร์ 24 (3x2 เมตร)		บริษัท ฟอรัท ดอดจ์ แอนิมัล เฮลธ์ (ไทยแลนด์) จำกัด
เบอร์ 25 (3x2 เมตร)		บริษัท เซอร์จิง-พรวา แอนิมัล เฮลธ์ จำกัด
เบอร์ 26 (3x2 เมตร)		บริษัท กิสส์ มาร์เก็ตติ้ง จำกัด
เบอร์ 27 (3x2 เมตร)		บริษัท โนวาล อินเตอร์เทรด จำกัด
เบอร์ 28 (3x2 เมตร)		บริษัท เอ็น ทู เอ็น อินเตอร์เทรด จำกัด
เบอร์ 29 (5x3 เมตร)		บริษัท เบสท์ อีควิปเมนต์ เซ็นเตอร์ จำกัด
เบอร์ 30 (5x3 เมตร)		บริษัท อินเตอร์เวท (ประเทศไทย) จำกัด

สารบัญ

Radiographic interpretation Cardiothoracic Radiography	1
อ. สมเกียรติ ห้วยจันทิก	
การกำหนดระยะเวลาในการผสมพันธุ์หรือผสมเทียมสุนัข	10
How to predict the optimal breeding or insemination time in dog	
รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.สุตธรรม ศิริไวยทยพงศ์	
การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (In Vitro Fertilization : IVF)	13
มาลี อภิเมธีอารัง	
เทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนโคด้วยการโคลนนิ่ง	20
ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย	
การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์พ่อแม่-ลูกในโค	29
DNA Fingerprint for Parentage analysis in Cattle	
กัลยา เก่งวิทยกรรม วิบูลย์ ตูลารักษา	
การจัดการโรคในปลาสวยงาม	40
Clinical Management Ornamental Fish	
รศ.น.สพ.ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์	
Oral Presentation	55
การศึกษาเบื้องต้นของการย่อยได้ของกรดไขมัน	56
ในสุกรรุ่น-ขุนที่ได้รับอาหารผสมไขมันวัวหรือน้ำมันทานตะวัน	
A preliminary study on digestion of individual fatty acids	
in growing-finishing pigs fed diets containing either	
beef tallow or sunflower oil	
จำลอง มิตรชาวไทย เฉลิมพล เขื่องกลาง สุนทร วิทยาคุณ ไกรสิทธิ์ วสุเพ็ญ	
ศศิพันธ์ วงศ์สุทธาวาส ไพรวลย์ ศรีนาววล โรเบิร์ต โฮวีเนียร์ และ แอนตอน ซี ไปเน็น	
การศึกษาทบทวน เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองต่อการใช้ออร์โมน พรอสตาแกลนดิน	63
เหนี่ยวนำการเป็นสัดในแม่โคนม ด้วยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ การฉีดเข้าแอ่งโคนหาง	
และการฉีดเข้าเยื่อเมือกปากช่องคลอด	
Review Study of the Comparison on Response of Estrus Induction in	
Dairy Cows by Intramuscular, Intraischioirectal fossa and	
Intravulvosubmucosa Injection of Prostaglandin F_{2α}	
จตุพร กระจ่ายศรี	
Sex Identification of Some Psittacine Birds	71
by Polymerase Chain Reaction	
Chanathip Thammakarn Apichart Punchukrang	
Kanya Jirajaroenrat Kanokrat Srikijkasemwat	

ผลของการลดขนาดฮอร์โมนเอฟเอสเอชต่อการตอบสนองการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ และตัวอ่อนที่ได้ ในโคพันธุ์บราห์มัน : กรณีศึกษา Effect of Reduced FSH Dose on Superovulatory Response and Embryo Yield in Brahman Cows : A Case Study ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท์ เทื่องสันเทียะ กิรติ อีแจ้ บันลือ กล้าพู พิระพงษ์ สำราญทรัพย์ สุรสิทธิ์ ดวงสอนยา จุริยรัตน์ สำเร็จประสงค์ และ มาลี อภิเมธีอํารง	72
การสำรวจความสัมพันธ์และความสอดคล้องระหว่างความเข้มข้น ของโปรเจสโตโรนในซีรัมกับการแสดงออกของอาการเป็นสัดในกระบือปลักไทย (Bubalus bubalis) : การศึกษาเบื้องต้น ธัญญาพร ไชยคุณ จันทร์เพ็ญ สุวิมลธีระบุตร ชาญชัย อัศฤกษ์ จิรุตม์ รัตนเทพ มงคล เตชะกำพุ	73
การพัฒนาอุปกรณ์ฉีดยาสัตว์ระยะไกล Development of veterinary injector (Vet remote injection equipment) เฉลิมพงศ์ จิรพฤตศิริ สมพัสตร พูนสุข	80
Poster Presentation	
แกนบูลมาจากรูขี้ผึ้งที่ลำไส้ใหญ่ของสุนัข: case report ทงศ์ศักดิ์ มะมม	82
มะเร็งเต้านมชนิด mixed mammary tumor ในแมว อารยา อนุไพรรวณ ทงศ์ศักดิ์ มะมม	84
การผลิตลูกโคพื้นเมืองไทยและโคนมด้วยเทคนิคการเก็บเซลล์ไข่ ผ่านทางผนังช่องคลอดและการปฏิสนธิในอกร่างกาย Production of Thai Native and Dairy Calves Using OPU and IVF Techniques มาลี อภิเมธีอํารง อนนท์ เทื่องสันเทียะ ณรงค์ เลี้ยงเจริญ, กิรติ อีแจ้ และ จุริยรัตน์ สำเร็จประสงค์	85
Determination of nitrofurans in animal feeds by LC/MS Ion Trap. Wittaya Sungthong Piromporn Tuantumkaew Suttiporn Piriyaon, Wilawan Kotesompat and Sriumporn Ardsri	86
Electron Microscopic Studies on Brachial Glands of the Slow Loris Kazumi Taniguchi Piboon Yutisri Luxsana Prasittichai Suppaluk Kaewkwan Waradee Buddhakosai Dounjit Kanungpean Jitra Sanisuriwong Chatmongkol Pracharoenwanich Anuwat Wattananorrasate Pongsiwa Sotthibandhu Jun Saito Kazuki Yoshioka and Ken-ichiro Mutoh	87

Radiographic interpretation

Cardiothoracic Radiography

อ. สมเกียรติ ห้วยจันทิก

ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สิ่งที่ควรรู้ก่อนการแปลผลของเอก

- Radiographic anatomy
- Positioning
- Phase of respiration
- Technical factor
- View pattern

1. Radiographic positioning

ปกติเราจะใช้ท่า lateral recumbency (right/left) กับท่า Ventrodorsal or dorsoventral สองท่านนี้เป็นมาตรฐานหรือในรายที่ต้องการวิธีการที่ชัดเจนหลายแง่มุมให้ถ่ายทั้ง 4 ท่าก็ได้ ถ้าต้องการดู metastasis ของเนื้องอกไปที่ปอดให้ถ่ายทั้งสองท่า คือ Right and left lateral ซึ่งอาจจะถ่ายนอนหงายหรือนอนคว่ำหรือไม่ก็ได้เหตุผลเนื่องจากถ้ามีวิธีการที่ปอดด้านใดด้านหนึ่งแล้วอาจทำให้มองไม่เห็นได้ถ้าเราถ่ายเพียงท่าเดียว ยกตัวอย่างเช่น ถ้าวิธีการเกิดขึ้นที่ปอดด้านซ้ายแต่เราจัดท่าสัตว์ให้นอนตะแคงซ้าย ปอดทางด้านซ้ายจะแฟบแล้วเราจะมองความแตกต่างระหว่างก้อนผิดปกตินั้นกับเนื้อปอดปกติไม่ออก ส่วนท่า Dorsoventral จะมีประโยชน์ในการตรวจวิธีการที่ Caudal lobar pulmonary arteries. ท่า Decubitus และ erect ventrodorsal projection ใช้ตรวจ fluid ใน pleural space ขาหน้าไม่ควรมาบังช่องอกเพราะอาจจะทำให้เข้าใจผิดว่าปอดกลีบหน้ามีของเหลว (soft tissue opacity) ได้ ในการจัดทำถ่ายทั้งนอนตะแคงข้างหรือนอนหงายหรือคว่ำให้ใช้โฟมรองกระดูก sternum เพื่อไม่ให้เกิด distortion ของหัวใจระวังเรื่องเงามัวจากภาพไหววิธีการแก้ปัญหาให้ลดเวลาที่ตั้งบนเครื่องลง

ให้น้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้

โดยปกติถ้าต้องการดูวิธีการที่หัวใจให้ถ่ายท่านอนตะแคงขวา (right lateral recumbency) เพื่อไม่ให้เงาของหัวใจดูโตกว่าปกติ (ท่านี้อาจจะดูเป็นรูปไข่แต่อีกท่าจะดูกลมกว่าอาจทำให้เข้าใจผิดว่าหัวใจห้องขวาโตได้) ส่วนนอนคว่ำจะดูหัวใจได้ดีกว่านอนหงายเนื่องจากหัวใจจะนิ่งไม่เคลื่อนไหวและอยู่ชิดกับฟิล์มมากกว่า (อยู่ติดฟิล์มภาพจะเหมือนจริงมากที่สุด)

2. Phase of Respiration

- ช่วงหายใจเข้าออกมีผลต่อคุณภาพฟิล์ม ช่วงหายใจออกจะทำให้ช่องอกดูขาวขึ้น (radiopaque) กว่าปกติอาจทำให้เข้าใจผิดว่าเกิด right heart enlargement

- ในสุนัขภาพรังสีของการหายใจเข้าสุดจะดูจาก crura ของกระดูกซี่โครงไปติดกับ body ของ thoracic vertebrae ที่ 11

3. Technical factor

ภาพรังสีช่องอกควรใช้เวลาในการถ่ายสั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้การใช้เวลาน้อยทำให้ต้องเพิ่ม kVp ซึ่งมีผลทำให้ภาพรังสีช่องอกมี longer grey scale และลดการเกิดภาพมัวจากการไหว แนะนำให้ใช้ Grid เมื่อช่องอกมีขนาดมากกว่า 15 cm เพื่อลด scatter rays ยกเว้นในกรณีที่สัตว์มีความหนาแน่นน้อยกว่า 15 cm แต่สัตว์อ้วน มีก้อนในช่องอกขนาดใหญ่หรือมีน้ำในช่องอกก็พิจารณาใช้ได้ ในการล้างฟิล์ม ถ้าเป็น manual processing ควรควบคุมอุณหภูมิ (18-22 °C) กับเวลา (4 นาที) ในเมืองไทยอากาศร้อนอาจจะใช้เวลาเร็วกว่านั้น ในกรณีที่เครื่องเอกซเรย์มีกำลังต่ำให้ใช้ screen กับฟิล์มที่มีความไวสูงเพื่อชดเชยกำลังของ

เครื่อง (ใช้ speed ฟิล์มกับ screen 400 หรือ 800 ก็ได้) ตัวฟิล์ม blue จะมี speed 200-250 แต่ Green จะมี speed มากกว่า 400 ในแนวจะใช้ speed 100-250 ซึ่งจะให้รายละเอียดมากกว่าฟิล์มที่ speed สูงๆ

4. Interpretation

เป็นส่วนสำคัญที่สุด การแปลผลจะสมบูรณ์ก็ต่อเมื่อคุณภาพฟิล์มได้มาตรฐาน สถานที่อ่านฟิล์มจะต้องเป็นห้องมืดที่ไม่ควรมีแสงรบกวนจากภายนอกดับไฟให้สนิทจะเห็นภาพได้ชัดและละเอียดมากขึ้น ควรมีไฟแรงเทียนสูง (> 100 แสงเทียน) เพื่อใช้ดูบริเวณที่มีความดำมากเกินไปหรือควรมีแว่นขยายเพื่อดูรายละเอียดขนาดเล็กมาก วางแผ่นฟิล์มบนตู้ดูฟิล์มให้ถูกต้อง พิจารณาหรือตรวจดูฟิล์มจากบริเวณส่วนนอกเข้ามาด้านใน วิธีการที่เกิดขึ้นให้ข้ามไปก่อนหลังจากดูจนทั่วแล้วค่อยกลับมาตรวจละเอียดอีกทีใช้เวลาในการตรวจเบื้องต้นมองให้ทั่วฟิล์มประมาณ 2-3 นาทีถ้าไม่พบการอะไรที่ชัดเจนให้กลับมาดูซ้ำอีกครั้ง (ดูมากก็ผิดมาก) แต่จะพบว่าถ้าดูกันหลายคนจะช่วยลดความผิดพลาดได้

5. View pattern

- เริ่มแรกให้ตรวจความผิดปกติของระบบ Cardiovascular (ตรวจดูความผิดปกติของหัวใจและหลอดเลือด)
- ต่อมาให้ตรวจ pulmonary parenchyma and major airway (trachea/bronchi)
- ตรวจ Mediastinum structure (L.N. , esophagus)
- ต่อมาตรวจ Pleural space, chest wall and diaphragm
- สุดท้ายตรวจ Extra-thoracic structure

Cardiovascular system

ฝึกทบทวนภาพรังสีปกติของหัวใจและหลอดเลือดในช่องอกของแมวและสุนัข ซึ่งต้องทำความเข้าใจว่าเราใช้อะไรเป็น Criteria ในการบ่งบอกว่าโครงสร้าง

นั้นปกติหรือผิดปกติสิ่งที่กล่าวถึงต่อไปนี้จะใช้เป็นตัววัดเบื้องต้นสำหรับประเมินขนาดของหัวใจและเส้นเลือดทางภาพรังสี

Vertebral Heart Size

• ในสุนัข (Dog)

Long axis : วัดระยะทางระหว่างขอบด้านล่างของ left main caudal lobar bronchus ไปจนถึงภาพเงาของ Cardiac apex

Short axis : วัดส่วนที่กว้างที่สุดของหัวใจในแนวที่วัดตั้งฉาก กับ long axis

ให้บวกค่าที่ได้ ของ Long axis กับ short axis นำไปวัดกับ Cranial end ของ thoracic vertebrae body โดยตั้งต้นที่ T4 ในท่า lateral view. โดยมีค่า Mean เท่ากับ 9.7 หรืออยู่ในช่วง (8.7-10.7) ถ้ามากกว่า เชื่อกันว่าขนาดหัวใจใหญ่เกินไป จากรายงานการทดลองซ้ำของ Lamb et al พบว่า มีข้อจำกัดหลายอย่าง และยังมีค่า sensitivity 76%, specificity 80% เท่านั้นหมายความว่าผลการแปลผลนั้นยังจำเป็นที่จะต้องระมัดระวังอย่างยิ่งเมื่อจะใช้วิธีนี้ สิ่งสำคัญที่ผู้แปลต้องคำนึงถึงมากที่สุด คือ **Breed Variation** ยกตัวอย่างเช่น

- All breeds 8.7 - 10.7
- Boxer 10.0 - 13.2
- Labrador 9.6 - 12.0
- Cavalier king charles spanial 9.6 - 11.6

ข้อดีและข้อเสีย

1. ข้อดี

- สะดวก ง่ายและรวดเร็ว
- จะน่าเชื่อถือก็ต่อเมื่อโรคหัวใจนั้นทำให้เกิด chamber dilation เช่น M.I. , T.I.

2. ข้อเสีย

- ถ้าวิธีการของโรคเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยไม่สามารถบอกได้

- ไม่สามารถตรวจหาวิธีการ concentric hypertrophy (Aortic stenosis)

- การวัดต้องแม่นยำถูกต้องจริง
- ขึ้นอยู่กับลักษณะประจำพันธุ์
- ไม่น่าเชื่อถือสำหรับสุนัขที่แข่งกีฬา
- วิธีการที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยในกรณีของโรค

heart worm diseases และ hypoadrenocorticism ซึ่งพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของ VHS เพียง 30% และ 27% ตามลำดับ

Pulmonary artery diameter

• ในสุนัข (Dog)

1. ในท่า VD or DV

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ pulmonary artery จะต้องไม่ใหญ่กว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ rib ที่ 9 ณ ตำแหน่งที่ตัดกันพอดีของทั้งสอง

2. ในท่า Lateral

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นเลือดแดง right cranial lobar pulmonary artery ที่วิ่งมาติดกับกระดูกซี่โครงที่ 4 ไม่ควรกว้างกว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของกระดูกซี่โครงที่ 4 ตรง proximal end เส้นเลือด artery และ vein จะต้องมีความเท่ากัน

Vertebral Heart size

In Cat

Long axis : วัดระยะทางระหว่างขอบด้านล่างของ left main caudal lobar bronchus ไปจนถึง Cardiac apex

Short axis : วัดส่วนกว้างที่สุดของหัวใจในแนวตั้งฉากกับ long axis

การวัดทั้งหมดเหมือนในสุนัข แต่ค่า VHS นี้จะไม่น่าเชื่อถือน้อยในกรณี Myocardial hypertrophy หรือสาเหตุใดก็ตามที่ทำให้เกิด concentric myocardial hypertrophy

Method of Van Den Broek and Darke

• Cranial to caudal cardiac dimension ของแมวไม่ควรจะกว้างกว่าระยะทางระหว่างขอบด้านหน้าของ Rib ที่ 5 กับขอบด้านท้ายของ Rib ที่ 7

Feline Cardiac Axis and Ascending aorta

• ภาพรังสีของแมวปกติอายุ 10 ปีขึ้นไปจะพบลักษณะ Horizontal alignment of Heart dimension (การเพิ่มการสัมผัสของหัวใจกับกระดูก sternum) และวิธีการของ aorta จะดูบิดเบี้ยวและแคบแควไปมา

Pulmonary Artery Diameter (Cat)

• ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Caudal lobar pulmonary artery ปกติที่วัดได้ตรงตำแหน่ง intercostal space ที่ 9 ไม่ควรเกิน 1.6 เท่าของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของซี่โครงที่ 9 ตรงตำแหน่งที่เส้นเลือดมาติดกับซี่โครงนั้นพอดี

Right side Heart Enlargement

1. Lateral view

การเพิ่ม Cardiosternal contact โดยปกติ ส่วนปลายของ cardiac apex จะสัมผัสกับกระดูกหน้าอก (sternum) ได้ 1-2 sternum เท่านั้น แต่ในกรณีหัวใจห้องขวาโตต้องสัมผัสมากกว่า 3-4 sternum ส่วนปลายของ Cardiac Apex จะเบี่ยงไปทางด้าน Dorso-caudal direction และส่วนปลายของ apex หัวใจจะยกตัวห่างจาก sternum.

2. DV or VD view

ในท่านี้จะพบว่า อาจเห็นขอบเขตของหัวใจห้องขวาส่วน ventricle มากกว่าปกติเป็นผลทำให้เกิดรูปร่างหัวใจเป็นแบบรูปตัว D หัวกลับ (Invert D shape) Apex ของหัวใจจะเบี่ยงไปทางด้านซ้ายของเส้นกลางตัว แต่ต้องระวังในการตรวจ การจัดทำหรือการหายใจ

ของสัตว์มาประกอบด้วย

สาเหตุที่ทำให้เข้าใจผิดว่าหัวใจห้องขวาโต

- การเพิ่มขึ้นของ Cardiosternal contact ที่เกิดจาก Expiratory phase
 - การถ่ายท่า Left lateral recumbency อาจทำให้ apex ของหัวใจเกิดบิดไปทาง Dorsocaudal direction ได้
- โดยทั่วไปเราจะตรวจวิธีการหัวใจห้องขวาโตมักจำเป็นต้องยืนยันจากการถ่ายรังสีจากทั้งท่า lateral และ Dorsoventral หรือ Ventrodorsal view แต่ในกรณีหัวใจห้องซ้ายโตมักจะตรวจดูจากท่า Lateral มากกว่า กรณีที่สัตว์ป่วยด้วยโรคปอดเรื้อรังอาจจะทำให้หัวใจห้องขวาโตได้ (เจอได้บ่อยกว่าถ่ายภาพหัวใจในท่า lateral แล้วเจอว่าหัวใจสัมผัส sternum มากกว่า 3 sternum แต่พอถ่ายท่า V.D. พบว่าปกติแสดงว่าหัวใจห้องขวาปกติ) ทำความเข้าใจด้วยว่าเรามักจะแปลผลว่าหัวใจห้องขวาโตเสมอทั้งที่ปกติก็ได้ วิธีแก้ก็คือ ส่งให้ทำ echocardiography และร่วมกับฟังเสียงหัวใจ

Left Heart Enlargement

- Radiographic sign**
- ภาพความผิดปกติของหัวใจห้องซ้ายมักจะเห็นเมื่อถ่ายภาพรังสีสัตว์ในท่า Lateral view ส่วนท่า VD or DV จะมองเห็นได้ยาก
- Lateral projection**
- Cardiac silhouette is taller (straightened caudal cardiac border)
 - The trachea will be displaced dorsally direction
 - A bulging left atrium will be seen on the dorsocaudal border
 - Displacement of the caudal lobar airway
- Ventrodorsal projection**

- A slight bulge in the two to four o’ clock position of the cardiac silhouette (left auricle)
- An Opaque “mass” separating the caudal lobar airway.

General Heart Enlargement

เมื่อเราเห็นว่าหัวใจโตทั้งซ้ายและขวาเราก็แปลผลว่าเป็นหัวใจโตทั้งหมดก็ได้แต่การแปลผลให้แปลด้วยความระมัดระวังเนื่องจากหัวใจเมื่อเปรียบเทียบกับกันแล้วเราอาจจะพบว่าหัวใจห้องขวาโตอย่างเดียวแต่กินเนื้อที่เข้าไปในบริเวณที่เป็นห้องซ้ายได้แต่เมื่อตรวจด้วย VHS ก็พบว่ามีความมากกว่าปกติ หัวใจโดยรวมดูใหญ่ทั้งหมด แต่จริงๆแล้วหัวใจห้องขวาโตอย่างเดียว ดังนั้นจึงควรตรวจวิธีการแต่ละห้องแยกออกจากกันก่อนร่วมกับการทำ echocardiography แล้วค่อยดูโดยรวมและฟังระมัดระวังอย่างมากในการแปลผลว่าหัวใจโตทั้งหมดถ้าไม่ชัดเจน

ภาพรังสีของหัวใจโตทั้งหมด

- Increased cranial to caudal dimension
- Increased Apico-basilar dimension
- Elevation of post cava, Silhouette usually more spherical.

Cardiomegaly in cat

มักพบในโรค congenital heart diseases, valvular failure, myocardial disease และ pericardial effusion

Criteria สำหรับใช้บ่งชี้ว่าเป็น Cardiomegaly in cat

1. Vertebral heart size (VHS) ประมาณ 95 % ของหัวใจแมวจะมี VHS น้อยกว่า 8.2
2. Rib 5-7 dimension ให้วัดหัวใจในแนว Cranio-caudal dimension ท่า lateral พบว่าควรมีขนาดไม่มากกว่าขนาดระหว่างขอบด้านหน้าของ rib ที่

5 ถึงขอบด้านท้ายของ rib ที่ 7

3. **Cardiothoracic ratio** ขนาดหัวใจปกติเมื่อเทียบกับช่องอกในท่า V.D. ประมาณ 2 : 3 และอาจจะมองเห็นหัวใจเป็นรูป **Valentine shape** ในท่า V.D. แสดงว่าหัวใจโตในแมว

4. อย่าพยายามแยกหัวใจห้องขวาหรือซ้ายโตในแมวจะยากมาก

5. ในแมวที่อายุมากอาจจะพบ หัวใจ จะวางตัวแนบติดกับกระดูก sternum มากกว่าปกติได้และเห็นเส้นเลือด ascending aorta เป็นท่อยาวและชัดเจนไปมาได้ถือว่าปกติ

ความแตกต่างทางภาพรังสีของ Heart failure ในสุนัขและแมว

• ในสุนัข

1. **Right heart failure** เกิดจาก volume overload หรือ pressure overload ผลตามมาทำให้เกิดลักษณะทางภาพรังสีคือ

- Dilation of the caudal vena cava
- Hepatomegaly
- Ascites
- Pleural or pericardial effusion (อาจจะเกิดหรือไม่ก็ได้)

2. Left heart failure

มักจะเห็นความผิดปกติที่ pulmonary vasculature, pulmonary parenchyma ซึ่งในสุนัขจะพบอาการเหล่านี้เป็นมาตรฐานเสมอได้แก่ Pulmonary venous congestion, pulmonary edema (alveolar pattern in perihilar area)

Heart failure in cat

1. Pulmonary edema (significant)

เป็นลักษณะทางภาพรังสีอย่างหนึ่งที่บ่งบอกถึงหัวใจห้องซ้ายล้มเหลว การกระจายตัวมักจะไม

เหมือนในสุนัขที่ขอบพบในบริเวณ hilar area แต่ในแมวเรามักพบ edema กระจายตรงบริเวณตรงกลางปอดด้านท้าย (caudal lobe) นอกจากนี้การพบ pulmonary vascular dilation ก็เป็นลักษณะหนึ่งของ left heart failure ในแมว

2. Pleural effusion

สามารถบ่งบอกว่าเกิด Right heart failure ในแมวได้ (ไม่จำเป็นเสมอไป) effusion อาจเป็น transudate หรือ chylous ก็ได้บางที่อาจจะพบ pericardial effusion ได้แต่การพบ ascites ในช่องท้องอาจจะไม่ได้บ่งบอกถึงหัวใจห้องขวาล้มเหลวได้ในแมวเสมอไป

Vascular pattern of Heart diseases

Normal pulmonary vasculature

เส้น Artery กับ Vein มีความใกล้เคียงกัน Artery จะอยู่ lateral กว่า vein ในท่า VD (DV) ส่วนในท่า lateral เส้นเลือดแดง Artery จะวางอยู่ dorsal กว่า vein ในเส้นเลือดปกติส่วนปลายของ artery and vein จะค่อยๆ หลอมลงเมื่อห่างจากหัวใจความผิดปกติที่เกิดขึ้นที่หลอดเลือดให้ใช้ criteria ที่กล่าวมาแล้วข้างต้นในการประเมิน



Thoracic Radiology

The Chest Wall :

สุนัขและแมวจะมีกระดูกสันหลังส่วนอก 13 อัน 13 คู่ของกระดูกซี่โครงและกระดูกหน้าอก 8 อัน ทำหน้าที่เป็นขอบเขตโครงสร้างของช่องอก โรครของ peri-thoracic tissue จะพบว่ามีการเริ่มต้นขึ้นมาจาก skin, adipose tissue, muscles, ribs และ cartilaginous chondral elements of the ribs ก้อนเนื้อที่เกิดจาก lipoma มักจะเห็นเป็นไขมันที่มีความแตกต่างจาก soft tissue ได้จากภาพรังสี ก้อนผิดปกติที่เกิดขึ้นมาจากกระดูกอ่อนมักจะมีการ calcified

Extra-pleural mass

เป็น mass ที่วางตัวอยู่นอก parietal pleura แต่อยู่ใน chest wall มักไม่ทำให้เกิด pleural effusion และมักมองเห็นได้ยากแต่จะเห็นได้ชัดเมื่อก่อนนี้เกิดการโป่งยื่นเข้าไปหาปอดซึ่งฐานของก้อนเนื้อจะติดกับผนังช่องอก การวินิจฉัยจำเป็นจะต้องถ่ายให้ focus กับก้อนเนื้อนั้นเนื่องจากมันมักจะกลบกลืนไปกับผนังช่องอกและมองเห็นได้ยาก

Disorders of the Diaphragm

The diaphragm ประกอบไปด้วย crura 2 อันซึ่งจะไปรวมกันทางด้านล่างเพื่อกลายเป็น cupula.

The left crus จะคลุมกระเพาะส่วน fundus และส่วน right crus จะคลุม body ของตับ

Pleuro-Peritoneal 'Hernia' :

(Diaphragmatic Hernias)

พบได้บ่อยที่เกิดจาก traumatic origin. เห็นได้ชัดเจนในกรณีพบ อวัยวะภายในช่องท้องอยู่ในช่องอก แต่ในกรณีที่เห็นรอยแตกเล็กๆอาจจะพบ pleural effusion เพียงอย่างเดียว แต่ถ้าไม่พบ effusion ก็อาจจะเห็นเป็นก้อนผิดปกติในช่องอกทำให้เราเข้าใจว่าเป็นเนื้องอกได้ แต่ถ้าเป็นลำไส้ก็อาจจะพบ gas

pattern ในช่องอกได้แต่ถ้าไม่ชัดเจนก็ให้ใช้ Positive GI contrast study ถ้าไม่อย่างนั้นก็ใช้วิธีฉีดโดยฉีด contrast media เข้าไปในช่องท้องแล้วดูว่ามี contrast media ปรากฏอยู่ในช่องอกหรือไม่

Mediastinal Disorders

The mediastinum จะวางตัวส่วนใหญ่ตลอดแนวกลางของช่องอก The cranial mediastinum จะประกอบไปด้วยเส้นเลือดใหญ่ หลอดลมและหลอดอาหารส่วนด้านล่างจะพบรอยพับของเนื้อเยื่อที่ใช้แยกปอดกลีบซ้ายและขวาและขยายต่อไปจนถึง sternum ซึ่งพบว่าบริเวณนี้จะมี internal thoracic artery and vein และมี internal thoracic (sternal) lymph node ตรงตำแหน่งด้านบนของ second sternbrae โดยมี thymus อยู่ใกล้เคียงกันในลูกสุนัข Hilar lymph nodes จะพบกระจายรอบๆหลอดลมที่อยู่บริเวณฐานของหัวใจ (base of heart) Mediastinal ก็เหมือน pleural space ที่มีช่องว่างที่สามารถมีของเหลว เนื้อเยื่อเข้าไปแทรกทำให้บริเวณนี้ขยายตัวได้

Pneumomediastinum :

เป็นลักษณะการพบว่ามีอากาศปรากฏในส่วน Mediastinum ซึ่งอาจจะมาได้จากหลายแหล่งหลายสาเหตุ Pneumomediastinum อาจจะเหนี่ยวนำให้เกิด pneumothorax ตามมา การวินิจฉัยภาพรังสีของ Pneumomediastinum ให้ดูว่าเห็นขอบเขตของหลอดลมหลอดอาหาร เส้นเลือดแดง aorta เส้นเลือดแดงใหญ่ mediastinal และ pre cava ได้อย่างชัดเจนโดยมีอากาศล้อมรอบอวัยวะเหล่านั้น ผลข้างเคียงของโรคนี้คือ Pneumothorax, subcutaneous emphysema และ impaired venous return to the heart

The Pleural Space :

The pleural space ปกติไม่เห็นทางภาพรังสีแต่

จะเห็นได้ชัดเจนในกรณีที่มี fluid, tissue or gas สะสมในส่วนทั้ง parietal and visceral pleurae.

Pneumothorax :

พบว่าเงาของปอดจะไม่ชิดกับผนังช่องอก ช่องว่างระหว่างปลายขอบปอดกับผนังช่องอกจะเป็นสีดำ (radiolucent) หัวใจดูเหมือนลอยสูงกว่ากระดูก sternum ถ้าพบอากาศใน pleural space ปริมาณน้อยอาจจะพบแค่ลึบปอดห่างจากผนังช่องอกเล็กน้อยหรือแทบมองไม่เห็น แนะนำให้ใช้ไฟแรงเทียนสูงส่องดูบริเวณช่องว่างระหว่างปอดกับผนังช่องอกว่าเห็นเส้นเลือดมาเลี้ยงบริเวณนี้หรือไม่ถ้ามีแสดงว่าไม่เป็น

Pleural Effusion :

Radiographic Signs of Pleural Effusions :

1. จะพบลักษณะ homogenous, radiopaque tissue แทรกอยู่ระหว่าง parietal กับ visceral pleura ทำให้เราเห็นขอบเขตของปอดแต่ลึกลับ

2. แต่ถ้าจัดทำให้สัตว์นอนหงาย ventro-dorsal view จะพบของเหลวไปสะสมในส่วน dorsal paraspinal gutters แต่ถ้าจัดท่านอนคว่ำ Dorso-ventral recumbency ของเหลวจะสะสมอยู่ใน ventral sternal gutter.

3. ถ้าปริมาณของเหลวในช่องอกมีมากจะทำให้โครงสร้างภายใน ช่องอกจะแยกได้ยากแต่จะเห็นเฉพาะปอดที่มีอากาศอยู่ภายในเท่านั้นเป็น landmarks.

4. ในสัตว์ที่ mediastinum ยังคงโครงสร้างเดิมได้ดีอยู่ไม่ถูกทำลายเราจะพบว่าของเหลวจะสะสมอยู่ข้างใดข้างหนึ่งเท่านั้น (Unilateral)



Pulmonary radiology

อ. สมเกียรติ ห้วยจันทิก

ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

The Trachea

ปกติ หลอดลมจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากันตลอดทั้งช่วงหายใจเข้าและหายใจออกโดยลักษณะทางกายวิภาคของหลอดลมจะเป็นท่ออากาศที่เริ่มต้นจาก larynx ไปจนถึง tracheal bifurcation จะเห็นในภาพรังสีเป็นลักษณะท่อยาว radiolucency ปกติในสุนัขพันธุ์ Bulldogs and other brachycephalic breeds จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าพันธุ์อื่นๆขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางปกติของหลอดลมเราจะวัดจาก ratio of tracheal diameter to the diameter of the thoracic inlet (TI). สำหรับสุนัขสายพันธุ์ non brachycephalic breeds จะอยู่ในช่วง 0.141-0.256 TI. สำหรับสุนัข non bulldog brachycephalics จะอยู่ในช่วงประมาณ 0.12-0.243 TI.

ส่วนสายพันธุ์ Bulldog จริงๆจะอยู่ในช่วง 0.07-0.21 (โดยปกติจะวัดขนาดได้น้อยกว่า 0.21 แต่มักไม่พบอาการจนเมื่อขนาดน้อยกว่า 0.09 มักจะแสดงอาการให้เห็น)

The tracheal collapse syndrome.

Tracheal lumen จะขยายและแฟบทุกช่วงของการหายใจเข้าและออก.Tracheal collapse จะพบได้บ่อยที่บริเวณ intra thoracic compartment และอาจขยายไปถึง main lobar bronchi.โดยปกติจะต้องถ่ายภาพรังสีทั้งหายใจเข้าและออกในท่า lateral view ส่วนการพบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดลมมีขนาดใหญ่กว่าปกติมักพบได้ในโรค Dynamic airway disease ซึ่งทำให้พังพืดของหลอดลมมีการอ่อนตัวหรือเกิดจาก tracheal chondromalacia

Pulmonary Radiology

Radiographic sign of lung diseases มักจะใช้ pattern of diseases approach. Bronchial, vascular, interstitial and alveolar pattern.

1. Bronchial pattern

Bronchogram sign คือ การหนดตัวของผนัง bronchi ทำให้เราเห็นท่อ bronchi ชัดเจนขึ้นทั้งในแบบ profile or cross section สัตว์ที่มีภาวะนี้จะเห็น secondary and tertiary airway ถ้าเห็น bronchi ในแบบ cross section จะเป็นรูป donut shape ถ้าเห็นเป็น long section จะเป็น Tramlines พยายามตรวจการ donut shape จะหาได้ง่ายกว่ารอยโรคแบบบางรูปไฟซึ่งจะดูได้ยากกว่า บริเวณส่วนต้นของ principle bronchi เราจะไม่นับรวมเป็นวิธีการ tramlines การเห็น bronchial structure อาจจะไม่ใช้ความผิดปกติทางด้านพยาธิสภาพก็ได้เช่นเกิดจากการ calcified ของผนังหลอดลมตามอายุไซ โดยเฉพาะสัตว์สายพันธุ์ chondrodystrophoid breed หรือในรายที่เป็นโรคจริงเช่น hyperadrenocorticism ก็อาจจะเกิดได้ ในทางกลับกันการมองไม่เห็นวิธีการของ bronchial pattern อย่างเพิ่งด่วนตัดสินว่าไม่เป็นโรคเพราะในราย acute onset หรือ short duration airway disease ก็อาจจะไม่เห็นวิธีการก็ได้

Bronchiectasis

เป็นลักษณะของการขยายขนาดของหลอดลม bronchi อาจเห็นเป็นกระเปาะหรือท่อขยาย (Saccular or tubular) โดยปกติ bronchi จะค่อยๆเรียวเล็กลงไปเมื่อไปสู่ปลายปอดแต่ในรายวิธีการนี้จะเห็นการขยายตลอดแนว

2. Alveolar pattern

Air bronchograms คือ ลักษณะของอากาศในท่อทางเดินหายใจจะถูกล้อมรอบด้วย homogenous alveolar opacity. ทำให้ไม่เห็นรายละเอียดของผนังเส้นเลือด ตัวท่อทางเดินหายใจจะเห็น radiolucent เป็นท่อยาวขนานข้างด้วยพื้นสีขาว Alveolar pattern จะมีได้ตั้งแต่ patchy, fluffy, cotton wool-like region of the lung to lobar sign. ซึ่งการพบ pattern นี้มักจะเกิดในโรคที่สามารถสร้าง transudate หรือ exudate ไปสะสมในส่วน alveoli และ หลอดลมขนาดเล็กข้างเคียง และด้วยรูปแบบนี้เราใช้การกระจายตัวของวิการเป็นดัชนีชี้วัดว่ามักเกิดปัญหาจากอะไรเช่น Alveolar pattern ที่พบบริเวณ hilar region. ในสุนัขมักจะเกิดจากโรค left heart failure หรือ Alveolar pattern ที่พบ บริเวณ ventral trachea จะเกิดจาก pneumonia แต่ถ้าเป็นในแมวจะพบว่ามีกระจายรูปแบบนี้ไปทั่วทั้งปอดก็ได้

Alveolar patterns are caused by :

1. Any consolidating pulmonary process
2. Passive replacement of air in small air spaces by bleeding, exudates or transudates
3. Active displacement of air by infiltrative disease processes
4. Atelectasis (collapse of small air spaces)

3. Interstitial pattern

Interstitial lung disease เป็นวิการที่เกิดขึ้นภายในระบบน้ำเหลืองและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เป็นโครงของปอด โรคของปอดที่เกี่ยวข้องกับ interstitial tissue จะทำให้เนื้อปอดโดยรวมจะขาวขึ้น (การที่เนื้อเยื่อปอดดูขาวขึ้นนั้นรูปแบบที่พบได้บ่อยคือ แบบไม่มีรูปแบบ (unstructure) ซึ่งจะแสดงให้เห็นเส้นสานกันเป็นร่างแหกับเป็นแบบมีโครงสร้างชัดเจน (Structure) มักเห็นเป็นก้อน nodule

1. Reticulo-nodular pattern (Unstructure)

ปอดขาวขึ้นเนื่องจาก infiltration หรือ hyperplasia ของ interstitial structure จะเห็น micronodular หรือ linear pattern ทำให้เรามองไม่เห็นหรือเห็น Airway wall และ blood vessel รวมทั้งหัวใจและเนื้อเยื่อปอดใกล้เคียงได้ไม่ชัดเจน (แยกให้ออกจากฟิล์ม underexposure ด้วย)

2. Nodular pattern

2.1 Miliary nodular pattern

- multiple small opaque nodule ที่มีขนาด 1-4 mm in diameter.

2.2 Nodular lesion

- circumscribed circular opacity range 4-40 mm in diameter.

2.3 Mass lesion

- Diameter มากกว่า 40 mm

Nodule ขนาดเล็กกว่า 5 mm จะไม่สามารถเห็นได้ในภาพรังสีถ้าไม่เกาะกลุ่มกัน แต่ถ้า nodule ขนาด 2-3 mm อยู่รวมกันจะเห็นได้เนื่องจาก summation effect



การกำหนดระยะเวลาในการผสมพันธุ์หรือผสมเทียมสุนัข

How to predict the optimal breeding or insemination time in dog

รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.สุดสสร์ ศิริไวยพวงศ์

ควรทำการผสมพันธุ์สุนัขเมื่อใด

การนับวันที่ 9-11 หลังพบเลือดทางช่องคลอด แม่นยาเพียงใด ก่อนที่จะตอบคำถามนี้ ต้องทราบถึงวันที่สุนัขมีการตกไข่และยอมรับการผสมพันธุ์ก่อน

สุนัขจะมีวงจรการเป็นสัดแบบหนึ่งวงจรรอบไม่ต่อเนื่องโดยไม่มีผลของฤดูกาลมาเกี่ยวข้อง และมีการตกไข่แบบเกิดขึ้นได้เองโดยไม่ต้องมีตัวกระตุ้น โดยการตกไข่จะขึ้นกับระดับฮอร์โมนที่เปลี่ยนแปลงไป

วงจรการเป็นสัดในสุนัขประกอบด้วยระยะสำคัญ 4 ระยะ คือ

- ระยะ **Proestrus** (โปรเอสตรัส) ใช้เวลาประมาณ 8-13 วัน
- ระยะ **Estrus** (เอสตรัส) ใช้เวลาประมาณ 4-7 วัน
- ระยะ **Diestrus** (ไดเอสตรัส) ใช้เวลาประมาณ 6-10 สัปดาห์
- ระยะ **Anestrus** (แอนเอสตรัส) ใช้เวลาประมาณ 15 สัปดาห์

โปรเอสตรัส เป็นระยะที่สุนัขเริ่มเข้าสู่วงจรการเป็นสัด รังไข่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลง มีการเจริญของ Follicle ขนาดต่างๆ โดยจะมีระยะเวลาประมาณ 8-13 วัน หรือโดยเฉลี่ย 9 วัน เซลล์เยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ส่วนต่างๆ จะมีการเจริญแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น อวัยวะเพศจะบวมแดงขยายใหญ่ขึ้นมาก อาจพบเลือดหยดได้ตั้งแต่วันแรกหรือไม่ก็ได้ จะเริ่มพบว่าสุนัขถ่ายปัสสาวะบ่อยขึ้น มีท่าทางแปลกไปขณะถ่ายปัสสาวะ สุนัขจะมีท่าทางกระวนกระวาย สนใจสุนัขตัวอื่น และมีสุนัขอื่นมาสนใจ แต่จะยังไม่ยอมรับการผสมพันธุ์ ยกเว้นในสุนัขบางตัวอาจยอมให้ตัวผู้ขึ้นผสมได้

เนื่องจากพฤติกรรมที่ได้เรียนรู้จากการผสมพันธุ์ครั้งก่อนๆ แต่จะพบได้น้อย

เอสตรัส เป็นระยะที่สุนัขจะแสดงอาการเป็นสัดเต็มที่ ใช้เวลาเฉลี่ยประมาณ 4-7 วัน อวัยวะเพศก็จะค่อยๆ หย่นและลดขนาดลง เลือดจากช่องคลอดอาจลดลงจนหมด หรือในบางตัวอาจยังพบอยู่ได้ สุนัขเพศเมียจะยินยอมรับการผสม ถ้าลองกดหลังดูสุนัขจะยินยอม และเบนหางไปข้างใดข้างหนึ่ง ซึ่งแสดงถึงความพร้อมที่จะยอมรับการผสมพันธุ์ สุนัขส่วนใหญ่จะมีการบีบตัวของกล้ามเนื้อบริเวณเหนือช่องคลอด เพื่อยกอวัยวะเพศขึ้นมาในตำแหน่งที่เหมาะสมที่จะถูกผสมพันธุ์ได้ง่าย

ระยะที่จะทำการผสมสุนัขคือกลางระยะเอสตรัส ซึ่งมีความผันแปรกันไปในสุนัขแต่ละตัว

ไดเอสตรัส เป็นระยะที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ซึ่งสร้างมาจากรังไข่ มีระยะเวลาประมาณ 6-10 สัปดาห์ เฉลี่ย 57-65 วัน หลังจากนั้นระดับของฮอร์โมนนี้ก็ค่อยๆ ลดลง ซึ่งในระยะเดียวกันนี้ ระดับของฮอร์โมนโปรแลกติน ซึ่งมีหน้าที่สร้างน้ำนม จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนทั้งสองนี้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของร่างกายและพฤติกรรมบางอย่างของสุนัขด้วย ในระยะนี้เยื่อบุมดลูกจะเจริญอย่างเต็มที่ มีการหลั่งสารและน้ำเมือกต่างๆ ออกมาให้ความชุ่มชื้น เพื่อเตรียมพร้อมและช่วยในการฝังตัวของตัวอ่อน แม้ในสุนัขที่ไม่ได้รับการผสม ระยะนี้ก็จะมีการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพนี้ เช่นเดียวกับในสุนัขตั้งท้อง เต้านมก็จะมี การขยายตัว โดยเฉพาะคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 จากด้าน

ท้ายจะเจริญมาก เมื่อถึงระยะท้ายของไดเอสตรัส ในสุนัขตั้งท้องจะมีการคลอด แต่ถ้าสุนัขไม่ตั้งท้อง เต้านมก็จะลดขนาดลงอย่างรวดเร็ว รวมทั้งเยื่อบุต่างๆ ภายในมดลูกก็จะกลับคืนสู่สภาพปกติ สุนัขบางตัวในระยะนี้อาจยังยอมรับการผสมพันธุ์ได้ แต่ส่วนใหญ่มักจะไม่นิยมรับการผสมพันธุ์ ในสุนัขตั้งท้องจะแสดงพฤติกรรมการเป็นแม่ในช่วงท้ายของระยะนี้

ส่วนในสุนัขที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ หรือไม่ตั้งท้องในบางตัวอาจไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน ดูสภาพเหมือนสุนัขไม่ได้ตั้งท้องทั่วไป แต่บางส่วนจะแสดงอาการคล้ายสุนัขตั้งท้องทุกประการ ทางร่างกายและมีพฤติกรรมแสดงออกซึ่งความเป็นแม่เมื่อใกล้คลอด เช่น การขุดคุ้ย สร้างรัง ทำท่าคล้ายจะคลอด

แอนเอสตรัส เป็นระยะที่ถือเป็นระยะพักตัวของระบบสืบพันธุ์ รวมทั้งอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งหมด สุนัขจะอยู่ในสภาพปกติ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของร่างกาย ระดับฮอร์โมนหรือพฤติกรรม เซลเยื่อบุช่องคลอดก็จะเป็นพวกเซลล์ขนาดเล็ก ระยะเวลาจะไม่แน่นอน ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น พันธุ์สัตว์ สภาพสัตว์การเลี้ยงดู รวมทั้งสภาวะแวดล้อมต่างๆ แต่โดยเฉลี่ยจะใช้เวลาประมาณ 15 สัปดาห์

จะเห็นได้ว่า ในวงจรการเป็นสัดของสุนัขนั้น จะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ขึ้นมากมายในระยะต่างๆ และมีความแตกต่างไปในสุนัขแต่ละตัว บางตัวอาจมีระยะโปรเอสตรัส สั้นหรือยาวแตกต่างจากค่าเฉลี่ย ซึ่งทำให้วันที่ทำการผสมพันธุ์แตกต่างไปจากสุนัขตัวอื่นด้วย

ในทางการแพทย์ การตรวจวันผสม และประมาณวันตกไข่ นั้น จะดูจากพฤติกรรมสุนัข เซลเยื่อบุช่องคลอดที่เปลี่ยนแปลง และระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่เพิ่มสูงขึ้น สุนัขควรถูกผสมพันธุ์เมื่อยืนหนึ่งยอมรับการผสม ยกอวัยวะเพศ เซลเยื่อบุช่องคลอดเปลี่ยนเป็นเซลล์เหลี่ยมๆ มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมากกว่า 2-4

นาโนกรัม/มิลลิลิตร จึงจะเริ่มทำการผสมพันธุ์ได้

ระยะเวลาที่เหมาะสมของสุนัขเพศเมีย

ปกติสุนัขทั่วไปจะเกิด LH surge ในวันที่ 10 หลังจากสุนัขมีอาการ bloody discharge หรือ เริ่มเห็นอวัยวะเพศบวมแดง และจะตกไข่ในวันที่ 12 จากนั้นไข่จะพัฒนาตัวจนเหมาะที่จะผสมมากที่สุดในวันที่ 14 และเป็นวันที่จะสังเกตเห็นอาการยืนนิ่ง ยกและเบี่ยงหาง ยกอวัยวะเพศขึ้น อวัยวะเพศบวมน้ำและนึ่ม ถ้าจะทำการผสม 2 ครั้ง ควรผสมในวันที่ 12 และ 14 หรือจะทำการผสม 3 ครั้ง ควรผสมในวันที่ 11, 13 และ 15 แต่อาจจะมีสุนัขบางตัวที่ตกไข่เร็วกว่าปกติหรือช้ากว่าปกติ สุนัขบางตัวไม่แสดงอาการเป็นสัด หรือแสดงอาการน้อยกว่าปกติ ทำให้เรานิฉัยเวลาตกไข่ได้ไม่ถูกต้อง มีวิธีการตรวจสอบวิธีอื่น เช่น serum progesterone, ELISA และ vaginal smear เมื่อเราตรวจพบ cornified cell มากกว่า 60% เราควรตรวจ serum progesterone เราจะพบว่าระดับของ progesterone เพิ่มขึ้นถึง 1-2 ng/ml ในวันที่เกิด LH surge และวันที่ตกไข่ ระดับ progesterone จะสูงถึง 4-10 ng/ml และจะสูงถึง 8-20 ng/ml ตลอดช่วงการเป็นสัด

อย่างไรก็ดี วันที่ทำการผสมพันธุ์จะขึ้นกับคุณภาพน้ำเชื้อของสุนัขพ่อพันธุ์ด้วยสุนัขพ่อพันธุ์ที่ดีนั้น นอกจากลักษณะที่สวยามถูกต้องตามสายพันธุ์แล้ว สุขภาพร่างกายทั่วไปจะต้องแข็งแรง รวมทั้งสภาพผิวหนังและขน จะต้องดี นอกจากนั้นจะต้องมีคุณภาพน้ำเชื้ออสุจิที่ดี โดยทำการตรวจอย่างสม่ำเสมอ อย่างน้อย ปีละ 4-6 ครั้ง

การตรวจน้ำเชื้อนั้นสัตวแพทย์จะทำการรีดเก็บ ในขณะที่สุนัขรู้สึกผ่อนคลาย ไม่หวาดกลัว ตื่นเต้น หรือระแวง ขณะรีดน้ำเชื้อนั้น สุนัขบางตัวอาจต้องใช้ตัวเมียที่เป็นสัดล่อ แต่สุนัขบางตัวไม่จำเป็นต้องมีตัวล่อก็สามารถรีดได้

น้ำเชื้อที่หลังส่วนแรก จะมีลักษณะใสส่วนที่ 2

มีลักษณะสีขาวขุ่น คือ ส่วนที่มีสีจางมาก และส่วนสุดท้ายจะเริ่มใสอีก คือ น้ำจากต่อมลูกหมาก ซึ่งไม่จำเป็นต้องเก็บทั้งหมดของส่วนที่ 3 นี้ อาจเก็บเฉพาะส่วนต้นๆ ของส่วนที่ 3 คือประมาณ 2-5 มิลลิลิตร เนื่องจากปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นในส่วนนี้จะทำให้ความเข้มข้นลดลง

ลักษณะของน้ำเชื้อ

- ปริมาตรส่วนแรกและสองรวมกันควรประมาณ 2-8 มิลลิลิตร

- สี ควรเป็นสีขาว สีน้ำตาล จนถึง ขาวครีม บางครั้งอาจเป็น ขาวใส ถ้ารวมน้ำเชื้อส่วนที่ 3 ไว้มากๆ

- น้ำเชื้อจะเป็นกรดเล็กน้อย pH ควรอยู่ระหว่าง 6.3-6.7

- ดูการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ซึ่งควรมากกว่า 70% ขึ้นไป

- ดูความเข้มข้น ซึ่งจำนวนตัวสูกิจต่อการหลั่งน้ำเชื้อ 1 ครั้งในสุนัขปกติ ควรประมาณ 100-2,000 ล้านตัว ขึ้นกับขนาดสุนัข

- ดูกายรูป หรือลักษณะรูปร่าง น้ำเชื้อคุณภาพดีควรมีลักษณะปกติมากกว่า 70-80 %

ทั้งนี้คุณภาพของน้ำเชื้อสุนัขขึ้นกับปัจจัยอีกหลายประการ เช่น พันธุ์สุนัข ความแตกต่างระหว่างสุนัขแต่ละตัว เวลาในการรีดน้ำเชื้อ วิธีการรีดน้ำเชื้อ จำนวนครั้งหรือความถี่ของการรีดน้ำเชื้อ สภาพแวดล้อม และอื่น ๆ

ถ้าจะผสมสุนัขตามธรรมชาติ หรือ การผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อสดที่มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ปกติ เมื่อตรวจสุนัขเพศเมียแล้วพบว่าเซลล์เยื่อช่องคลอดเปลี่ยนเป็น cornified cell มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมากกว่า 2-4 นาโนกรัม/มิลลิลิตร นั้นยอมรับการผสม ยกเว้นระยะเพศ ก็จะเริ่มผสมพันธุ์ได้

แต่ถ้าคุณภาพน้ำเชื้ออยู่ในเกณฑ์ด้อยลงมา เช่น ในการใช้น้ำเชื้อสดคุณภาพต่ำ (แต่สุนัขพ่อพันธุ์เป็นที่ต้องการ) หรือใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง สุนัขเพศเมียควรมีเซลล์เยื่อช่องคลอดเป็น cornified cell ทั้งหมด และมีระดับ progesterone อยู่ระหว่าง 8-20 ng/ml ซึ่งเป็นช่วงที่ไข่พร้อมปฏิสนธิ



การปฏิสนธิในร่างกาย

In Vitro Fertilization : IVF

มาลี อภิเมธีรัง

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

บทนำ

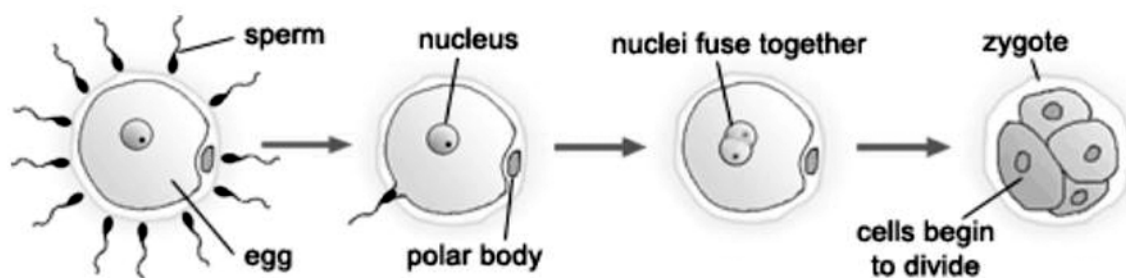
ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การปฏิสนธิในธรรมชาติระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย ที่เรียกว่า เซลล์ไข่หรือโอโอไซต์ (oocyte) และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ที่เรียกว่า เซลล์สperm หรือตัวสperm (spermatozoa) จะเกิดภายใน reproductive tract ในร่างกายของสัตว์เพศเมีย โดยตำแหน่งของการปฏิสนธิจะอยู่ภายในท่อไข่ ช่วงเวลาที่เรียกว่าเกิดการปฏิสนธิขึ้น หมายถึง เวลาที่ตัวสperm เข้าไปในเซลล์ไข่ได้แล้ว ซึ่งนิวเคลียสของสperm จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นโปรนิวเคลียส ขณะเดียวกันนิวเคลียสของไข่ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือจากการขับ second polar body ออกจากไซโทพลาซึม ก็จะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นโปรนิวเคลียส จากนั้นจะเกิดการตัวรวมกันของโปรนิวเคลียสทั้งสอง (fusion) เป็นนิวเคลียสเดี่ยว จากนั้นกระบวนการแบ่งตัวหรือแบ่งเซลล์จึงเริ่มขึ้น (รูปที่ 1) ส่วนการปฏิสนธิภายนอกร่างกายเป็นการนำเซลล์ไข่มาปฏิสนธิกับเซลล์สperm ในหลอดทดลอง โดยมีการเตรียมความพร้อมของทั้งเซลล์ไข่และเซลล์สperm รวมถึงการปรับสภาพแวดล้อมที่เลียนแบบกับที่เกิดในธรรมชาติ เพื่อให้เกิดการปฏิสนธิขึ้นได้ และพัฒนาเป็นตัวอ่อนต่อไป

การปฏิสนธิภายนอกร่างกายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีรายงานความสำเร็จที่ให้ผลการตั้งท้องเป็นครั้งแรก

ในกระต่ายโดย Chang ในปี ค.ศ.1959 ต่อมาก็มีรายงานความสำเร็จในหนูเมาส์และหนูแรท (อ้างถึงโดย Gordon, 1994) สำหรับในโค มีรายงานความสำเร็จได้ลูกเกิดครั้งแรกในปี ค.ศ.1982 (Brackett et al., 1982) โดยการใช้เซลล์ไข่ที่เจริญถึงขั้นปฏิสนธิในร่างกายของแม่โคนำมาผสมกับตัวสperm ในหลอดทดลอง ต่อมาในปี ค.ศ.1988 มีรายงานลูกโคเกิดจากกระบวนการปฏิสนธิภายนอกร่างกายทั้งหมดเป็นครั้งแรก (Goto et al., 1988) นอกจากนี้ยังมีรายงานความสำเร็จในการใช้เทคนิคการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในสัตว์อื่นๆ อีกหลายชนิดซึ่งสามารถศึกษาได้ในวารสารทางวิชาการทั้งในและต่างประเทศ ในที่นี้จะเน้นการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในโคซึ่งมีการศึกษากันมากที่สุด

การใช้เทคนิคการปฏิสนธิภายนอกร่างกายร่วมกับการเก็บเซลล์ไข่ผ่านทางผนังช่องคลอด

ปัจจุบันเทคโนโลยีเกี่ยวกับการผลิตลูกโคจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ได้มีการพัฒนาไปอย่างมาก การเก็บเซลล์ไข่เพื่อนำมาปฏิสนธิกับเซลล์สperm ในห้องทดลอง โดยการเจาะผ่านทางช่องคลอดร่วมกับการใช้เครื่องอัลตราซาวด์ (ultrasound-guided transvaginal ovum pick-up : OPU) ได้เริ่มดำเนินการในสัตว์ เพื่อ



รูปที่ 1 กระบวนการปฏิสนธิ

ลดการบาดเจ็บและอันตรายสำหรับสัตว์ อีกทั้งยังทำ
ซ้ำได้หลายครั้ง (Pieterse et al., 1988) หลังจากนั้น
นั้นก็มีการพัฒนาการเก็บร่วมกับการผลิตตัวอ่อนโดย
การปฏิสนธินอกร่างกาย (Looney et al., 1994; Boni
et al., 1996; Reis et al., 2002) และได้นำมา
ประยุกต์ใช้ในโคพื้นเมืองประจำถิ่น (Bos indicus)
แต่ไม่ได้รายงานการผลิตตัวอ่อนถึงระยะที่นำไปย้าย
ฝากได้ (Manik et al., 2003) ในประเทศไทย มีการ
ศึกษาไม่มากนักเกี่ยวกับการผลิตตัวอ่อนโดยใช้ไข่ที่
เก็บจากโคชนะมีชีวิตและการปฏิสนธินอกร่างกาย
(Techakumphu et al., 1996) แต่มีรายงานในกระบือ
(Kittiyant et al., 1995; Pavasuthipaisit et al.,
1995)

การเก็บเซลล์ไข่โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ มีข้อ
ด้อย ได้แก่ เครื่องมือมีราคาแพง ประกอบด้วย
อุปกรณ์หลายชิ้น ทำให้ใช้งานไม่สะดวก นอกจากนี้
หัวโพรบยังมีขนาดใหญ่ ไม่สามารถใช้กับโคพื้น
เมืองประจำถิ่น เช่น พันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ของไทย โคขาว
ลำพูน ซึ่งมักมีขนาดเล็กกว่าพันธุ์เนื้อหรือหมจากต่าง
ประเทศ อนุชา และคณะ (2545) ได้รายงานความ
สำเร็จในการเก็บโอโอไซต์โคนมผ่านทางช่องคลอด
โดยไม่ใช้เครื่องอัลตราซาวด์ พบว่ามีความสะดวก ใช้ง
่ายและใช้เวลาเพียง 15 นาทีต่อตัว ในส่วนของกรม
ปศุสัตว์ โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
ได้ทดลองนำเทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกายร่วมกับการ
เก็บเซลล์ไข่ผ่านทางช่องคลอดโดยไม่ใช้เครื่อง
อัลตราซาวด์ในโคพื้นเมือง (ณรงค์ และคณะ, 2547)
และสามารถผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ได้ (สุรจิต
และคณะ, 2547) โดยล่าสุดสามารถผลิตลูกโคพื้น
เมืองได้ (ข้อมูลกำลังเตรียมเผยแพร่)

ประโยชน์ของการปฏิสนธินอกร่างกาย

ระยะเริ่มแรก จุดประสงค์หลักของการศึกษาวิจัย
การปฏิสนธินอกร่างกายในโคใน ก็คือ เพื่อผลิตตัว
อ่อนให้มีราคาถูก (Gordon, 1994) เมื่อเทียบกับ

การผลิตตัวอ่อนโดยการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ (Super-
ovulation) และเก็บตัวอ่อนโดยการชะจากปีกมดลูก
(Embryo flushing/collection) ของสัตว์ ในการย้าย
ฝากตัวอ่อน (Embryo Transfer : ET) เนื่องจากใน
การปฏิสนธินอกร่างกาย สามารถเจาะเก็บเซลล์ไข่
จากรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งจะได้เซลล์ไข่จำนวน
มาก อันหมายถึงจะมีโอกาสผลิตตัวอ่อนได้จำนวน
มากขึ้น ต่อมาได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ
เพิ่มมากขึ้น รวมถึงนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคอื่นๆ
ทำให้การปฏิสนธินอกร่างกายหรือกระบวนการหรือ
ส่วนของกระบวนการปฏิสนธินอกร่างกายเป็นเทคนิค
พื้นฐานของเทคโนโลยีการสืบพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ การฉีด
เซลล์ตัวอสุจิเข้าไปในไข่ (Intracytoplasmic sperm
injection : ICSI) การฉีดยีน/ดีเอ็นเอ (Gene/DNA
injection) การนำการปฏิสนธินอกร่างกายไปใช้
ประโยชน์ด้านต่างๆ ได้แก่

1. เพิ่มจำนวนตัวอ่อน/ลูกสัตว์ในราคาถูก
2. ใช้ร่วมกับเทคนิคการเก็บเซลล์ไข่ผ่านทาง
ผนังช่องคลอด (Ovum pick-up and in vitro embryo
production : OPU-IVP) เพื่อผลิตตัวอ่อนอย่างไม
จำกัดจากแม่สัตว์พันธุ์ดีซึ่งสามารถผลิตตัวอ่อนเพื่อ
การค้าได้
3. ใช้ทดสอบความสามารถการปฏิสนธิของ
เซลล์อสุจิ เป็นการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อวิธีหนึ่ง
4. ใช้แก้ปัญหาสัตว์ที่มีพันธุกรรมดี ให้ผลผลิตดี
เช่นโคมีประวัติการให้ผลผลิตน้ำนมสูง แต่มีปัญหา
ผสมติดยาก อันเนื่องมาจากมดลูกคด หรือท่อนำไข่ตีบ
หรืออายุมาก จนตั้งท้องเองไม่ได้ อย่างไรก็ตามรังไข่
ยังทำงานปกติ
5. อนุรักษ์พันธุกรรมสัตว์ที่มีจำนวนจำกัด

กระบวนการผลิตตัวอ่อนโดยการปฏิสนธินอก ร่างกาย

กระบวนการผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอก
ร่างกาย ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ 7 ขั้นตอน ดังนี้

1. การเก็บเซลล์ไข่จากรังไข่ ทำได้หลายวิธี เช่น การเจาะจากรังไข่โดยใช้เข็มฉีดยา ขนาด G 18-19 การผ่าฟอลลิเคิลบนผิวรังไข่ (dissect intact follicle) การใช้ใบมีดโกนกรีดบนผิวรังไข่ (slicing) และการเจาะเก็บผ่านทางผนังช่องคลอด จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเซลล์ไข่คุณภาพดี

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ ในหลอดทดลอง (in vitro maturation) ใช้เวลา 20-24 ชั่วโมง มีปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญพร้อมปฏิสนธิหลายประการ

3. การเตรียมเซลล์อสุจิ ให้อยู่ในสภาวะพร้อมที่จะปฏิสนธิ (capacitation of sperm) กับเซลล์ไข่ในหลอดทดลอง มีหลายวิธี ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย ได้แก่ วิธี swim-up วิธี BSA/Percoll density gradients เป็นการคัดกรองเซลล์อสุจิ เฉพาะที่แข็งแรงและสมบูรณ์

4. การปฏิสนธิ (in vitro fertilization) เป็นการนำเซลล์ไข่ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิมาเลี้ยงร่วมกันกับเซลล์อสุจิที่เตรียมในข้อ 3. ระยะเวลาการเลี้ยงร่วมกันตั้งแต่ 6-18 ชั่วโมง ขึ้นกับชนิดของ

5. การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธิในอกร่างกาย (embryo culture) ในโคจะเลี้ยงตัวอ่อนจนถึงระยะมอรูลาหรือบลาสโตซิสต์ โดยใช้เวลา 6-7 วัน จึงนำไปฝากในมดลูกของโคตัวรับ สำหรับระบบการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน มี 2 ระบบ คือ เลี้ยงภายในร่างกายสัตว์ (in vivo culture) หมายถึงเลี้ยงในท้องนำไข่หรือในไข่ไก่ และในหลอดทดลอง (in vitro culture) ในปัจจุบันนิยมใช้การเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยมีการใช้น้ำยาเลี้ยงชนิดต่างๆและระบบการเลี้ยงที่มีหรือไม่มีเซลล์ร่วม (co-culture system)

6. การเก็บรักษาตัวอ่อนส่วนใหญ่จะใช้วิธีแช่แข็งเพื่อเก็บไว้ในรูปตัวอ่อนแช่แข็ง การแช่แข็งตัวอ่อนทำได้หลายวิธี ได้แก่ การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ ส่วนใหญ่จะใช้เครื่องแช่แข็งแบบมีโปรแกรมการลดอุณหภูมิแบบอัตโนมัติ การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว

7. การฝากตัวอ่อนไปยังตัวรับ เมื่อตัวอ่อนเจริญถึงระยะมอรูลาหรือบลาสโตซิสต์ หากมีตัวรับพร้อม คือ หลังเป็นสัดขึ้นหนึ่ง 7 วัน ก็สามารถนำตัวอ่อนไปฝากแบบตัวอ่อนสดได้ หรือฝากตัวอ่อนแช่แข็ง

วิธีตรวจสอบการปฏิสนธิ

การตรวจสอบการปฏิสนธิ เป็นการตรวจว่ามีเซลล์อสุจิสามารถเจาะผ่านเข้าไปในไข่ได้หรือไม่ ตลอดจนตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลักษณะของนิวเคลียสของทั้งไข่และอสุจิ การปฏิบัติงานด้านการปฏิสนธิ นอกอกร่างกาย จำเป็นต้องมีการตรวจสอบการปฏิสนธิเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการที่ใช้ในการดำเนินงาน การตรวจสอบมีหลายวิธี ได้แก่

1. วิธีย้อมสี เพื่อตรวจสอบการเกิดโปรนิวเคลียสของเซลล์อสุจิและเซลล์ไข่ภายในไซโทพลาซึม การย้อมสีสามารถดำเนินการได้หลังการนำเซลล์อสุจิผสมกับเซลล์ไข่ 18-19 ชั่วโมง ส่วนวิธีย้อมสีมีหลายวิธี ได้แก่ การย้อมแบบ rapid staining method (Byun et al., 1991) การย้อมด้วย aceto-orcein ก็เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งสองวิธีใช้ค่าใช้จ่ายไม่แพง อีกวิธีหนึ่งคือ การย้อมด้วยสารที่เป็น DNA probe ได้แก่ propidium iodide (PI), DAPI, Hoechst 33258 โดยต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ ที่ติดอุปกรณ์ฟลูออเรสเซนส์

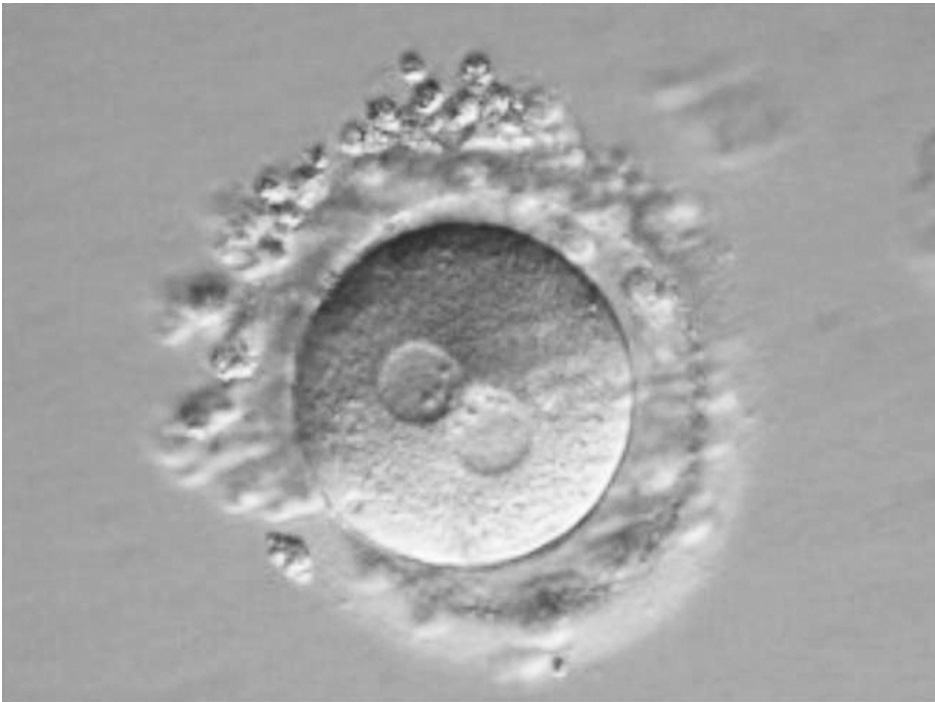
2. ตรวจสอบอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน การตรวจการแบ่งตัวของตัวอ่อนที่ระยะ 2-4 เซลล์สามารถตรวจสอบได้หลังจากเลี้ยงตัวอ่อน 42 ชั่วโมงหลังการผสมกับตัวอสุจิ (Gordon, 1994) วิธีนี้ไม่ต้องทำให้ตัวอ่อนตายเหมือนวิธีแรก ทำให้ไม่สูญเสียตัวอ่อน อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจสอบรายละเอียดการปฏิสนธิได้

3. ตรวจสอบจำนวนเซลล์อสุจิที่ติดในเปลือก (zona pellucida) ของเซลล์ไข่ โดยอาศัยหลักการหลังจากเซลล์อสุจิตัวแรกสามารถเจาะผ่านเข้าไปเปลือกแล้ว จะเกิด “zona reaction” เพื่อไม่ให้สpermตัว

อื่นๆ เข้าไปได้ ดังนั้นเซลล์สุจิที่เหลืจะติดอยู่ที่เปลือกสามารถสังเกตได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

4. การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีการทำงานแบบ Differential interference contrast (DIC) วิธีนี้ใช้ได้ในการณีเซลล์ไข่ชนิดที่มีไขมันภายในไซโทพลาซึมน้อย เช่น ไข่ของกระต่าย หนู คน (รูปที่ 2)

เนื่องจากขั้นตอนการปฏิบัติงานปฏิสนธิในร่างกายประกอบด้วยหลายขั้นตอน ซึ่งต้องอาศัยความละเอียดอ่อน ะมัดระวังในทุกขั้นตอน อีกทั้งยังต้องคำนึงถึงหลักวิชาการ Gordon (1994) ได้รวบรวมปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อความสำเร็จในการดำเนินงานปฏิสนธิในร่างกาย สรุปได้ดังนี้



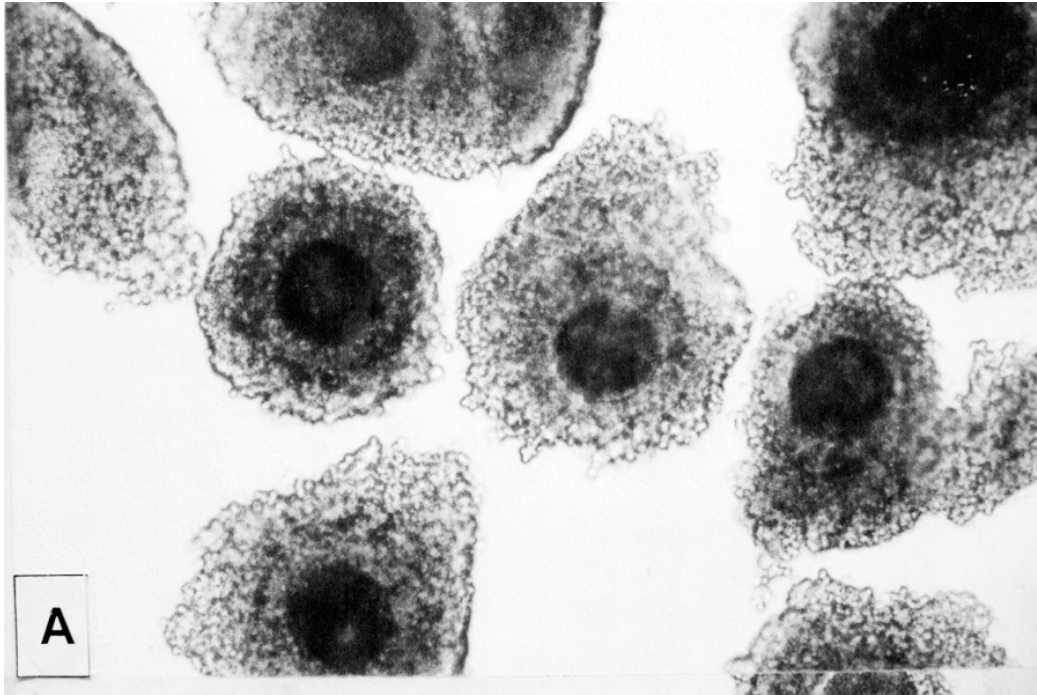
รูปที่ 2 โพรนิวเคลียสของไข่และอสุจิของคนที่สังเกตได้จากกล้อง DIC

นอกจากวิธีดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีวิธีการใหม่ๆ ที่ทันสมัย สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ผลรวดเร็ว

ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการปฏิบัติงานปฏิสนธิในร่างกาย

แม้ว่าจะมีการศึกษาการปฏิสนธิในร่างกายมากกว่า 40 ปีและมีรายงานความสำเร็จจากหลายห้องปฏิบัติการ แต่ก็ยังมีอีกหลายแห่งที่มีอัตราความสำเร็จต่ำ หรือไม่สามารถผลิตตัวอ่อนได้ แม้ว่าจะใช้วิธีการเดียวกับรายงานของต่างประเทศก็ตาม ทั้งนี้

1. คุณภาพของเซลล์ไข่ เซลล์ไข่ที่มีคุณภาพดีที่ถูกคัดเลือกเข้ากระบวนการปฏิสนธิในร่างกายจะให้อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสต์มากกว่าเซลล์ไข่ที่มีคุณภาพด้อยกว่า เซลล์ไข่ที่มีคุณภาพดี คือ เซลล์ไข่ที่มีชั้นของเซลล์คิวมูลัสเกาะติดกันอย่างหนาแน่นหลายชั้น (compact multilayered cumulus) ไซโทพลาซึมและเซลล์คิวมูลัสมีสีนวลสม่ำเสมอตัวอย่างเซลล์ไข่คุณภาพดี ดังรูปที่ 3
2. ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง รวมถึงชนิดของน้ำยาเพาะ



รูปที่ 3 เซลล์ไข่คุณภาพดี มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้น

เลี้ยงส่วนประกอบของสารเคมี ฮอร์โมน ชนิดและขนาดของสารที่เติม อุณหภูมิ ระยะเวลา ตลอดจนสภาวะบรรยากาศภายในตู้เพาะเลี้ยง

3. คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ในการปฏิสนธิต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพหลังละลายตามมาตรฐานของน้ำเชื้อแช่แข็งที่สามารถนำไปผสมเทียมแบบปกติได้

4. วิธีการเตรียมน้ำเชื้อก่อนนำไปปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ การเตรียมน้ำเชื้อมีหลายวิธี ได้แก่ swim-up technique, Glass-wool filtration, BSA/Percoll density gradients รวมถึงความเข้มข้นของตัวสุจิและปริมาณของน้ำยาที่มีตัวสุจิ ที่จะนำไปผสมกับน้ำยาที่ใช้ปฏิสนธิ ซึ่งมีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ โดยแต่ละห้องปฏิบัติการควรมีการตรวจสอบว่าวิธีการใดเหมาะสมกับชนิดของน้ำเชื้อที่สุด ให้ผลการปฏิสนธิสูงสุด และให้ผลอัตราการเจริญของตัวอ่อนไปถึงระยะบลาสโตซิสต์ที่ดีที่สุด

5. ระบบการเลี้ยงในช่วงปฏิสนธิ หมายถึงการเลี้ยงเซลล์ไข่ที่พร้อมปฏิสนธิร่วมกับตัวสุจิ มีทั้งแบบ

เลี้ยงใน microdrop เลี้ยงในหลุมของถาดพลาสติก การเลี้ยงร่วมกับเซลล์อื่นๆ อุณหภูมิ ระยะเวลาการเลี้ยง สภาพแวดล้อมในตู้เพาะเลี้ยง รวมถึงชนิดน้ำยาที่ใช้สำหรับการปฏิสนธิ

6. ระบบการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธิ การเลี้ยงตัวอ่อนในท่อนำไข่ เป็นวิธีที่นิยมใช้ในช่วงเวลาที่เริ่มมีการศึกษาการปฏิสนธิ โดยท่อนำไข่ที่ใช้มาจากกระต่าย แกะ โค โดยมีการใช้ท่อนำไข่ต่างชนิดกับตัวอ่อน เช่น ใช้ท่อนำไข่แกะมาเลี้ยงตัวอ่อนโค ซึ่งพบว่าให้ผลดี อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สะดวกนัก จึงมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองโดยมีเซลล์ที่เลี้ยงหรือเลี้ยงร่วมกับเซลล์ชนิดต่างๆ ต่อมามีการศึกษาการใช้น้ำยาเลี้ยงชนิดที่ไม่ต้องมีเซลล์พี่เลี้ยง ระบบการเพาะเลี้ยงมีผลอย่างมากต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนไปถึงระยะบลาสโตซิสต์ ตลอดจนการเจริญของฟิตัส (fetus) ในท้องแม่

**ตัวอย่างการนำเทคนิคการปฏิสนธิอกร่างกาย
ร่วมกับการเก็บเซลล์ไข่ (IVF-OPU) ไปใช้ผลิตลูก
โคนมและโคพื้นเมือง**

กรมปศุสัตว์ โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการ
ผลิตปศุสัตว์ ได้นำเทคนิคการปฏิสนธิอกร่างกาย
ร่วมกับการเก็บเซลล์ไข่ไปใช้ผลิตลูกโคนมและโคพื้น
เมืองได้สำเร็จ โดยดำเนินงานร่วมกับคณะสัตว
แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ การเก็บเซลล์
ไข่ได้นำวิธีการเก็บโดยไม่ใช้เครื่องอัลตราซาวด์ ไข่ที่
เก็บได้จะถูกนำไปเข้ากระบวนการปฏิสนธิยังห้อง
ปฏิบัติการที่อยู่ห่างออกไป 1.5 ชั่วโมง เมื่อได้ตัวอ่อน
ระยะบลาสโตซิสต์ จึงนำกลับไปย้ายฝากยังโคตัวรับ จาก
การดำเนินงานที่ผ่านมา มีลูกโคนมเกิด 7 ตัว (รูปที่ 4
A) และโคพื้นเมืองเกิด 2 ตัว (รูปที่ 4 B) จากผลการ
ดำเนินงานนี้ แสดงว่า สามารถนำเทคนิคเทคนิคการ
ปฏิสนธิอกร่างกายร่วมกับการเก็บเซลล์ไข่ไปใช้ผลิต

ลูกโคนมและโคพื้นเมืองได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อ
การวางแผนการปศุสัตว์ ทั้งในแง่การผลิตลูกจากแม่พันธุ์ดี
ได้เพิ่มขึ้นจากแม่ตัวหนึ่งๆ และในแง่การอนุรักษ์และ
กระจายสัตว์พันธุ์ดีที่มีจำนวนจำกัด

สรุป

การดำเนินงานด้านการปฏิสนธิอกร่างกาย
ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อความสำเร็จ และ
ต้องปรับปรุงให้ทันสมัยตลอดเวลา เทคนิคการ
ปฏิสนธิอกร่างกาย ได้ถูกพัฒนามาจนสามารถนำ
มาใช้ผลิตลูกสัตว์ได้อย่างกว้างขวางในต่างประเทศ
และในเมืองไทยก็สามารถนำมาใช้อย่างได้ผลแล้ว แต่
ยังไม่กว้างขวางนัก หากมีการนำมาใช้อย่างจริงจัง
ขึ้นทั้งภาครัฐและเอกชน จะทำให้การพัฒนาพันธุ์และ
การปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงการเพิ่มจำนวนสัตว์พันธุ์ดี
เป็นไปได้รวดเร็วยิ่งขึ้น



A : ลูกโคนม



B : ลูกโคพื้นเมือง

รูปที่ 4 ลูกโคอายุ 1 สัปดาห์ ที่เกิดจากการปฏิสนธิอกร่างกาย
และเซลล์ไข่ที่เก็บผ่านทางผนังช่องคลอด A : ลูกโคนม B : ลูกโคพื้นเมือง

เอกสารอ้างอิง

- ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท์ เทืองสันเทียะ บุญชู ศรีสุข และ มาลี อภิเมธีอํารง. 2547. การเก็บโอโอไซต์โคพื้นเมืองภาคใต้ผ่านทางผนังช่องคลอดโดยไม่ใช้อัลตราซาวนด์. ประชุมสัมมนาวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 19, 26-30 พฤษภาคม 2547. พิพิธภัณฑ์การเกษตรเฉลิมพระเกียรติ ปทุมธานี. ซีดีรอม.
- สุรจิต ทองสอดแสง ณรงค์ เลี้ยงเจริญ และ มาลี อภิเมธีอํารง. 2547. การผลิตตัวอ่อนโคพื้นเมืองไทยภาคใต้ (โคชน) โดยการเก็บไข่อ่อนจากรังไข่ผ่านทางผนังช่องคลอดและการปฏิสนธิในอกร่างกาย. วารสารสัตวแพทย์. 14 (3) : 167-178.
- อนุชา สนธนวนศ์ สุวิชัย โรจน์เสถียร อภิชาติ โอพารัตนชัย จตุรงค์ จริยะนวิรัช กิรติ ธิแจ้ และ จุริยรัตน์ สำเร็จประสงค์. 2545. การเก็บเซลล์ไข่โคผ่านทางผนังช่องคลอดโดยไม่ใช้อัลตราซาวนด์. ประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์. ครั้งที่ 28, 9-11 ตุลาคม 2545. กรุงเทพมหานคร.
- Boni, S.R., Roviello, S. and Zicarelli, L. 1996. Repeated ovum pick-up in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 46: 899-909.
- Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F. and Dressel, M.A. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27: 147-158.
- Byun, T.H., Lee, S.H. and Song, H.B. 1991. Development of a rapid staining method for nucleus of the oocyte from domestic animals. *Korean J. Anim. Sci.* 33(1): 25-31.
- Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. CAB International, Oxon, UK: 640 pp.
- Goto, K., Kajihara, Y., Kasaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. and Ogawa, K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryo derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 83: 753-758.
- Kitiyant, Y., Tocharus, C., Areekijseeree, M. and Pavasuthipaisit, K. 1995. Swamp buffalo oocytes from transvaginal ultrasound-guided aspiration fertilized and co-cultured in vitro with bovine oviductal epithelial cells. *Theriogenology* 43 (1): 250.
- Looney, C.R., Lindsey, B.R., Gonseth, C.L. and Johnson, D.L. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*. 41: 67-72.
- Manik, R.S., Singla, S.K. and Palta, P. 2003. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guide aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 76: 155-161.
- Pavasuthipaisit, K., Holyoak, R.G., Tochalus, C. and Kitiyanant, Y. 1995. Repeated transvaginal follicular aspiration in swamp buffalo. *Theriogenology* 43: 295 (Abstract).
- Pieterse, M.C., Kappen, K.A., Kruip, Th.A.M. and Taveme, M.A.M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751-762.
- Reis, A., Staines, M.E., Watt, R.G., Dolman, D.F. and McEvoy, T.G. 2002. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 72: 137-151.
- Techakumphu, M., Tantasuparak, W. and Singlor, J. 1996. Successful blastocyst production from Native Thai calf oocytes after in vitro fertilization. *Thai J. Vet. Med.* 26: 169-176.

เทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนโคด้วยการโคลนนิ่ง

ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

โทร: 044-224 244 โทรสาร: 044-224 154 อีเมล: rangsun@g.su.ac.th

ประวัติของการโคลนนิ่ง

โดยปกติการสืบพันธุ์ของคนหรือสัตว์ต้องอาศัยการผสมกันระหว่างตัวผู้กับตัวเมีย หลังจากผสมกันแล้วจะแบ่งตัวเจริญพัฒนาเป็นตัวอ่อน แล้วคลอดออกมาเป็นสัตว์หรือคน ซึ่งจะมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนพ่อและแม่อย่างละครึ่ง แต่การโคลนนิ่งจะต่างจากการสืบพันธุ์ตามธรรมชาติ เพราะการโคลนนิ่งเป็นกระบวนการการสร้างสิ่งมีชีวิตให้มีลักษณะทางกายภาพและพันธุกรรมเหมือนกันโดยไม่ใช้เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (อสุจิ) และเพศเมีย (ไข่) มาผสมกัน แต่จะใช้เซลล์จากสัตว์ที่เราต้องการโคลนนิ่งมาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบแล้วฉีดเข้าไปในไข่ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้วทำให้ลูกที่ได้มีลักษณะของเพศและพันธุ์เหมือนกับเซลล์ต้นแบบทุกประการ

การโคลนนิ่งเริ่มครั้งแรกในปี พ.ศ. 2495 โดยโทมัส คิง ได้ทำการทดลองโคลนนิ่งตัวอ่อนกบโดยนำเอานิวเคลียสของตัวอ่อนกบออกมา และนำไปใส่แทนนิวเคลียสของไข่กบที่ยังไม่ปฏิสนธิ ผลปรากฏว่าไข่ดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตขึ้นเป็นลูกอ๊อด ต่อมาโรเบิร์ต บริกเกส และโทมัส คิง ได้พัฒนาเทคนิคที่เรียกว่า การย้ายฝากนิวเคลียส (Nuclear Transfer) ขึ้นมาและวิธีนี้ยังเป็นที่นิยมใช้อยู่จนถึงปัจจุบัน

ในช่วงแรกๆของการโคลนนิ่งนิยมใช้เซลล์ของตัวอ่อนที่เกิดจากการปฏิสนธิตามธรรมชาติเป็นเซลล์ต้นแบบ มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ทำการทดลองโคลนนิ่ง โดยใช้เซลล์ตัวอ่อนของสัตว์ชนิดต่างๆ เป็นเซลล์ต้นแบบ เช่น แกะ โค หนู เป็นต้น

ต่อมาได้มีการพยายามใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบเพื่อโคลนนิ่ง ซึ่งผู้ที่บุกเบิกได้แก่ ดร.เอียน วิลมุต และคณะ และประสบความสำเร็จ

เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2540 ดร. วิลมุต ได้ทำการโคลนนิ่งแกะโดยใช้เซลล์เต้านมของแกะโตเต็มวัยเป็นเซลล์ต้นแบบสำเร็จเป็นรายแรกของโลก จากนั้นเป็นต้นมานักวิทยาศาสตร์ ทั่วโลกได้ศึกษาวิจัยการนำเซลล์จากส่วนต่างๆของร่างกายสัตว์อีกหลายชนิดมาทำเป็นเซลล์ต้นแบบ จนประสบความสำเร็จดัง แสดงในตารางที่ 1

ในที่นี้จะกล่าวถึงขั้นตอนและวิธีการทำโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมเซลล์ต้นแบบ
2. การเตรียมไข่
3. การฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าไปในไข่
4. การเชื่อมเซลล์ต้นแบบให้ติดกับไข่
5. การกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัว
6. การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว
7. การย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งสู่แม่ตัวรับ

ซึ่งจะกล่าวถึงขั้นตอนต่างๆ โดยละเอียด ดังต่อไปนี้

1. การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

ทำการคัดเลือกโคพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตนมหรือเนื้อที่ดี เพื่อนำมาเป็นตัวต้นแบบในการโคลนนิ่ง แล้วทำการเก็บตัวอย่างใบหูโดยทำความสะอาดใบหูโคแล้วใช้มีดตัดที่ใบหูให้เป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร หรือใช้เครื่องเจาะรูที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4-5 มม. หลังจากนั้นนำชิ้นใบหูที่ได้เก็บไว้ในน้ำยา แล้วนำกลับเข้าห้องปฏิบัติการ

เมื่อถึงห้องปฏิบัติการนำชิ้นใบหูที่ได้มาทำการ

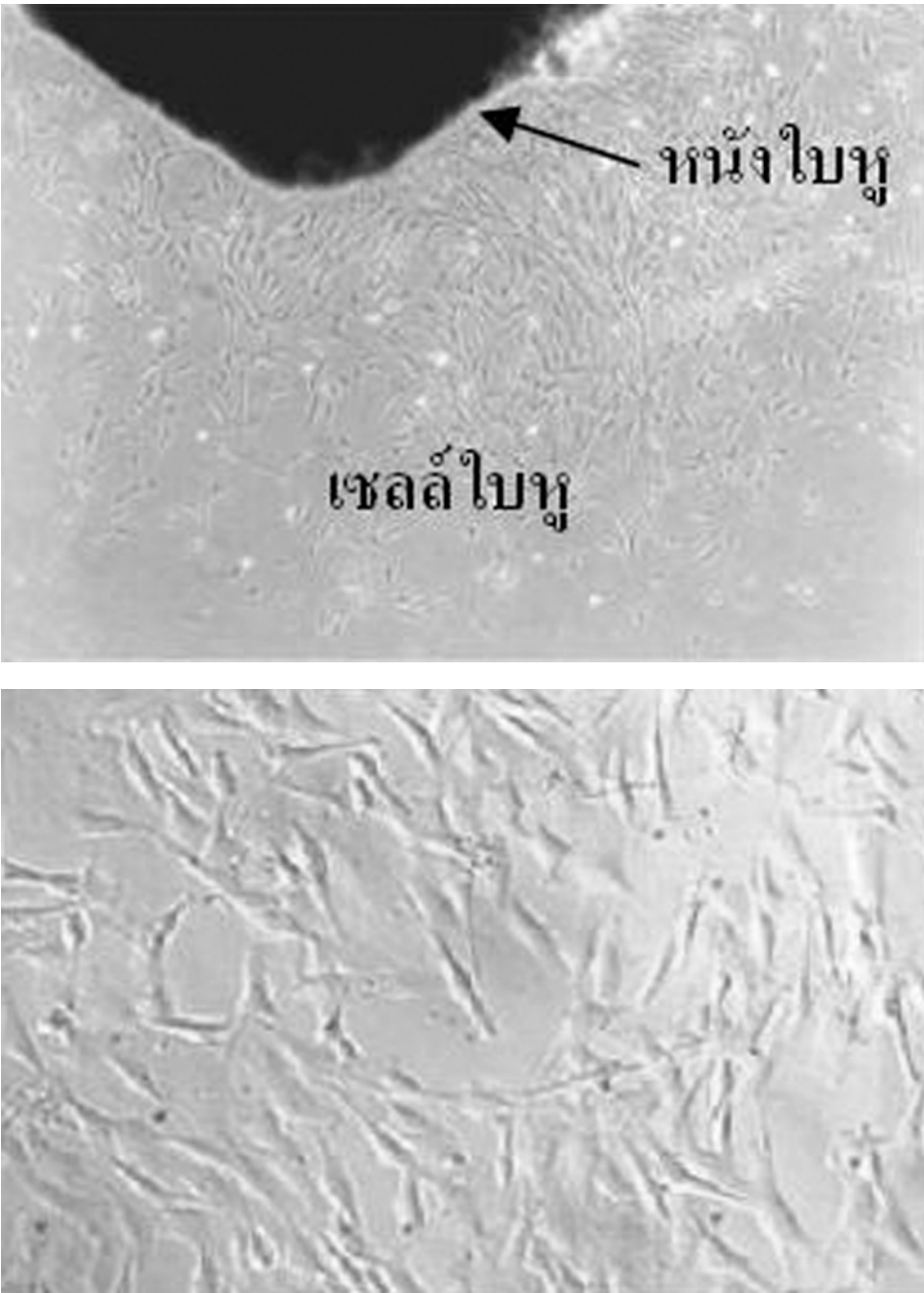
ตารางที่ 1 ผลสำเร็จการโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

ชนิดสัตว์	ชนิดเซลล์ต้นแบบ	ลูกสัตว์คลอด	ปี พ.ศ.
แกะ	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	+	2540
แกะ	เซลล์เต้านมสัตว์โตเต็มวัย	+	2540
โค	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	+	2541
หนู	เซลล์คิ้วมูลัส	+	2541
โค	เซลล์คิ้วมูลัส	+	2541
โค	เซลล์บุท่อหน้าไข่	+	2541
สุกร	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	-	2542
กระบือ	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	-	2542
กระบือ	เซลล์แกรนูโลซา	-	2543
สุกร	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	+	2543
สุกร	เซลล์แกรนูโลซา	-	2543
สุกร	เซลล์ไขหวู	-	2543
สุกร	เซลล์กล้ามเนื้อ	-	2543
แมว	เซลล์คิ้วมูลัส	+	2545
ล่อ	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	+	2546
ม้า	เซลล์ผิวหนังโตเต็มวัย	+	2546
กวาง	เซลล์ผิวหนังโตเต็มวัย	+	2546

หมายเหตุ + หมายถึง มีลูกเกิด และ - หมายถึง ไม่มีลูกเกิด

โกนขนทั้งด้านบนและด้านล่างออกให้หมดก่อน หลังจากนั้นจึงลอกหนังออกจากกระดูกอ่อน แล้วตัดส่วนที่เป็นหนังให้มีขนาดประมาณ 1x1 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลานาน 4 วันจึงนำเซลล์ที่เลี้ยงออกมาส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูการเจริญเติบโตและเปลี่ยนน้ำยาที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน ลักษณะของเซลล์ที่เจริญขึ้นมาใหม่จะเป็นรูปกระสวยเรียงติดกัน

(รูปที่ 1) เมื่อได้เซลล์จำนวนหนึ่งแล้วจะทำการเพิ่มปริมาณให้ได้เซลล์จำนวนมากขึ้น แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในรูปเซลล์แช่แข็ง เมื่อนำเซลล์ที่ได้มาใช้ ต้องทำการแยกให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ก่อนโดยใช้น้ำยอย่ แล้วคัดเลือกเซลล์ที่มีรูปร่างปกติ กลม และมีขนาดเล็กหรือใหญ่เกินไป เพื่อใช้เป็นเซลล์ต้นแบบสำหรับใช้ฉีดเข้าไปในไข่



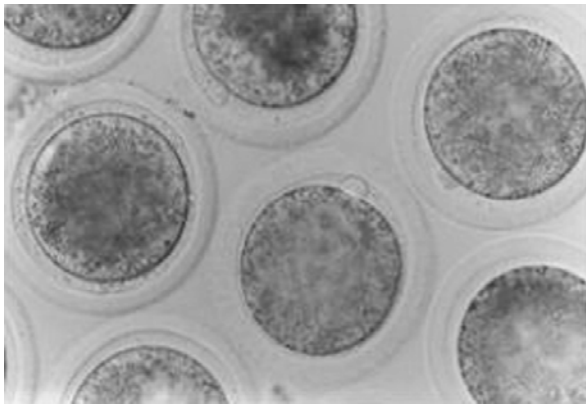
รูปที่ 1 แสดงการเจริญของเซลล์ออกจากชิ้นใบหู (สีดำ) ที่จะใช้เป็นเซลล์ต้นแบบ

2. การเตรียมไข่

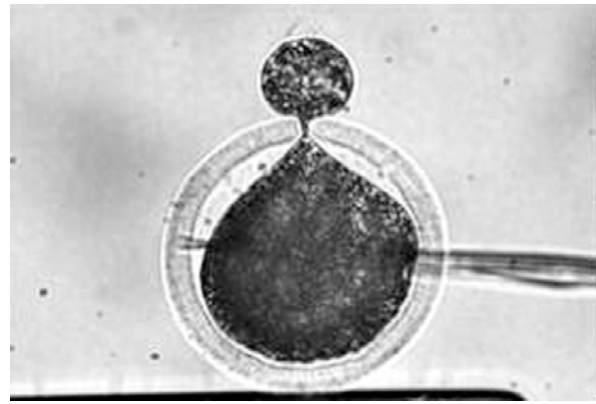
ทำการเก็บรังไข่มาจากโรงฆ่าสัตว์ โดยเก็บไว้ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิห้องระหว่างนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วตัดไข่อ่อนที่อยู่ในถุงไข่ขนาด 3-7 มม. ออกมาด้วยเข็มฉีดยาขนาด 21G ที่ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ซีซี (รูปที่ 2 ก) จากนั้นนำไข่ที่ได้มาเลี้ยงในน้ำยา

สำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วประมาณ 19 - 20 ชั่วโมง เพื่อให้ไข่มีการเจริญต่อจนเป็นไข่สุก (รูปที่ 2 ข) เมื่อได้ไข่สุกแล้วนำมาทำการดูดนิวเคลียสออกไป (รูปที่ 2 ค) ไข่ที่ได้จะเป็นไข่ที่พร้อมสำหรับการโคลนนิ่ง

(ก)



(ข)



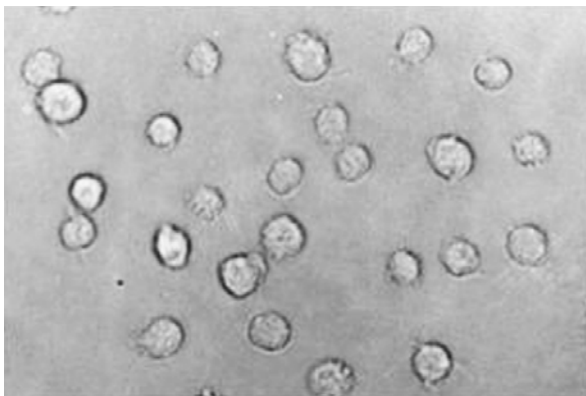
(ค)

- รูปที่ 2 (ก) แสดงการดูดไข่โคจากรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์
(ข) แสดงไข่โคหลังจากที่เลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 19-20 ชั่วโมง
(ค) แสดงการดูดนิวเคลียสของไข่ออก

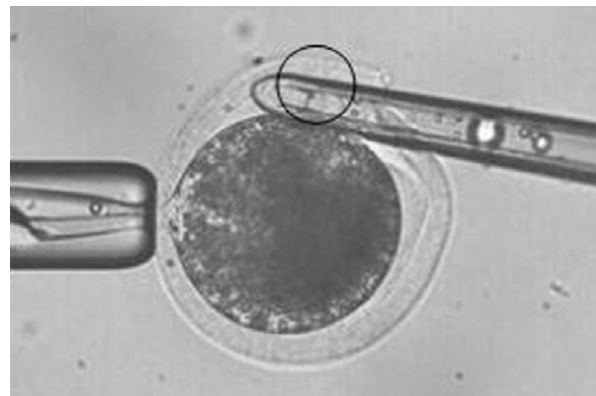
3. การฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าไปในไข่

หลังจากที่ได้ไข่ที่ดูดนิวเคลียสออก และเซลล์ต้นแบบที่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ (รูปที่ 3 ก) แล้วก็ทำการฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์เข้าไปในไข่ โดยการ

ดูดเซลล์ต้นแบบเข้ามาไว้ในหลอดแก้ว แล้วสอดผ่านผนังไข่เข้าไป จากนั้นฉีดปล่อยเซลล์ต้นแบบให้เข้าไปอยู่ชิดกับไข่มากที่สุด (รูปที่ 3 ข)



(ก)

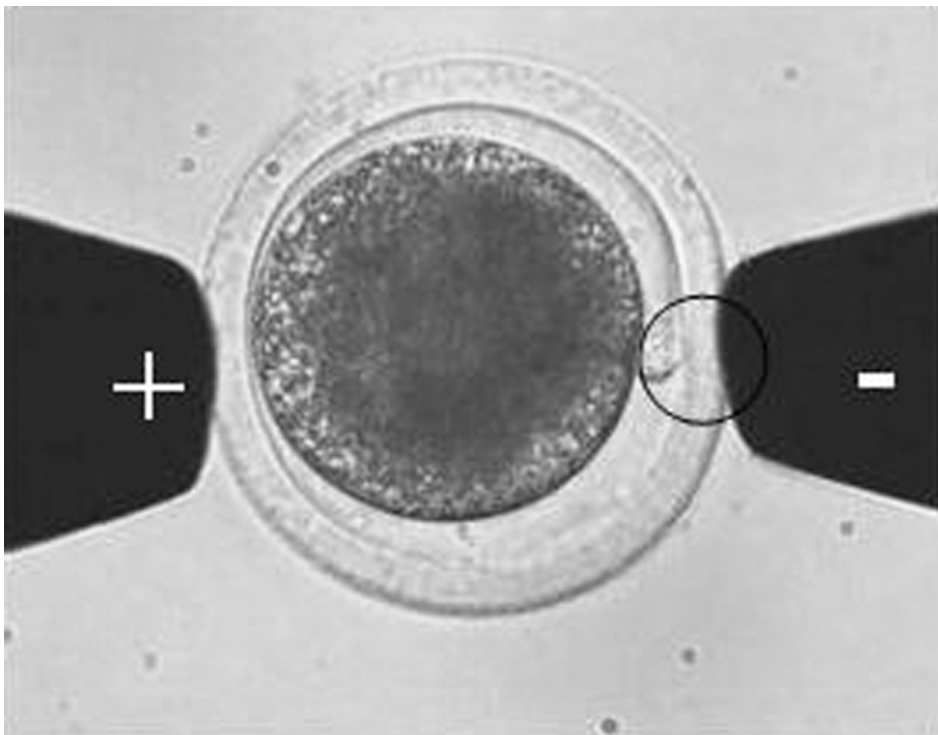


(ข)

- รูปที่ 3 (ก) แสดงเซลล์ต้นแบบที่ถูกย่อยออกเป็นเซลล์เดี่ยวด้วยน้ำย่อย
(ข) แสดงการฉีดเซลล์ต้นแบบ (วงกลม) เข้าสู่ไข่ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้ว

4. การเชื่อมเซลล์ต้นแบบกับไข่

หลังจากฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าไปในไข่แล้ว จำเป็นต้องมีการเชื่อมเซลล์ต้นแบบและไข่ให้ติดกันด้วยกระแสไฟฟ้า เพื่อเป็นการหลอมเซลล์ต้นแบบให้เข้ามาอยู่ภายในเซลล์ของไข่ โดยจัดให้เซลล์ต้นแบบอยู่ในแนวเดียวกับอิเล็กโทรดจ่ายกระแสไฟฟ้าทั้ง 2 ด้าน (รูปที่ 4) แล้วจ่ายกระแสไฟฟ้า 30 V 15 μ sec 2 ครั้ง เพื่อเชื่อมเซลล์ให้ติดกัน



รูปที่ 4 แสดงการเชื่อมเซลล์ต้นแบบ (วงกลม) กับไข่ด้วยกระแสไฟฟ้า

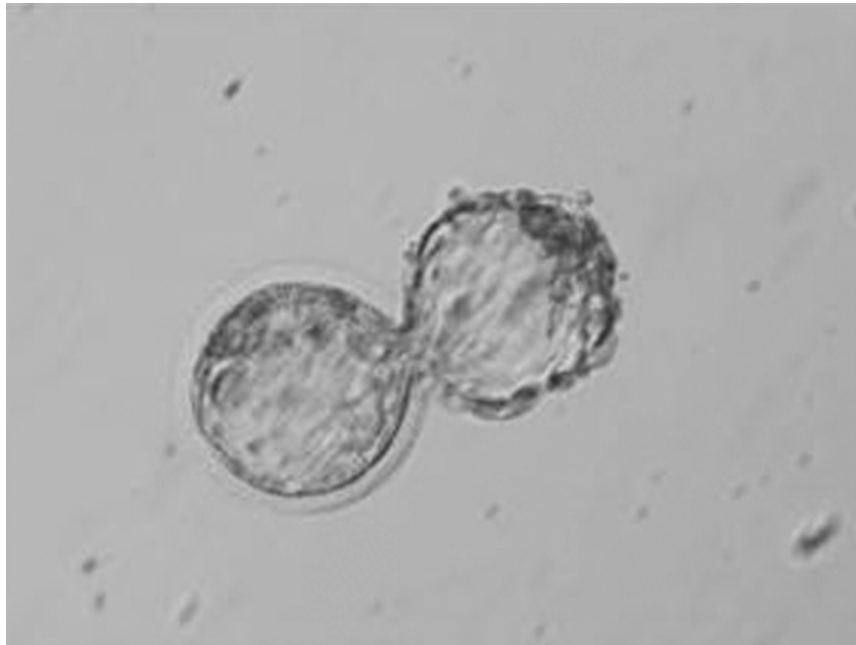
5. การกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัว

เมื่อเซลล์ต้นแบบเชื่อมติดกับไข่แล้ว ขั้นตอนต่อไปที่ต้องทำคือการกระตุ้นไข่ให้เกิดการแบ่งตัว โดยการนำไปไว้ในน้ำยาที่มี 7% Ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงต่อในน้ำยาที่มี 10 μ g/ml cycloheximide และ 1.25 μ g/ml cytochalasin D ในตู้บอดอุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

6. การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นให้แบ่งตัวแล้ว มาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 0.1% BSA ในตู้บอดที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% O₂, CO₂, N₂ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการคัดเลือก ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 0.3% BSA ในตู้บอดที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air นาน 5 วัน โดยเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่

ของโคเนื่องจากเซลล์บุท่อนำไข่สามารถหลั่งสารที่สนับสนุนการเจริญของตัวอ่อน โดยรวมแล้วจะทำการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วเป็นนาน 7 วัน ซึ่งจะได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสที่พร้อมฝังตัวในมดลูก (รูปที่ 5) หลังจากนั้นจึงทำการย้ายฝากตัวอ่อนไปยังมดลูกแม่โคตัวรับ



รูปที่ 5 แสดงตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซิสหลังจากเลี้ยงในหลอดแก้ว 7 วัน

7. การย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งให้โคตัวรับ

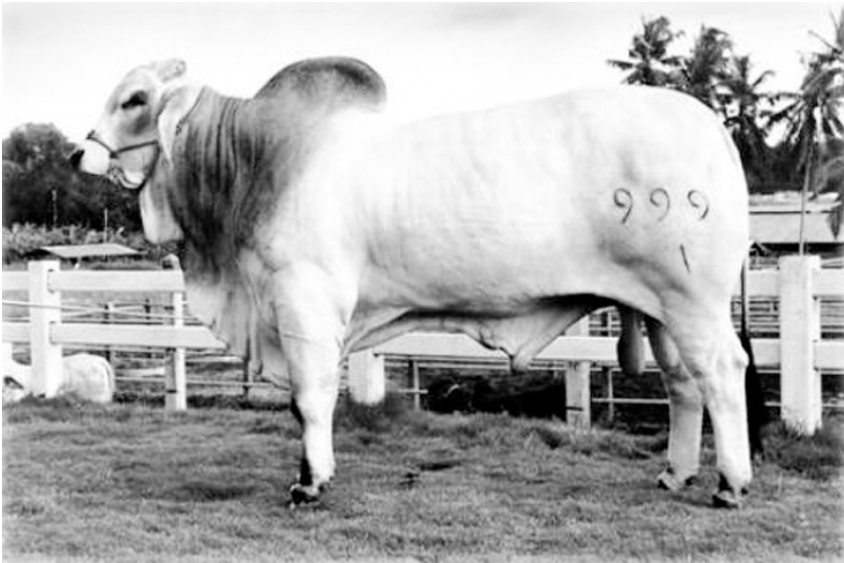
ทำการคัดเลือกแม่โคตัวรับที่มีความเหมาะสม โดยคัดเลือกเอาเฉพาะแม่โคที่มีระบบสืบพันธุ์ที่ดีคลอดลูกง่าย มาใช้เป็นแม่โคตัวรับ จากนั้นสังเกตการเป็นสัดเมื่อแม่โคตัวรับเป็นสัดได้ 7 วัน จึงทำการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งเข้าสู่ปีกมดลูกของแม่โค อาจฝากได้ 1 - 2 ตัวอ่อนต่อ 1 แม่โคตัวรับ จากนั้นนับไปอีก 60 วันจึงสังเกตการตั้งท้องของแม่โค อัตราการตั้งท้องของตัวอ่อนโคลนนิ่งในระยะ 2 เดือนแรกจะมีประมาณ 30-40% และอัตราการตั้งท้องจนครบกำหนดคลอดมีประมาณ 10%

ความสำเร็จในประเทศไทย

จากกระบวนการโคลนนิ่งที่กล่าวมา มีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากนำเทคนิคเหล่านี้ไปใช้ในการโคลนนิ่งสัตว์ต่างๆจนประสบความสำเร็จอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในประเทศไทยสามารถสร้างลูกโคโคลนนิ่งได้แล้ว 17 ตัว โดยใช้กระบวนการข้างต้นคือ ลูกโคพันธุ์แบรกกัสเพศเมีย ชื่อ อิง เกิดเมื่อ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นลูกโคโคลนนิ่งตัวแรกของเอเชียอาคเนย์

และเป็นตัวที่ 6 ของโลก นอกจากนี้ยังมีลูกโคพันธุ์บราห์มันเทาเพศเมีย ชื่อ นิโคล เกิดมา ทั้งอิงและนิโคลเป็นผลงานของ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย และคณะ ขณะปฏิบัติงานอยู่ที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้แล้วยังมีการผลิตลูกโคโคลนนิ่งพันธุ์บราห์มันเทาเพศผู้ ชื่อ ตูมตาม (รูปที่ 6 ก.) โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบของตูมตามเกิดมาถึง 7 ตัว เกิดมาระหว่างวันที่ 25 ตุลาคม 2546 ถึง 7 มกราคม 2547 (รูปที่ 6 ข.) นอกจากนี้ยังมี ลูกโคพันธุ์บราห์มันแดงเพศเมีย (จากโคต้นแบบหมายเลข SK 180) เกิดมา 5 ตัว และ ลูกโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน (จากโคต้นแบบหมายเลข 346) เกิดมา 3 ตัว และลูกโคโคลนนิ่งพันธุ์ชาวลำพูนเพศผู้ชื่อชาวมงคล (จากโคต้นแบบชื่อดอยอินทนนท์) เกิดมาเป็นรายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 21 มีนาคม 2550 (รูปที่ 7) ซึ่งเป็นผลงานของ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย และคณะ จากศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(ก)



(ข)



รูปที่ 6 (ก) โคต้นแบบตุ้มตามพันธุ์ราห์มันเทาเพศผู้
(ข) ลูกโคโคลนนิ่งที่เกิดจากเซลล์ต้นแบบของตุ้มตาม

(ก)



(ข)



รูปที่ 7 (ก) โคต้นแบบดอยอินทนนท์ พันธุ์ขาวลำพูนเพศผู้
(ข) ขาวมงคล ลูกโคโคลนหนึ่งที่เกิดจากเซลล์ต้นแบบของดอยอินทนนท์

ประโยชน์และข้อจำกัดของการทำโคลนนิ่ง

การโคลนนิ่งเป็นประโยชน์ต่อวงการปศุสัตว์เป็นอย่างมาก ในแง่การเพิ่มจำนวนสัตว์พันธุ์ดีมากขึ้นที่มีจำนวนไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์ยังต้องศึกษาวิจัยกันอีกมากเพื่อหาสาเหตุและหาวิธีการเพื่อลดปัญหาของการแท้งและการตายระหว่างคลอดและหลังคลอดของลูกสัตว์โคลนนิ่ง ซึ่งมีอัตราสูงกว่าสัตว์ที่เกิดมาจากการผสมพันธุ์ปกติหลายเท่าตัวสำหรับในแง่การทดลองทางวิทยาศาสตร์ การโคลนนิ่งเพื่อผลิตสัตว์ทดลองเพื่อใช้ในการทดสอบทางการแพทย์จะสามารถช่วยลดจำนวนสัตว์ที่ใช้ในการทดลองให้น้อยลงทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย และช่วยลดความแปรปรวนของผลการทดลอง เนื่องจากสัตว์โคลนนิ่งเป็นสัตว์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน ในทางการแพทย์ได้มีการศึกษาอย่างมากในทั่วทุกมุมโลก เพื่อนำการโคลนนิ่งมาใช้ในการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน (Embryonic Stem cell) ด้วยการนำเซลล์ร่างกายของมนุษย์มาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบ เมื่อได้ตัวอ่อนระยะ

บลาสโตซิสแล้วจะแยกเอาเซลล์ inner cell mass ไปเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์ต้นกำเนิดที่มีพันธุกรรมเหมือนกับเจ้าของเซลล์ร่างกาย แล้วนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ได้ไปใช้รักษาโรคในมนุษย์หรือใช้ในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ เพื่อลดปัญหาเรื่องการต่อต้านอวัยวะใหม่ นอกจากนี้ยังมีความพยายามที่จะโคลนนิ่งมนุษย์ให้เกิดขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการกระทำดังกล่าวยังไม่เป็นที่ยอมรับเพราะยังติดปัญหาทางด้านจริยธรรม และมีกฎหมายห้ามทำดังนั้นการโคลนนิ่งมนุษย์จึงยังเป็นสิ่งที่ไม่สามารถทำได้ในปัจจุบัน ในปัจจุบันงานทดลองที่เป็นที่ยอมรับและถูกเผยแพร่จึงเน้นไปในทางการโคลนนิ่งสัตว์เศรษฐกิจ สัตว์ใกล้สูญพันธุ์ และการโคลนนิ่งเพื่อประโยชน์ในการศึกษาทางการแพทย์



การฉายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์พ่อ-แม่-ลูกในโค DNA Fingerprint for Parentage analysis in Cattle

กัลยา เก่งวิทยกรรรม, วิบูลย์ ฤๅลักษา

บทคัดย่อ

เจาะตัวอย่างเลือดของโคลูกผสมไทยโฮลสไตน์จำนวน 57 ตัวอย่าง นำไปสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 11 ชุด คือ TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA023, ETH3, ETH225 และ BM1824 สำหรับตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 11 ตำแหน่ง (Loci) เพื่อตรวจสอบความเป็นพ่อ-แม่-ลูก พบว่าจำนวนโค 36 ตัว มีความน่าจะเป็น (CEP = 0.9998.) เป็นพ่อ-แม่-ลูก 12 ครอบครัว เพราะมีขนาดของดีเอ็นเอคล้ายคลึงกันระหว่างพ่อ-แม่-ลูก ทั้ง 11 ตำแหน่ง และมี 7 ครอบครัว ที่ไม่เป็นครอบครัวเดียวกัน

คำสำคัญ : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พิสูจน์พ่อ-แม่-ลูก โค

บทนำ

ในปี ค.ศ. 1953 เจมส์ ดี วัตสัน และฟรานซิส คริก ค้นพบโมเลกุลของดีเอ็นเอ ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลไรโบส หมู่ฟอสเฟต และเบส 4 ชนิด คือ อะดีนีน (A-Adenine) ไทมิน (T-Thymine) ไซโตซีน (C-Cytosine) และกวานีน (G-Guanine) ดีเอ็นเอคือสารพันธุกรรมที่อยู่ในนิวเคลียสของทุกเซลล์ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ผิวหนัง ปลายรากขน เซลล์สืบพันธุ์ สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลาน ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของร่างกาย และลักษณะรูปร่าง ทำให้สิ่งมีชีวิตแต่ละหน่วยมีความแตกต่างกัน จำนวนดีเอ็นเอทั้งหมดบนเส้นโครโมโซมมีส่วนที่เป็นยีน (coding DNA) เพียง 5% ของดีเอ็นเอทั้งหมด และมีส่วนที่ไม่ใช่ยีน (non-coding DNA) มากถึง 95%

ในปี ค.ศ. 1985 ศาสตราจารย์ ดร. อเล็ก เจฟฟรีย์ พบว่าดีเอ็นเอในส่วนที่ไม่ใช่ยีน มีลักษณะเป็นลายพิมพ์เหมือนบาร์โค้ด เรียกว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หรือ DNA fingerprint หรือ DNA profile มีความแตกต่างกันหลากหลายมาก (Polymorphism) จนสามารถใช้จำแนกความแตกต่างได้เฉพาะตัว หรือใช้พิสูจน์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกได้ เพราะดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรมของลูกได้รับจากพ่อครึ่งหนึ่ง และจากแม่ครึ่งหนึ่ง เมื่อนำมาดีเอ็นเอของพ่อ-แม่-ลูก มาเปรียบเทียบกัน เฉพาะในส่วนที่ไม่ใช่ยีน จำนวนหลายตำแหน่ง (Loci) จะต้องพบความเหมือนกันของ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูก กับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพ่อ-แม่ ในทุกตำแหน่งที่เปรียบเทียบกัน

ในบางส่วนที่ไม่ใช่ยีน หรือ Non-coding gene เป็นส่วนที่เบสเรียงตัวซ้ำๆ กัน เรียกว่าเบสซ้ำ อยู่ภายในจีโนม (Genome) หรือดีเอ็นเอทั้งหมด มีส่วนที่เป็นเบสซ้ำประมาณ 30% ของจีโนม ลำดับเบสซ้ำมีความแตกต่างกันทั้งขนาด และจำนวนซ้ำ โดยลักษณะการเรียงตัวซ้ำกันมีอยู่ 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ เบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeats) คือการเรียงตัวซ้ำต่อเนื่องเป็นช่วงๆ ยาว กระจายอยู่ภายในเส้นดีเอ็นเอ และเบสซ้ำ

กระจาย (interspersed repeats) เป็นกลุ่มของเบสซ้ำที่มีลักษณะไม่ต่อเนื่องและพบกระจายอยู่บริเวณต่างๆ ในจีโนม แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามความยาวของเบสซ้ำ ได้แก่ ชนิดที่ 1 เบสซ้ำกระจายแบบสั้น (short interspersed elements หรือ SINES) มีขนาด 130-300 เบส พบในจีโนมในลักษณะเดี่ยว หลายพันชุด และชนิดที่ 2 เบสซ้ำที่กระจายแบบยาว (long interspersed elements หรือ LINES) มีขนาดตั้งแต่ 500 เบสขึ้นไป

การเรียงตัวของเบสซ้ำแบบต่อเนื่อง (Tandem repeats) เป็นช่วงยาว พบอยู่หลายแห่งทั่วทั้งไปภายในดีเอ็นเอทั้งหมด จึงถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างเฉพาะตัว และใช้พิสูจน์พ่อ-แม่-ลูก โดยการเปรียบเทียบความเหมือนของจำนวนซ้ำของเบสในตัวอย่างของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบ กับตัวอย่างดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ทราบข้อมูลที่แน่นอน

จำนวนซ้ำของเบสแบบ Tandem repeats แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตามจำนวนซ้ำและความยาวของหน่วยซ้ำ ชนิดที่ 1 คือแซทเทลไลท์ (Satellite) เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส เรียงยาวต่อเนื่องถึงหลายร้อยเบส โดยมีจำนวนซ้ำถึง 10^3-10^7 ครั้ง แต่มีการซ้ำชนิดนี้เพียง 1 หรือ 2 ตำแหน่งต่อโครโมโซม และมักพบที่บริเวณเซนโทรเมียร์ ชนิดที่ 2 คือมินิแซทเทลไลท์ (Minisatellite) เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำขนาด 9-100 เบส เรียงยาวต่อเนื่อง พบได้ประมาณ 10-1,000 ครั้ง การเรียงตัวซ้ำชนิดนี้มีจำนวนมาก และมีความหลากหลายสูง จึงมีอีกชื่อว่า วีเอ็นทีอาร์ (VNTR-Variable number of tandem repeats) ชนิดที่ 3 คือ ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส เรียงยาวไม่เกิน 100 ครั้ง เช่น มีเบส C ซ้ำ 10 จะมีลักษณะการซ้ำคือ CCCCCCCCCC ถ้าเป็นชนิดเบสซ้ำ เช่น (CA)₈ จะมีลักษณะการซ้ำคือ CA CA CA CA CA CA CA CA เบสซ้ำชนิดนี้มีเป็นจำนวนมากกระจายอยู่ในจีโนม ประมาณ 10^4-10^5 ตำแหน่ง และมีความหลากหลายสูงจนนำมาพัฒนาใช้

เป็นเครื่องมือตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เรียกว่า ไมโครแซทเทลไลท์ มาร์คเกอร์ (Microsatellite marker-MM) (วิชัย และคณะ 2547)

ในการศึกษาพันธุ์ประวัติ (Pedigree) โค และการพิสูจน์พ่อแม่-ลูก นิยมใช้ MM (Visscher et al., 2002, Ibeagha-Awemu and Erhard, 2005) เพราะ Taut and Renz (1984) พบว่า MM มีความหลากหลายสูง (Large polymorphism information) และพบในหลายตำแหน่งกระจายทั่วในดีเอ็นเอ เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ในประเทศไทยประชากรโคนมส่วนมากเป็นลูกผสมระหว่างโคเนื้อพื้นเมือง กับโคนมพันธุ์แท้โฮลสไตน์จากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ หรือเดิมคือกองผสมเทียม ได้พัฒนาขึ้นเป็นพันธุ์โคนมไทยโฮลสไตน์ในระหว่างการพัฒนาพันธุ์ ได้กำหนดโปรแกรมการผสมพันธุ์ระหว่างพ่อพันธุ์โคนมผ่านการคัดเลือกมาแล้วด้วยวิธีทางสถิติ ว่ามียืนที่ควบคุมลักษณะการให้น้ำนมสูง และมียืนที่ควบคุมให้มีรูปร่างถูกต้องสมสัดส่วนโคนม กับแม่โคลูกผสมพื้นเมือง-โฮลสไตน์ของเกษตรกร เพื่อให้ส่งผ่านยีนเหล่านี้ไปยังโคนมรุ่นลูกหลาน

ลูกโคนมที่เกิดจากการวางแผนผสมพันธุ์อย่างมีจุดมุ่งหมายเพื่อปรับปรุงพันธุ์กรรมให้ดียิ่งขึ้น สำหรับนำมาเลี้ยงเพื่อคัดเลือกไว้เป็นพ่อพันธุ์ ขึ้นทะเบียนไว้ผลิตน้ำเชื้อ เนื่องจากลูกโคเกิดในฟาร์มเกษตรกร บางครั้งการจำแนกให้ถูกต้องแน่นอนว่าเป็นลูกที่เกิดจากน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ โดยตัดสินจากข้อมูลพันธุ์ประวัติเท่านั้นไม่เพียงพอ หรือการตรวจสอบว่าน้ำเชื้อที่ซื้อขายกันนั้นเป็นน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคที่มีชื่อเสียง และมีราคาแพงแน่นอน ผลิตในศูนย์ผลิตน้ำเชื้อของเอกชน ไม่ได้ปลอมแปลง โดยเอาน้ำเชื้อพ่อโคตัวอื่นมาขายแทน ทั้ง 2 กรณี จำเป็นต้องพิสูจน์ และตัดสินปัญหาด้วยการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ MM เป็นการตรวจเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลท์ และจำเป็นต้องตรวจเป็นจำนวนหลายตำแหน่ง (Loci) เพื่อเพิ่มความน่าจะเป็นไปได้ให้มากขึ้น (exclusion probability-E.P.) ในการศึกษาของ Cervini et al. (2006) พบว่าถ้าใช้ไพรเมอร์จำนวนมากถึง 10 คู่ เพื่อตรวจตำแหน่งที่มีเบสซ้ำชนิด ไมโครแซทเทลไลท์ในโคลูกผสมบราซิลเลียนเนลเลอร์ จำนวน 10 ตำแหน่ง มีความน่าจะเป็น (E.P.) ได้สูงถึง 0.9989

วิธีดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ จากตัวอย่างเลือดโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ ที่สงสัยว่าเป็นพ่อ-แม่-ลูก จำนวน 12

ครอบครัว (พ่อโค 12 ตัวอย่างแม่โค 12 ตัวอย่าง และลูกโค 12 ตัวอย่าง) ด้วยชุด AxyPrep Blood Genomic

DNA Miniprep Kit

1. ขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก โดยเติม AP1 บัฟเฟอร์ (cell lysis buffer) ปริมาณ 500 µl ลงในหลอด ไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 ml.

2. เติมตัวอย่างเลือด ซึ่งมีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) ปริมาณ 200-250 µl ปิดฝาหลอดปิดฝาหลอด นำไปปั่นด้วย vortex โดยใช้ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 10 วินาที

3. ขั้นตอนการแยกส่วนประกอบของเซลล์ที่เป็นโปรตีน ออกจากดีเอ็นเอ โดยเติม AP2 บัฟเฟอร์ (Protein -depleting buffer) ปริมาณ 100 µl ปั่นด้วย vortex โดยใช้ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 10 วินาที นำไปใส่ในเครื่องเซนติฟิวส์ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิปกติ สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น คือตะกอนสีน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบชนิดโปรตีนของเซลล์ และของเหลวใส ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเออยู่

4. หลังจากนั้นดูดของเหลวที่ได้จากการปั่น ใส่ลงในหลอดมินิเพปคอลัมน์ ที่สวมอยู่ในหลอดไมโคร

เซนต์ปีฟัสขนาด 2 ml. นำไปใส่ในเครื่องเซนต์ปีฟัสปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทั้งของเหลวที่กรองได้หลังจากการปั่น จะได้ตะกอนดีเอ็นเอเหลืออยู่บนฟิวเตอร์ของหลอดมินิเพป

5. การชะล้างดีเอ็นเอโดยการเติม W1A บัฟเฟอร์ (wash buffer) ปริมาณ 700 µl ลงในตะกอนดีเอ็นเออยู่บนแผ่นฟิวเตอร์ของหลอดมินิเพปคอลัมน์ ที่สวมอยู่ในหลอดไมโครเซนต์ปีฟัสขนาด 2 ml. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่องเซนต์ปีฟัส ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

6. การชะล้างครั้งที่ 1 โดยเติม W2 บัฟเฟอร์ (Desalting buffer) ปริมาณ 800 µl ลงในแผ่นกรองของหลอดมินิเพปคอลัมน์ ที่สวมอยู่ในหลอดไมโครเซนต์ปีฟัสขนาด 2 ml. นำไปใส่ในเครื่องเซนต์ปีฟัส ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทั้งของเหลวไป

7. การชะล้างครั้งที่ 2 โดยเติม W2 บัฟเฟอร์ (Desalting buffer) ปริมาณ 500 µl ลงบนแผ่นกรองในหลอดมินิเพปคอลัมน์ ที่สวมอยู่ในหลอดไมโครเซนต์ปีฟัสขนาด 2 ml. นำไปใส่ในเครื่องเซนต์ปีฟัส ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทั้งของเหลวไป (การล้างเก็บดีเอ็นเอ 2 ครั้งเพื่อให้แน่ใจว่าเกลือ หรือสารต่างๆ ที่อาจมีปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ ออกไปกับของเหลวทั้งหมด)

8. ขั้นตอนการเก็บดีเอ็นเอจากแผ่นกรอง โดยเติม TE บัฟเฟอร์ (TE buffer) ปริมาณ 80-200 µl

ลงในแผ่นกรองที่มีตะกอนดีเอ็นเอของหลอดมินิเพปคอลัมน์ ที่สวมอยู่ในหลอดไมโครเซนต์ปีฟัสขนาด 1.5 ml. เพื่อให้ สารละลาย TE บัฟเฟอร์ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ติดอยู่ที่แผ่นกรอง สารละลายบัฟเฟอร์จะละลายดีเอ็นเอจากแผ่นกรองลงมายู่ในหลอดไมโครเซนต์ปีฟัส และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที จะได้ดีเอ็นเอที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction –PCR protocol)

เติมดีเอ็นเอ ปริมาณ 20 ng /µl ลงในสารละลาย PCR-reaction ปริมาณ 14 µl ซึ่งประกอบด้วย 5.5 µl ของพีซีอาร์ไพรเมอร์มิกซ์ (Stockmarks for cattle Bovine genotyping Kits) และ dNTP มิกซ์ ปริมาณ 4.0 µl เติม PCR buffer 3.0 µl และ ใส่ Taq polymerase ปริมาณ 0.5 µl (Ampli Taq Gold™, PE Applied) เติมน้ำกลั่นชนิดดีไอออนไนซ์ปริมาณ 1.0 µl. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย เครื่องพีซีอาร์ ด้วยการเริ่มแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturation) ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 15 นาที ทำพีซีอาร์ 31 รอบโดยเริ่มขั้นแรกทำการแยกดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 95°C นาน 35 วินาที ขั้นที่สอง annealing ที่ 61°C นาน 45 วินาที ขั้นที่ 3 extension ที่ 72°C นาน 60 นาที ตรวจสอบคุณภาพผลผลิตพีซีอาร์ด้วย 2% ethidium bromide stained agarose gels.

**ตารางที่ 1 ข้อมูลไพรเมอร์ฟิชเชอร์ (StockMarks for Cattle®)
เป็น Bovine genotyping kit ของบริษัท ABI**

Locus	Size range (bp)	Primer sequence	Reference
TGLA227 (D18S1)	64-115	F:5'-CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT-3' R:5'-ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA-3'	Barendse et al., 1992
BM2113 (D2S26)	116-146	F:5'-GCTGCCTTCTACCAAATACCC-3' CTTCCTGAGAGAAGCAACACC-3'	Bishop et al., 1994
TGLA53 (D16S3)	147-197	F:5'-GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA-3' R:5'-ATCTTCACATGATATTACAGCAGA-3'	Barendse et al., 1992
ETH10 (D5S3)	198-234	F:5'-GTTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA -3' R:5'-CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC -3'	Toldo et al., 1993
TGLA126 (D20S1)	104-133	F:5'-CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT-3' R:5'- TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC-3'	Barendse et al., 1992
TGLA122 (D21S6)	130-193	F:5'-CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC-3' R:5'-AATCACATGGCAAATAAGTACATAC-3'	Barendse et al., 1992
INRA023 (D3S10)	193-235	F:5'-GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC-3' R:5'-TAACTACAGGGTGTTAGATGAACTC-3'	Vaiman, et al., 1992
ETH3 (D19S2)	90-135	F:5'-GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG-3' R:5'-ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG-3'	Toldo et al., 1993
ETH225 (D9S1)	135-165	F:5'-GATCACCTTGCCACTATTTCCCT-3' R:5'-ACATGACAGCCAGCTGCTACT-3'	Steffen et al., 1993
BM1824 (D1S34)	170-218	F:5'-GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC-3' R:5'-CATTCTCCAAGTCTTCTTG-3'	Bishop et al., 1994
SPS115 (D15)		F:5'-AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG-3' R:5'-AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG-3'	Moore,S.S. and Byrne, K.. (1993).

วิเคราะห์ปริมาณผลผลิตฟิชเชอร์ด้วยเครื่อง Automated genetic analyzer รุ่น ABI 3130 และวิเคราะห์เปรียบเทียบ
พ่อ-แม่-ลูก ด้วยโปรแกรม Gene Map per version 3.7

ผลและวิจารณ์

ตามมาตรฐานของ International Society of Animal Genetics. (ISAG) การใช้ไมโครแซทเทลไลท์ มาร์คเกอร์ จำนวน 10 คู่ สามารถใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวโค และนำไปสู่การใช้ตรวจพิสูจน์พ่อ-แม่-ลูก จากการตรวจสอบโคจำนวน 19 ครอบครัว เพื่อความแน่นอนในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ เพื่อพิสูจน์ความสามารถในการถ่ายทอดยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ ในแผนการพัฒนาพันธุ์โคเนื้อ หรือโคเนื้อ ถ้าข้อมูลพันธุ์ประวัติไม่แน่นอน การคัดเลือกเกิดความผิดพลาดได้ ทำให้ได้พ่อโคที่ไม่เหมาะสมจะใช้เป็นพ่อพันธุ์ Geldermann et al., (1986) ประเมินความผิดพลาดที่เกิดจากการพิสูจน์พันธุ์ประวัติด้วยการตรวจรูปลักษณ์ สูงถึง 13% ในขณะที่ Rosa et al (1996) พบความผิดพลาดเพียง 5% จากการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ ในฝูงโคของอิสราเอล แต่ Ron et al., (1996) พบความผิดพลาดสูงถึง 15% เมื่อใช้การตรวจแบบอาร์เอฟแอลพี (RFLP : Restriction fragment length polymorphism) ฝูงโคบราซิล ดังนั้นไมโครแซทเทลไลท์จึงเป็นที่นิยมใช้ในการพิสูจน์ประวัติพ่อ-แม่-ลูก จากตารางที่ 2 เป็นรายละเอียดของการเปรียบเทียบของอัลลีลลูก (ตัวย่อ C) กับอัลลีลของพ่อ (ตัวย่อ S) และแม่ (ตัวย่อ D) ในแต่ละตำแหน่ง (Loci) โดย

อัลลีลของลูกจะต้องมีส่วนที่เหมือนของพ่อ และแม่ ทั้งสองอัลลีล แต่ถ้าลูกมีเพียงอัลลีลเดียว หมายความว่าอัลลีลนั้นเป็นอัลลีลที่เหมือนทั้งพ่อและแม่ เป็นไปตามกฎนี้ทั้ง 11 ตำแหน่ง และตารางที่ 3 เป็นรายละเอียดของการเปรียบเทียบอัลลีลของลูกโคที่เจ้าของให้ข้อมูลว่าเป็นลูกของพ่อโคทดสอบ จำเป็นต้องพิสูจน์ให้แน่ชัดในประวัติ ก่อนทำการเก็บข้อมูลน้ำนมเพื่อทดสอบพ่อพันธุ์ (Progeny Test) ใน 7 ครอบครัว พบว่าลูกโคมีอัลลีลเหมือนแม่โค แต่ไม่เหมือนพ่อโค ทำให้สามารถตัดสินใจไม่ใช้ลูกโคในแผนการพัฒนาพันธุ์ เป็นการลดค่าใช้จ่ายในการเก็บข้อมูลน้ำนม ซึ่งกินเวลายาวนานถึง 10 เดือน

นอกจากนี้การตรวจอัลลีลทั้ง 11 ตำแหน่งด้วยไมโครแซทเทลไลท์ มาร์คเกอร์ 11 ชุด ยังสามารถใช้ประโยชน์ในการตรวจน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลอมปนได้ โดยเปรียบเทียบอัลลีลของน้ำเชื้อกับตัวอย่างเลือดหรือเซลล์รากขน ของพ่อพันธุ์ตัวที่ระบุว่าเป็นเจ้าของน้ำเชื้อ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ 2 ท่าน คือ คุณเจนจิรา ตูลารักษา และคุณบุหงา จินดาวานิชกุล ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานในห้องปฏิบัติการ ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี



ตัวอย่างที่ 1 แสดงค่าของขนาดดีเอ็นเอส่วนที่เป็นเบสซัคต่อเนื่องแบบไมโครแซทเทิลไลท์ 11 ตำแหน่ง โดยใช้ไพรเมอร์ฟิชอร์ 11 คู่ และพบว่า พ่อ-แม่-ลูก 7 ครอบครัว มีความเป็นไปได้
 เป็นพ่อแม่ลูกที่แท้จริง

	TGLA227		BM2113		TGLA53		ETH10		SPS115		TGLA126		TGLA122		INRA23		ETH3		ETH225		BM1824	
S1	89.52	98.26	123.91	133.47	158.83	164.97	213.85	215.59	242.13	246.06	118.28	122.44	147.73	171.86	211.34	-	113.56	-	133.26	141.34	178.68	180.72
D1	92.06	104.57	122.45	132.04	165.11	-	219.98	211.96	246.37	250.20	116.05	124.41	161.22	163.29	208.65	212.45	99.43	124.30	142.79	149.21	180.47	188.52
C1	89.87	104.69	122.46	124.43	159.00	165.11	216.13	219.96	242.52	250.29	116.17	118.22	148.03	163.41	212.56	-	113.91	124.31	134.31	149.21	178.43	188.64
S2	89.52	98.26	123.91	133.47	158.83	164.97	213.85	215.59	242.13	246.06	118.28	122.44	147.73	171.86	211.34	-	113.56	-	133.26	141.34	178.68	180.72
D2	81.13	87.71	122.35	134.07	178.88	180.94	206.71	218.16	242.50	248.37	116.17	118.22	140.70	171.59	212.60	-	113.91	126.52	142.52	154.97	180.46	188.68
C2	81.12	98.40	124.39	134.06	159.00	180.89	214.19	218.02	242.47	248.30	118.16	-	171.69	-	212.46	-	113.96	126.49	134.42	142.52	178.35	188.60
S3	89.52	98.26	123.91	133.47	158.83	164.97	213.85	215.59	242.13	246.06	118.28	122.44	147.73	171.86	211.34	-	113.56	-	133.26	141.34	178.68	180.72
D3	81.06	98.42	122.41	136.00	156.73	159.00	214.21	216.17	240.51	254.08	118.18	122.41	140.80	147.92	205.68	211.52	114.00	-	144.67	149.09	180.43	182.47
C3	89.96	98.42	134.00	136.02	156.73	159.00	214.19	216.15	242.35	254.01	118.18	-	140.80	147.92	211.63	-	114.14	-	142.48	149.09	178.34	182.53
S4	89.61	91.74	129.55	131.51	156.65	158.93	210.03	215.69	247.9	249.97	116.14	122.36	140.43	142.59	199.89	-	113.54	123.96	143.56	-	178.72	188.85
D4	76.69	98.41	124.41	134.07	156.86	165.23	216.14	-	242.55	250.33	118.21	120.26	150.13	171.78	196.42	211.59	118.21	124.41	142.65	-	180.47	182.52
C4	92.71	98.52	124.57	132.19	156.86	165.11	210.46	216.46	242.46	248.31	120.31	122.38	143.12	171.78	196.42	200.12	118.25	124.46	142.61	144.68	178.43	180.48
S5	89.61	91.74	129.55	131.51	156.65	158.93	210.03	215.69	247.9	249.97	116.14	122.36	140.43	142.59	199.89	-	113.54	123.96	143.56	-	178.72	188.85
D5	76.69	98.41	124.41	134.07	156.86	165.23	216.14	-	242.55	250.33	118.21	120.26	150.13	171.78	196.42	211.59	118.21	124.41	142.65	-	180.47	182.52
C5	91.74	98.41	124.57	132.19	156.65	165.21	210.46	216.23	242.46	248.31	120.31	122.38	143.12	171.78	196.42	199.89	118.25	124.46	142.61	144.68	178.43	180.48
S6	89.61	91.74	129.55	131.51	156.65	158.93	210.03	215.69	247.9	249.97	116.14	122.36	140.43	142.59	199.89	-	113.54	123.96	144.68	-	178.72	188.85
D6	83.23	94.12	132.05	134.08	150.64	159.00	216.08	219.92	242.43	-	116.14	118.19	140.92	-	204.76	208.68	99.43	113.54	144.68	149.09	178.35	188.85
C6	92.06	94.12	130.07	134.09	150.51	159.40	210.36	216.14	242.40	250.16	118.25	122.38	140.92	-	200.00	203.77	113.54	-	144.68	149.09	188.85	-
S7	89.61	91.74	129.55	131.51	156.65	158.93	210.03	215.69	247.9	279.97	116.14	122.36	140.43	142.59	199.89	-	113.54	123.96	144.68	-	178.72	188.85
D7	81.12	92.28	128.07	-	150.76	-	216.15	-	242.41	-	116.14	120.39	140.80	147.92	194.46	205.75	111.81	124.27	134.25	154.91	180.47	182.49
C7	81.12	90.04	128.10	132.05	150.63	159.01	210.35	216.05	242.34	248.25	116.18	120.34	140.78	142.95	194.48	200.00	111.85	124.43	144.61	154.90	180.42	188.58
S8	87.27	89.60	121.91	131.44	158.80	173.05	213.82	215.70	242.14	247.94	116.24	122.44	140.30	-	199.90	203.60	113.54	121.54	133.29	141.25	178.65	180.72
D8	83.28	96.36	124.43	132.05	156.99	163.05	216.13	218.10	242.39	250.17	116.17	118.22	138.40	171.66	204.74	-	113.91	122.35	142.65	-	178.43	-
C8	87.76	96.25	132.04	-	156.99	159.00	216.27	-	242.56	248.41	116.05	118.21	138.40	140.83	204.86	-	122.22	-	134.31	142.52	180.47	180.47

ตัวอย่างที่ 1 แสดงค่าของขนาดติเอ็นเอส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องแบบไมโครแซทเทลไลต์ 11 ตำแหน่ง โดยใช้โปรแกรมพีซีอาร์ 11 คู่ และพบว่า พ่อ-แม่-ลูก 7 ครอบครัว มีความเป็นไปได้
เป็นพ่อแม่ลูกที่แท้จริง (ต่อ)

	TGLA227		BM2113		TGLA53		ETH10		SPS115		TGLA126		TGLA122		INRA23		ETH3		ETH225		BM1824	
S9	87.27	89.60	121.91	131.44	158.80	173.05	213.82	215.70	242.14	247.94	116.24	122.44	140.30	-	199.90	203.60	113.54	121.54	133.29	141.25	178.65	180.72
D9	83.43	90.06	125.55	136.11	156.81	158.98	206.63	210.45	242.42	-	116.22	124.41	140.93	163.32	196.39	211.57	114.06	116.11	155.02	-	182.50	-
C9	87.70	89.97	122.49	132.13	156.74	172.96	206.62	214.28	242.49	-	116.16	124.35	141.09	-	201.10	212.54	113.89	116.05	134.41	154.97	180.38	182.45
S10	87.27	89.60	121.91	131.44	158.80	173.05	213.82	215.70	242.14	247.94	116.24	122.44	140.30	-	199.90	203.60	113.54	121.54	133.29	141.25	178.65	180.72
D10	87.76	98.43	132.04	134.03	156.77	158.89	216.07	-	242.39	248.18	116.13	118.27	140.78	149.87	200.96	212.42	114.01	-	134.38	148.82	182.49	188.54
C10	87.77	-	122.46	132.03	156.90	173.08	214.24	216.07	242.39	248.30	116.15	122.35	140.80	150.00	200.96	204.68	113.92	-	134.49	-	180.47	182.49
S11	98.84	92.10	122.41	133.85	154.79	158.89	216.08	-	242.36	-	116.05	118.08	147.77	163.15	200.00	207.64	122.06	124.25	134.33	146.85	178.21	188.53
D11	76.56	87.63	124.28	133.87	154.66	164.95	210.39	216.12	242.40	246.30	120.15	122.33	140.68	-	200.12	212.46	113.83	122.21	136.24	142.36	180.33	182.49
C11	89.85	89.85	122.38	124.33	159.00	165.08	210.29	216.03	242.26	-	118.18	120.22	140.67	163.27	200.00	-	122.27	124.33	134.12	136.14	178.41	180.44
S12	92.01	104.44	131.86	140.68	154.66	164.95	210.16	216.02	242.33	250.03	118.11	-	140.68	-	207.61	211.50	113.83	126.36	134.22	144.55	178.17	182.36
D12	90.39	94.75	134.94	-	156.78	158.89	216.02	217.98	242.33	250.29	118.52	124.70	140.80	149.87	200.12	207.73	133.21	114.31	144.55	154.91	178.29	180.33
C12	94.24	104.69	132.13	138.05	158.87	165.09	216.05	218.01	242.41	250.13	118.28	124.57	140.78	149.87	200.00	211.52	114.00	126.53	134.60	154.83	180.38	182.53

ไม่ใช่พ่อแม่ลูกที่แท้จริง

S13	80.50	87.16
-----	-------	-------

เอกสารอ้างอิง

- วิชัย บุญแสง อัญชลี ทัศนชาจร ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์ นุสรรา ลิทธิดิลกรัตน์ สกลพันธุ์อิม 2547. ลายพิมพ์ดี
เอ็นเอ จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล ฉบับปรับปรุงใหม่ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีแห่งชาติ
- Barendse W., Armitage S.M. et al. (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* 6 227-235.
- Bishop M.D. and Kappes S.M. et al. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136 619-639.
- Cervini, M., Henrique-Silva, F., Mortari, N. and Matheucci, E. 2006. Genetic Variability of 10 microsatellite markers in the characterization of Brazilian Nellore cattle (*Bos indicus*)
- Geldermann H., Pieper U and Weber WE. 1986. Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle. *J Animal Sci* 63: 1759-1768.
- Georges, M. and Massey, J.M.. (1992). Polymorphic DNA markers in Bovidae. Patent WO 92/13102 (1992). Ibeagha-Awemu EM and Erhard G 2005. Genetic structure and differentiation of 12 African *Bos indicus* and *Bos Taurus* cattle breeds, inferred from protein and microsatellite polymorphisms. *J. Anim Breed Genet* 122:12-20
- Moore, S.S. and Byrne, K.. (1993). Dinucleotide polymorphism at the bovine calmodulin independent Adenylcyclase locus. *Animal Genetics* 24 150.
- Steffen P., Eggen A. et al. (1993). Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Animal Genetics* 24 121-124.
- Ron M., Blanc Y., Band M., Ezra E and Weller JI. 1996. Misidentification rate in the Israeli Dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *J Animal Sci* 79: 676-681.
- Rosa AJM. 1997. Characterization of the Nellore cattle test for paternity using Molecular markers. Master thesis. University of South Paulo.
- Taut D and Renz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 12:4127-4138.
- Solinas Toldo S., Fries R. et al. (1993). Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. *Mammalian Genome* 4 720-727.
- Vaiman D., Osta D. et al. (1992). Characterisation of five new bovine microsatellite repeats. *Animal Genetics* 23 537.
- Visscher, P.M, Woolliams J.A., Smith D and Williams J.L. 2002. Estimation of Pedigree errors in the UK dairy population using microsatellite markers and the impact on selection. *J Dairy Sci* 85 : 2368-2375

DNA Fingerprint for Parentage analysis in Cattle

Kalaya Kengvikkum, Wiboon Tularaksa

Abstract

Blood samples of 57 Thai Holstein dairy crossbred cattle were extracted for genomic DNA by using AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit. Then the eleven PCR primers; TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA023, ETH3, ETH225 and BM1824 were used for examine 11 microsatellite loci. Each locus was compared between the suspect sire-dam-calf for parentage analysis. If they were similar for all 11 loci, there will probability be family. (The combined exclusion probability was 0.9998) Thirty six samples were the true families but fifteen samples were not.

Keywords : DNA fingerprint, parentage analysis, cattle.

การจัดการโรคในปลาสวยงาม CLINICAL MANAGEMENT ORNAMENTAL FISH

รศ.น.สพ.ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์

Jirasak.T@chula.ac.th 081-8204637

บทนำ

ปลาเป็นสัตว์น้ำที่เป็นทั้งอาหารของมนุษย์และเป็นสัตว์เลี้ยงสวยงาม ซึ่งมีความหลากหลายทั้งในด้านรูปร่าง การดำรงชีวิตและแหล่งที่อยู่อาศัย ปลาถูกจำแนกออกเป็น 4 ชั้น (Class) 46 อันดับ (Order) 450 วงศ์ (Family) ประมาณ 10,300 สกุล (Genus) และประมาณ 23,250 ชนิด (Specie) ในจำนวนนี้เป็นปลาน้ำจืดประมาณ 6,700 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อน และเขตร้อนชื้น โดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งบริเวณดังกล่าวนี้วงศ์ปลาตะเพียนหรือคาร์พ (Cyprinidae) มีมากกว่า 1,000 ชนิด เช่น ปลาตะเพียนชนิดต่างๆ ปลากระโห้ ปลาหางไหม้ ปลาทรงเครื่อง และปลาทอง เป็นต้น

ในทวีปอเมริกาใต้ แม่น้ำอะเมซอนเป็นแหล่งน้ำที่สำคัญและมีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก เป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำนานาชนิดตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ เช่น พวกลาซาร์ซิน ซึ่งมีสมาชิกที่เป็นปลาสวยงามหลายชนิด เช่น ปลานีออน ปลาการ์ตูน ปลาปิรันยา รวมทั้งปลาอราไพมาหรือ ซอนอะเมซอน ซึ่งเป็นปลาที่มีความยาวมากที่สุดในโลก

ส่วนในทวีปแอฟริกา มีทะเลสาบน้ำจืดขนาดใหญ่หลายแห่ง เช่น ทะเลสาบวิกตอเรีย ทะเลสาบมาลาวี และทะเลสาบแทนแกนยิกา ในทวีปนี้มีแม่น้ำไนล์ซึ่งเป็นแม่น้ำที่ยาวมากที่สุดในโลก แหล่งน้ำแหล่งนี้เป็นถิ่นอาศัยของพวกลาซิดลิค หรือปลาหมอสี ซึ่งมีประมาณ 1,000 ชนิด ส่วนปลานิลและหมอเทศ เป็นปลาที่เป็นอาหารของคนเกือบทั่วโลก

ปลาสวยงามที่เลี้ยงในประเทศไทยมีทั้งปลาพื้นเมืองและปลาที่นำเข้ามาจากต่างประเทศซึ่งมีมากกว่า 200 ชนิด มีการพัฒนาสายพันธุ์และการเพาะเลี้ยง

จนได้สายพันธุ์ใหม่ๆ มากมายเช่น ปลาทอง ปลาปอม ปาตัวร์ ปลาหางนกยูง ชนิดต่างๆ ในแต่ละปีมีการส่งออกปลาสวยงามไปประเทศต่างๆ ทั่วโลก เป็นมูลค่ามากกว่าพันล้านบาท แต่อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลาสวยงามก็มีการสูญเสียอันเนื่องมาจากโรค ซึ่งเกิดจากสาเหตุต่างๆ ที่จำเป็นจะต้องจัดการเพื่อลดต้นทุนการผลิต และที่สำคัญเพื่อให้ผู้เลี้ยงเกิดความเชื่อมั่นในการเลี้ยงปลาสวยงามต่อไป ทั้งนี้เพราะเมื่อเลี้ยงปลาสวยงามตัวเล็กแล้วเกิดความผูกพัน และสงสารเมื่อต้องสูญเสียปลาที่เลี้ยงไป

บทความนี้จะกล่าวถึงโรคที่พบบ่อยๆ ในปลาสวยงาม เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการให้ปลาสวยงามที่เลี้ยงมีสุขภาพดีมีอายุยืนยาวตามอายุขัยต่อไป

โรคไม่ติดต่อ

โรคที่เกิดจากสภาพแวดล้อมเป็นพิษ

1. การขาดออกซิเจนในน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ (Hypoxia and anoxia)

ปริมาณความต้องการออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ ในปลาแต่ละชนิดย่อมมีความแตกต่างกันออกไป พบว่าในปลาคาร์พ ปกติต้องการออกซิเจน ขนาด 5 มิลลิกรัม/ลิตร และควรมีออกซิเจนไม่น้อยกว่า 3 มิลลิกรัม/ลิตร ถ้าหากปริมาณออกซิเจนต่ำลงถึง 0.5 มิลลิกรัม/ลิตรจะปรากฏอาการถึงตายได้

ปริมาณของออกซิเจนจะลดลง ถ้าหากในบ่อน้ำมีการสะสมของสิ่งเน่าเปื่อยผุพังและสารอินทรีย์วัตถุต่างๆ เช่น เศษอาหารที่เพิ่มขึ้น การขาดออกซิเจนอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลาตายเป็นจำนวนมากได้ มักเกิดร่วมกับการเลี้ยงปลาหนาแน่นเกินไป มีการสะสมของเศษอาหารสิ่งเน่าเปื่อยผุพัง การระบายถ่ายเทน้ำ

เสียไม่ดีพอ หรือไม่มีการถ่ายเทน้ำในระยะเวลาอันนานเกินไป

ปลาที่แสดงอาการว่ายน้ำชาตออกซิเจน คือปลาจะว่ายอยู่บริเวณผิวน้ำเสมอ และจะสูบเอาอากาศบนผิวน้ำเข้าไป ในขณะที่การขาดออกซิเจนในน้ำยังไม่ถึงระดับที่ทำให้ปลาตาย ปลาจะแสดงอาการอ่อนเพลีย และง่ายต่อการหรือรับเชื้อโรค ดังนั้นปริมาณของออกซิเจนในน้ำจึงน่าจะคำนึงและตรวจสอบด้วย

2. ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ

การเปลี่ยนแปลง pH (ความเป็นกรด-ด่าง) ของน้ำ เป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้ปลาป่วย ระดับ pH ที่ปลาต้องการแตกต่างกันตามชนิดของปลา บางชนิดชอบอยู่ในน้ำที่มี pH ที่เป็นกรดเล็กน้อย แต่บางชนิดก็ต้องการน้ำที่มีความเป็นด่างอยู่บ้าง โดยส่วนใหญ่ของปลาแล้ว ต้องการ pH ของน้ำอยู่ระหว่างค่า pH 6-8 ถ้ามากหรือน้อยกว่านี้ก็ไม่ใช่เหมาะสำหรับเป็นที่อาศัยของปลา

Acidosis

Acidosis มักพบในน้ำที่มีความเป็นกรดมากเกินไป หรือพบในปลาที่ต้องการสภาพน้ำเป็นกลาง แต่ถ้าเรานำไปไว้ในน้ำที่มีความเป็นกรด หรือน้ำที่มีสภาพความเป็นกรดเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น ในดินขาดเกลือแคลเซียม หรือดินที่มีความเป็นกรดอันเนื่องมาจากน้ำแร่ ปลาจะแสดงอาการผิดปกติเกิดขึ้น โดยพยายามจะกระโดดขึ้นมาจากน้ำนั้นอยู่เสมอ และมักจะลอยตัวอยู่บนผิวน้ำ การตายจะปรากฏอย่างรวดเร็วหรือช้าขึ้นกับความเป็นกรดของน้ำมากน้อยเพียงใด โดยทั่วไปเราเห็นปลาชุกอยู่ตามขอบบ่อ ที่บริเวณ external gill จะมีสีเข้มขึ้นและมีเมือกมาก ผิวน้ำจะมีสีขาวขุ่นและตาม Ventral region จะมีสีแดง ปลาว่ายน้ำชาลงและตายในที่สุด ในปลาที่เลี้ยงรวมกันหลายชนิด เช่น ปลาตู้อาจตายเนื่องจากสภาพความเป็นกรดของน้ำได้ เพราะความต้องการของปลาแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องระวังถ้าหากมีการตายของปลาเนื่องจากสภาพความเป็นกรดเกิดขึ้น จะ

ต้องรีบแก้ไขสภาพน้ำให้อยู่ในสภาวะปกติ ในบ่อหรือแหล่งน้ำที่มีการสะสมของสารที่ทำให้เกิดความเป็นกรด ควรจะมีการใช้ผงเคมี เช่น ผง Calcium carbonate เพื่อจะช่วยให้ระดับ pH เป็นกลางในน้ำที่เป็นกรด (pH 5) ที่มีอนุภาคเหล็กปนอยู่ จะทำให้เกิดการรวมตัวของ Colloidal iron ซึ่งจะสะสมที่เหงือกของปลา และไปขัดขวางการหายใจของปลา

Alkalosis

โรคนี้เกิดขึ้นเมื่อ pH ของน้ำสูงกว่า pH 8 ในน้ำที่เป็นน้ำอ่อนหรือมีพีช เมื่อได้รับแสงแดดพีชจะสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้ออกซิเจนในน้ำเพิ่มขึ้น Calcium carbonate ที่ไม่ละลายน้ำจะถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก Calcium hydrogen carbonate Calcium carbonate เกิดขึ้นจะเปลี่ยนเป็น Calcium oxide โดยมีการดึงเอา Carbon dioxide ออกจากโมเลกุลของ Calcium carbonate Calcium oxide นี้จะมีฤทธิ์กัดกร่อนเหงือกและครีบ

ระดับ pH 9.2-10.8 จะทำให้เกิดสภาพวิการต่อปลา ดังนั้นในการป้องกัน Alkalosis ควรจะกำจัดพีชน้ำออกจากบ่อปลาบ้าง และอาจต้องเพิ่มสารเคมีที่เหมาะสมในน้ำเพื่อลดสภาพความเป็นด่าง

3. สารพิษหรือสิ่งมีพิษ

สารพิษหรือสิ่งมีพิษ บางครั้งเราไม่สามารถตรวจพบได้ แม้จะใช้วิธีเคมีแยก การดูซึมสารพิษเกิดได้ง่ายโดยผ่านทางผิวหนังของปลาและเหงือก การพิจารณาแยกสารพิษที่อาจมีอยู่ในเครื่องมือ เครื่องใช้สำหรับเลี้ยงปลา ให้พิจารณาสืบต่อไป

- 1.) วัสดุอย่างที่เคยลบสีต่างๆ เช่น ท่อยาง ถังยาง
- 2.) น้ำยาเชื่อมวัสดุ
- 3.) สีต่างๆที่มี Phenol ผสม
- 4.) ถังปูนควรแช่น้ำทิ้งไว้ 14-25 วันก่อนนำไปใช้

สารประกอบไนโตรเจนซึ่งพบในเศษอาหาร โปรตีน อุจจาระ ซากพืช ซากสัตว์ ที่สำคัญได้แก่ แอมโมเนีย ไนไตรต์ ไนเตรต ยูเรีย ระดับต่ำที่สุดของ

สารเหล่านี้ที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อปลา คือ
แอมโมเนีย 0.2-0.5 มก. / ลิตรของน้ำ
ไนไตรต์ 10-20 มก. / ลิตรของน้ำ
ไนเตรต 100-300 มก. / ลิตรของน้ำ

ในการแตกตัวของของเสียที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบย่อมต้องการออกซิเจน ถ้าหากไม่มีออกซิเจน การสร้างสารไนไตรต์ และไนเตรตจะลดลง แอมโมเนีย จัดเป็นสารพิษที่อันตรายที่สุด จากการทดลองของนักวิทยาศาสตร์พบว่า แอมโมเนียอิสระจะมีความเป็นพิษมากกว่าในรูปของ แอมโมเนียมไอออน จำนวนและความเป็นพิษของแอมโมเนียมไอออนในสารละลายของเกลือแอมโมเนียขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลายนั้น ถ้าหากว่ามี pH มากกว่า 9 ขึ้นไป (Alkalosis) จะมีแอมโมเนียอิสระเพิ่มมากขึ้น ซึ่งพิษของแอมโมเนีย นั้นมีผลต่อระบบประสาทของปลา และยังอาจทำให้เหงือกเกิด hyperplasia อีกด้วย

คลอรีนอิสระ

คลอรีนเป็นสารพิษก่อให้เกิดความระคายเคือง ทำอันตรายต่อเหงือก เนื้อเยื่อที่ใช้ในการหายใจ และอวัยวะต่างๆของร่างกาย ความเข้มข้นคลอรีนขนาด 0.2 -0.4 มก. / ลิตร เพียงพอที่จะเกิดอันตราย และทำให้ปลาตายได้ถ้าแช่ไว้นานๆ น้ำที่มีคลอรีนมากใช้โซเดียมไทโอซัลเฟตเป็นตัวทำให้สะเทิน

โลหะ

สารประกอบของเหล็กในน้ำที่มีสภาพความเป็นกรด เกิดการรวมตัวกัน และตกตะกอนเป็นเฟอร์ริกไฮดรอกไซด์ ซึ่งจะสะสมอยู่ตามบริเวณเหงือกของปลาหายใจ ไปทำลายอวัยวะเนื้อเยื่อของระบบหายใจ

ฟีนอล

เป็นสารพิษมีผลต่อระบบประสาทอย่างรุนแรง เช่น ถ่านหิน, gas, coke, tar, cresol, phenic acid ฟีนอลละลายในไขมัน ดังนั้นจึงสะสมอยู่ในไขมันของปลา การดูดซึมของฟีนอลรวดเร็วมาก แต่การขับถ่ายออกจากร่างกายต้องใช้เวลาประมาณ 7 วันถึงขับถ่ายหมด

ดี.ดี.ที. (D.D.T.)

เป็นสารพิษที่มีผลต่อระบบประสาท ใช้ฆ่าพวกแมลงต่างๆ ดี.ดี.ที. มักใช้เป็นยาฆ่าแมลงในการเกษตร และป่าไม้ ฉีดพ่นในอากาศหรือตามตัวสัตว์เพื่อฆ่าเห็บเหา หมัด ซึ่งการใช้ดีดีทีอย่างกว้างขวางนี้ จึงอาจละลายปนในน้ำได้ ดังนั้นอันตรายจึงอาจเกิดแก่ปลาได้เช่นกันเมื่อได้รับแหล่งน้ำที่มีดีดีทีที่ละลายปนอยู่ความเข้มข้นของดี.ดี.ที. ในน้ำที่จะทำอันตรายต่อปลามีขนาด 0.005 mg/l ของ ดี.ดี.ที. บริสุทธิ์ แต่ความทนทานของปลาแต่ละชนิดไม่เท่ากันในปลาบางชนิดอาจทนได้ถึง 0.2 mg/l

4. Nutritional and metabolic disturbance

เป็นที่เข้าใจว่าขบวนการ metabolism ต้องประกอบด้วย การดูดซึมของอาหารที่กินเข้าไปและอาหารนั้นก็เกิดการย่อยแตกตัวและมีการสร้างขึ้นใหม่ภายในร่างกาย ซึ่งในช่วงของการเปลี่ยนแปลงของอาหารภายในร่างกายจะมีพลังงานออกมา พลังงานเหล่านี้จะเปลี่ยนรูปไปเป็นการเคลื่อนไหวของร่างกาย ทุกส่วน มีหลักการอยู่ 3 ประการที่จะพิจารณาถึง metabolism ของร่างกายคือ

1. Energy metabolism

ขบวนการนี้เกี่ยวข้องกับจำนวนอาหารที่กินเข้าไป และพลังงานที่ถูกปล่อยออกมา ภายหลังจากอาหารนั้นถูกย่อยและถูกดูดซึมสารอาหารที่จำเป็นนั้นได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อดำรงสภาพพลังงานของร่างกาย

2. Anabolism

เกี่ยวข้องกับอาหารที่จะนำไปสร้างและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกาย นำไปสร้างเซลล์ต่างๆ น้ำย่อยที่สำคัญ ฮอร์โมน และน้ำเลือด ฯลฯ อาหารที่จำเป็นก็เพื่อทำให้เกิด Anabolism ประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันเป็นส่วนใหญ่ แต่มีบางอย่างมาเกี่ยวข้องด้วย คือ วิตามิน เกลือแร่ต่างๆ เนื่องจากปลาเป็นสัตว์เลือดเย็น อุณหภูมิของร่างกายขึ้นกับสภาพน้ำรอบๆ ตัว เมื่ออุณหภูมิของน้ำภายนอก ร่างกายอยู่ในสภาพที่เหมาะสมกับปลาชนิดนั้นๆ

ขบวนการทางเคมีรวมทั้ง Anabolism จะเพิ่มขึ้น ดังนั้นปลาจะมีสุขภาพสมบูรณ์โดยแสดงออกทางอัตราการเติบโตและความแข็งแรง จึงควรรักษาระดับอุณหภูมิในน้ำนั้นให้คงอยู่เสมอ

3. Intermediate metabolism

3.1 Intermediate metabolism of carbohydrate

เพราะคาร์โบไฮเดรตเมื่อเข้าสู่ทางเดินอาหารจะเกิดการย่อยแตกตัวจนได้สารอาหารที่เรียกว่า monosaccharide ถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้ไปตามกระแสโลหิตไปยังตับ ไปสะสมที่ตับในรูปของไกลโคเจน ซึ่งเป็นแหล่งสำรองของพลังงาน ตับสามารถเปลี่ยนไกลโคเจนมาเป็นน้ำตาล สำหรับในกล้ามเนื้อก็มีไกลโคเจนสะสมอยู่เช่นกัน เมื่อกล้ามเนื้อทำงาน ไกลโคเจนจะถูกเปลี่ยนสภาพเป็นน้ำตาลกลูโคส ในที่สุดจะถูกเปลี่ยนไปเป็น lactic acid หรือ pyruvic acid ซึ่งกระบวนการต่าง ๆ นี้มีฮอร์โมนหลายชนิดมาควบคุม

ในสภาพที่เกิด fatty degeneration หรือเกิดพยาธิสภาพเนื่องจากโรค Hemorrhagic septicemia พบว่าไม่มีการสะสมไกลโคเจนที่ตับเลย

3.2 Intermediate fat metabolism

ไขมันประกอบด้วยกรดไขมันและ trivalent alcohol glycerine ซึ่งกรดไขมันอาจเป็นชนิดอิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัว ในปลาส่วนใหญ่จะเป็นชนิดไม่อิ่มตัวเมื่อร่างกายต้องการพลังงาน ไขมันจะถูกสร้างเป็น Hepatic glycogen ขณะที่กรดไขมันถูกย่อยแตกตัวต่อไป

3.3 Intermediate protein metabolism

Amino acid ที่เกิดจากการ Proteolysis ถูกนำไปยังตับและเกิด metabolism ต่อไปในเซลล์ ระหว่างที่ขบวนการสลายตัวของโปรตีนกำลังดำเนินอยู่ จะมีสารที่เหลือจากการแตกตัวเกิดขึ้น เช่น urea กรดไขมัน และคาร์โบไฮเดรตอาจถูกสร้างขึ้น เนื่องจากการแตกตัวของกรดอะมิโน

Metabolism disturbance ที่เกิดขึ้นในปลาอาจเกิดเนื่องจาก

1. อัตราส่วนของสารอาหารไม่เหมาะสม

2. การขาดวิตามิน

3. ระบบน้ำย่อยผิดปกติ

4. อวัยวะหรือต่อมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับ metabolism มีขนาดปกติ

5. กรรมพันธุ์

6. พยาธิสภาพของโรค

ดังนั้นในการพิจารณาแก้ไขปัญหาคความผิดปกติของ metabolism ต้องคำนึงถึงสภาพพยาธิวิทยา สรีรวิทยา ธรรมชาติ และชนิดของปลา

ในการเลี้ยงปลานั้น ถึงแม้ว่าจะจัดสภาพความเป็นอยู่ สิ่งแวดล้อมให้ดีที่สุดแล้วก็ตาม ก็ยังพบว่าการความผิดปกติเกิดกับปลาอยู่เสมอ ที่พบมากที่สุดคือ fatty infiltration ของอวัยวะภายใน โดยเฉพาะส่วนของลำไส้ตับ และเนื้อเยื่อระหว่างตับ ในตับอาจเกิด degeneration of cell เนื่องจากมีไขมันมาก ไขมันที่เพิ่มขึ้นจะไปทำให้เซลล์ตับแบนลีบและเสียหายที่ไป ในการให้อาหารที่มีไขมันสูงเกินไป แต่อาหารโปรตีนต่ำ มีการสะสมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มมากขึ้น จนอาจทำให้เป็นพิษต่อตับทำให้เกิดตับแข็งและไตอักเสบ ตับที่เกิด degeneration จะมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาลปนเหลือง และอาจมีบริเวณที่เป็นเนื้อตายร่วมด้วย ปลาจะแสดงอาการอ่อนเพลีย อ่อนแอและติดเชื้อโรคได้ง่าย การให้อาหารแก่ปลาจึงต้องคำนึงถึงสภาพสมดุลของสารอาหารเพื่อป้องกัน metabolic disturbance และ nutrition deficiency

4. Amino acid and vitamin requirement

Amino acid เป็นอาหารที่จำเป็นและสำคัญมากสำหรับการดำรงชีพ เพื่อการเจริญเติบโตของปลา กรดอะมิโนนี้มีอยู่มากมายหลายชนิด ร่างกายจำเป็นต้องได้รับกรดอะมิโนที่เพียงพอ และในอัตราส่วนที่เหมาะสม หากมีกรดอะมิโนตัวหนึ่งตัวใดขาดแคลน อาจทำให้เกิดสภาพความผิดปกติตามสภาพของการขาดกรดอะมิโนนั้น ในการทดลองพบว่าเมื่อ tryptophan ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นขาดแคลน จะเกิดสภาพที่เรียกว่า Scoliosis และ Lordosis กรดอะ

มีโนที่จำเป็นอย่างยิ่งในปลา มี 10 ชนิด คือ Arginine, Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Threonine, Tryptophan และ Valine อัตราส่วนของกรดอะมิโนจำเป็นแต่ละอย่างในอาหารโปรตีนจะต้องอยู่ในสภาพสมบูรณ์เพื่อที่ร่างกายจะนำไปใช้ประโยชน์เต็มที่

ปริมาณความต้องการของกรดอะมิโนที่จำเป็นในอาหารโปรตีนมีอัตราส่วนที่เหมาะสมมีดังนี้

Arginine 2.5%, Histidine 0.7%, Isoleucine 1.0%, Leucine 1.5%, Lysine 2.1%, Methionine 0.5%, Phenylalanine 2.0%, Threonine 0.8%, Tryptophan 0.2% และ Valine 1.5%

Vitamin เป็นสารที่ร่างกายขาดไม่ได้ เพราะถ้าขาดจะเกิดอาการของโรคที่ขาดวิตามินตามลักษณะเฉพาะของวิตามินแต่ละชนิด จากการทดลองในต่างประเทศโดยใช้ปลา Chonook salmon ได้สรุปผลความต้องการวิตามินต่าง ๆ ของปลาไว้ดังนี้

- Vitamin C 2-3 mg/kg/วัน
- Thiamine 0.13-0.2 mg/kg/วัน
- Riboflavin 0.75-1.0 mg/kg/วัน
- Pyridoxine 0.38-0.43 mg/kg/วัน
- Choline 50-60 mg/kg/วัน
- Nicotinic acid 5-7 mg/kg/วัน
- Pantothenic acid 1.3-2 mg/kg/วัน
- Inositol 18-20 mg/kg/วัน
- Biotin 0.03-0.04 mg/kg/วัน
- Folic acid 0.1-0.15 mg/kg/วัน
- B12 0.0002-0.0003 mg/kg/วัน

แต่ในบางครั้งพบว่าปลาต้องการวิตามินสูงกว่าระดับที่สรุปไว้ ทั้งนี้ก็เนื่องจากสภาพแวดล้อม ถิ่นที่อยู่อาศัย การเจริญเติบโตของปลาตามสภาวะธรรมชาติที่แตกต่างกัน

โรคติดเชื้อ

โรคที่เกิดจากพยาธิภายนอก

1. Ichthyophthiriasis

เป็นโรคที่พบได้ทั้งในแถบประเทศเมืองหนาวและเมืองร้อน เกิดกับปลาน้ำจืดได้หลายชนิด มักเรียกกันสั้นๆว่า Ich หรือ White spot disease โรคนี้พยาธิตัวแก่ฝังตัวที่ผิวหนังและทำให้ปลาตายได้เป็นจำนวนมาก รูปร่างกลมคล้ายผลส้มเขียวหวานมีขนรอบตัว ในระยะตัวเต็มวัยจะมีนิวเคลียสเป็นรูปเกือกม้า พบฝังตัวอยู่ตามเหงือก และชั้นผิวหนัง และระยะตัวอ่อนจะว่ายอยู่ในน้ำและว่ายไปที่ตัวปลา ในประเทศไทยพบได้บ่อยในช่วงฤดูหนาว อุณหภูมิของน้ำที่สูงกว่า 30 องศาเซลเซียส จะพบโรคนี้ได้บ่อย รักษาได้โดยใช้ฟอร์มาลีนเข้มข้น 30 ppm. แช่ปลาไว้ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้การเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันหรือการย้ายปลาไปอยู่ที่ใหม่จะทำให้ตัวอ่อนพยาธิไปเกาะที่ตัวปลาไม่ได้ ตัวอ่อนจะตายภายใน 2 วันถ้าไม่มีปลา

เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค

เกิดจากเชื้อ *Ichthyophthirius multifiliis* รูปร่างของเชื้อขึ้นอยู่กับระยะที่ตรวจพบ อาจมีรูปร่างกลมหรือคล้ายลูกแพร์ มีขนาด 0.2-1 มม. แต่จะมีการเปลี่ยนรูปร่างเมื่อเชื้อลูกกลมเข้าสู่เหงือกและผิวหนัง โดยจะเห็นส่วนไฮโดพลาซม ยื่นออกไปทางการเคลื่อนที่ของมัน จะเห็นแกรนูล หยาดๆ และ vacuoles เล็กๆมากมาย Macronucleus ขนาดใหญ่เป็นรูปเกือกม้า ส่วน Micronucleus ขนาดเล็กและมักหาไม่พบ โดยเชื้อจะเคลื่อนไหวตลอดเวลาโดยใช้ซิเลีย *Ichthyophthirius multifiliis*

อาการทางคลินิก

ปลาที่ป่วยจะมีจุดสีขาวปกคลุมอยู่ เมื่อโรครุนแรงขึ้นจุดขาวๆเหล่านี้จะแผ่กระจายติดกันกลายเป็นบริเวณกว้างออกไป และต่อมาจะมีส่วนของผิวหนังลอกหลุด ครีบแนบชิดลำตัว ปลาจะว่ายน้ำผิดปกติ เอาตัวอยู่กับตู้ โรคที่เกิดจากเชื้อนี้มักเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงปลาอย่างหนาแน่นและมีอุณหภูมิของน้ำต่ำ ตลอดจน

การไม่ได้กักกันปลาใหม่ไว้ก่อนนำไปปนกับปลาเก่า

การวินิจฉัย

โดยการทำ wet smear จากเหงือกหรือผิวหนังจากปลาที่ยังมีชีวิตอยู่หรือปลาที่เพิ่งตายใหม่ๆ

ลักษณะทางพยาธิวิทยา

พยาธิตัวอ่อนเข้าไปอยู่ในเยื่อผิวหนัง และจะเกิด epithelization ซึ่งเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จะสังเกตเห็นหลังจาก 6 วันไปแล้ว และจะสังเกตเห็นด้วยตาเปล่าหลังจาก 10-14 วันไปแล้ว เชื้อจะเข้าไปถึงชั้น basal membrane เท่านั้นไม่ไปถึงชั้น dermis ในบริเวณที่มี epithelization จะพบว่านิวเคลียสของเซลล์จะเรียงกันไม่เป็นระเบียบ

การรักษาและการควบคุม

เชื้อที่แก่จะทำอันตรายต่อปลาได้น้อยกว่าตัวอ่อนของเชื้อ และไม่มียาที่สามารถฆ่าพยาธิตัวแก่ได้โดยไม่ต้องทำลายปลา เพราะเชื้ออยู่ใต้ชั้น epidermis ดังนั้นการป้องกันควบคุมจึงมุ่งเน้นไปที่เชื้อตัวอ่อน ซึ่งเป็น free swimming infective bodies ในปลาตู้ใช้การแช่ด้วย Trypaflavine ขณะเดียวกันเพิ่มอุณหภูมิให้ถึง 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ใช้เวลาถึง 3 สัปดาห์ ดังนั้นจึงควรแช่ด้วยยานี้ตลอด

ในปลาคาร์พที่ป่วย มีการทดลองใช้ Malachite Green 1 กรัมต่อน้ำ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปรากฏว่าได้ผลดีโดยใช้เวลา 10 วัน นอกจากนี้การป้องกันที่ได้ผลดีคือการแยกเลี้ยงปลาที่ได้อาใหม่ ไว้ดูอาการ 4 สัปดาห์ก่อน และควรทำความสะอาดเครื่องมือเครื่องใช้ โดยการแช่ด้วยน้ำด่างทับทิมเข้มข้น

2. Chilodonelliasis

เป็นโรคผิวหนังและเหงือกในปลาคาร์พมักประสบปัญหาเป็นประจำทุกปีในฤดูหนาว

เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค

เกิดจากการติดเชื้อ *Chilodonella cyprini* มีลักษณะเป็นรูปไข่ และบางครั้งพบเป็นรูปหัวใจขนาดกว้าง 45 ไมครอน ยาว 60 ไมครอน Macronucleus รูปรีมีขนาดใหญ่ถึงหนึ่งในสามของเซลล์ ส่วน Micro-

nucleus มีลักษณะกลม สีส้มปนน้ำเงินแบบไม่อาศัยเพศ โดยแบ่งตัวตามความยาวมันอาศัยอาหารจากเซลล์ผิวหนังและเยื่อผิวหนังของเหงือกที่ถูกทำลาย การติดเชื้อเกิดโดยติดจากปลาป่วยโดยตรง

อาการทางคลินิก

ผิวหนังปลาป่วยจะมีสีฟ้าขาว (bluish-white opaqueness) บริเวณเหนือคอขึ้นไปจนถึงฐานของครีบหลังมีลักษณะหนูนคล้ายผี ในรายที่เป็นรุนแรงผิวหนังอาจหลุดลอกเป็นแผ่นปลาจะใช้เวลาตัวอยู่กับผนังตู้ว่ายน้ำอย่างกระสับกระส่าย ในรายที่เป็นที่เหงือกทำให้ปลาหายใจลำบากและอาจตายได้ เนื่องจากพื้นที่สำหรับแลกเปลี่ยนก๊าซลดลง

การวินิจฉัย

โดยการป้ายเชื้อจากผิวหนังและเหงือกของปลาป่วย ใช้เฉพาะปลาที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น เนื่องจากเชื้อชนิดนี้จะออกจากปลาที่ตายแล้วย่อมเชื่อมติดด้วย India ink แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ลักษณะทางพยาธิวิทยา

เชื้อทำให้ชั้น epidermis เสียหาย และทำลายเยื่อผิวหนังจนเหลือแต่โครงกระดูกอ่อนสีเหงือก

การรักษาและป้องกัน

รักษาได้โดย Trypaflavine ควบคุมกับการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นถึง 28 องศาเซลเซียส เชื้อจะตายภายใน 10 ชั่วโมง หรือแช่ใน Aquarol แช่ 3 ครั้งห่างกัน 3 วัน ซึ่งให้ผลดีสำหรับการป้องกันโรคนี้สำหรับปลาตู้นั้นจะมีหลักการปฏิบัติโดยทั่วไปคือ

1. ไม่ควรเลี้ยงปลาหนาแน่นเกินไป ควรใช้น้ำ 5 ลิตร ต่อปลา 1 ตัว

2. สภาพแวดล้อมต้องเหมาะสม เช่น ปริมาณออกซิเจน ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ อาหาร

ปลาที่นำเข้ามาเลี้ยงใหม่ ต้องแยกเลี้ยงไว้ต่างหากก่อน

3. Monogenea หรือปลิงใส

พบได้ในปลาสวยงามทุกชนิด Monogenea ที่ตรวจพบมีหลายชนิด ไม่ใช่มีเพียงแต่ *Dactylogyrus sp.*

และ *Gyrodactylus* sp. ดังที่หลายคนเข้าใจกันเท่านั้น ความจริงเป็นเพียง 2 สกุล ในจำนวนหลาย ๆ สกุลที่ตรวจพบ แต่ในที่นี้ขอให้อ่านกันในกลุ่ม Mono-genea หรือปลิงใสเท่านั้น Monogenea สามารถกำจัดได้โดยใช้ฟอร์มาลินเข้มข้น 30 ppm. แช่ 2 วัน



รูปแสดง Monogenea หรือปลิงใส

4. Digenea หรือ พยาธิใบไม้ (Flukes)

จากการตรวจหาปรสิตภายนอกในปลาสวยงามส่งออกพบ Digenea ในระยะตัวอ่อนระยะ Metacercaria เท่านั้น โดยจะเข้า cyst ฝังตัวอยู่ที่เหงือก และกลัมน้ำหนืด พบได้ในปลาเกือบทุกชนิดแต่พบมากในปลาหางไหม้ ปลาจีน ปลาทรงเครื่อง ปลากระดี่ เนื่องจาก Digenea จะฝังตัวอยู่ใต้ชั้นผิวหนังจึงไม่สามารถทำการรักษาได้

5. Lernaea sp. หรือ หนอนสมอ

จะพบเฉพาะเพศเมียเท่านั้นที่เป็นปรสิต และจะพบได้เฉพาะในปลาที่มีเกล็ด โดยหนอนสมอจะใช้ส่วนหัวที่มีลักษณะคล้ายสมอฝังเข้าไปตามโคนครีบกเกล็ด พบได้ในปลาที่มีเกล็ดเกือบทุกชนิด

6. Argulus sp. หรือ เห็บปลา

รูปร่างแบนกลมด้านหลังโค้งมน มีสีเขียวปนเหลืองหรือน้ำตาล พบเกาะอยู่ตามผิวหนังสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าพบได้ในปลาที่มีเกล็ดเกือบทุกชนิด สำหรับปรสิตในกลุ่ม Copepod และ กลุ่ม Branchiura

นี้สามารถรักษาได้โดยการแช่ดิฟเทอร์เร็กซ์ 0.25 ppm. สัปดาห์ละครั้ง 4 สัปดาห์ ติดต่อกัน นอกจากนี้การตรวจพบปรสิตในกลุ่มต่างๆดังที่กล่าวมาแล้ว ยังตรวจพบโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสอีกด้วยคือ โรค Lymphocystis หรือ โรคท้าวแสนปม อาการโรคนี้คือ มีตุ่มสีขาวเล็กขึ้นเป็นกระจุก อยู่ตามครีบหลัง ครีบท้อง และลำตัว ตรวจพบในปลาตะกรับ และปลาเสือพ่นน้ำ ซึ่งโรคนี้เมื่อเป็นมากแล้วก็สามารถรักษาให้หายได้ แต่ถ้ายังไม่เป็นไม่มากนัก



รูปแสดง Argulus sp. หรือเห็บปลา

โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

• โรค Motile Aeromonas Disease

สาเหตุของโรค (Etiological agent)

เกิดจากเชื้อ Aeromonas hydrophila เรียกว่า Motile aeromonas disease ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปตั้งแต่ ค.ศ.1974 เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เคลื่อนที่ได้โดยใช้ Polar flagella ลักษณะของโรคเมื่อเชื้อเข้าไปในกระแสเลือดและผลิตสารพิษ (Toxins) โรคนี้พบได้อย่างกว้างขวางในทุกประเทศที่มีการเลี้ยง

ปลาน้ำจืด และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคระบาดในปลารวมทั้งในสัตว์เลือดเย็นอื่นๆ หลายชนิด ความรุนแรงของเชื้อจะต่างกันตามแหล่งที่อยู่ จึงมีชื่อพ้องอีกหลายชื่อสำหรับโรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้โดยเรียกตามอาการของปลาหรือสัตว์ป่วย ได้แก่

1. hemorrhagic septicemia ทำให้ปลาป่วยมีอาการตกเลือด เกิดกับปลาเขตร้อนทั่วๆ ไป เช่น ปลาไน (*Cyprinus carpio*)
2. red sore disease ในปลา Pike (*Esox lucius*)
3. bacteria septicemia เป็นลักษณะอาการที่มีเชื้อแบคทีเรียแพร่ไปยังอวัยวะส่วนต่างๆ ตามกระแสเลือด
4. red pest บริเวณด้านท้องของปลามักมีสีแดงและเลือดคั่ง (dermal hyperemia)
5. rubella ปลาคาร์พในยุโรปตะวันตก อาการท้องมาน (ascites) และเชื้อแพร่ไปตามกระแสเลือด
6. freshwater eel disease พบในปลาไหล ตกเลือดเป็นจุดเล็กๆ (petechial hemorrhage) บริเวณท้อง
7. red-leg disease ในกบ

รูปร่าง (morphology)

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้นตรง ขนาดความยาวโดยทั่วไปประมาณ 1.0-1.5 ไมครอน หรือ 2-4.5 เท่าของความกว้าง แล้ (Flagellum) มักมีเพียง 1 เส้นที่ปลายเซลล์จึงสามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างสารสี (pigment) ไม่มีแคปซูล ลักษณะโคโลนีแตกต่างกันบ้างบนอาหาร TSA โดยทั่วไปมีลักษณะกลม ผิวเรียบ ตรงกลางโค้งนูน สีขาวนวล มักอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ บางครั้งพบเป็นสายสั้น ๆ

คุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical properties)

คุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายกับแบคทีเรียในครอบครัว Enterobacteraceae เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วๆ ไป สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่ง

อาหารและให้พลังงาน เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน เปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง ต่ำสุด 0-5 องศาเซลเซียส สูงสุด 38-45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส ช่วงความเป็นกรดต่าง (pH) 5.5-9.0 นอกจากนี้ยังสามารถผลิต extracellular enzymes ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้มี ความรุนแรงและสามารถทดสอบความรุนแรงได้ ได้แก่

Hemolysins ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือด (Blood agar) จะปรากฏ clear zone เป็นบริเวณกว้างรอบๆ โคโลนี

นอกจากนี้ยังสามารถสร้าง Resistance (R) factor โดยถ่ายทอดทาง Plasmid ทำให้เชื้อมีความรุนแรงมากขึ้น Cytochrome oxidase test ให้ผลเป็นบวก สามารถสร้างอินโดล (Indol) เจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะชนิด (Selective media) คือ Rimler-Shotts (RS) medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จะได้โคโลนีสีเหลือง

RS medium ประกอบด้วยกรดอะมิโนบางชนิดและเติมปฏิชีวนะโนโวไบโอซิน (Novobiocin) ลงไปด้วยเพื่อช่วยให้สามารถแยกเชื้อ *A. hydrophila* ออกจากแบคทีเรียพวกอื่นๆ ได้ง่ายขึ้น ให้ผลถูกต้องประมาณ 94% เนื่องจากไม่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Citrobacter spp.* ซึ่งเป็น H₂S-variable ได้ และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ไม่สามารถแยกเชื้อ *A. hydrophila* ชนิดที่ไวต่อยาปฏิชีวนะโนโวไบโอซิน และให้เอนไซม์ Lysine carboxylase ได้ นอกจากนี้ยังไม่สามารถแยกให้เห็นความแตกต่างระหว่าง *A. hydrophila* กับ *Vibrio* Group F หรือ EF6 ซึ่งแบคทีเรียพวก *Vibrio* ส่วนใหญ่แพร่กระจายอยู่ทั่วไปในน้ำกร่อยและทะเล

การแพร่กระจายโรค

โรค Motile aeromonas มีการแพร่กระจายทั่วโลก ส่วนใหญ่พบในน้ำจืด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่ง

น้ำที่มีปริมาณอินทรีย์สารมาก น้ำทั้งจากแหล่งชุมชน น้ำกร่อยที่มีความเค็มไม่เกิน 10 พีพีทีนอกจากนี้ยังพบในดินด้วย

ชนิดของสัตว์ที่ไวต่อการติดเชื้อ (Susceptible species)

สัตว์หลายชนิดเป็นโรคนี้ได้แก่

ปลาน้ำจืดและปลาทะเล (เป็นโรคเนื่องจากเชื้อ *A. hydrophila* ที่เจริญเติบโตในที่ที่มีความเค็มได้) เช่น ปลาน้ำ (Cyprinus carpio) ปลาสวยงามน้ำจืดทุกชนิด รวมทั้ง ปลาดุก กบ งู จระเข้ เต่า ตะพาบน้ำ

การระบาดของโรค

การระบาดของโรคนี้มีความเกี่ยวข้องกับความเครียดเป็นอย่างมาก ปกติพบเชื้อ *A. hydrophila* ในแหล่งน้ำทั่วๆ ไปและในลำไส้ของปลาปกติ หากแหล่งน้ำนั้นอยู่ในสภาวะสมดุลเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะไม่ทำให้เกิดปัญหากับปลา แต่เมื่อใดก็ตามที่มีสาเหตุทำให้สภาวะสมดุลเปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ เชื้อโรคเพิ่มปริมาณขึ้น หรือสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ไม่ดีจะทำให้ปลาเกิดความเครียดโอกาสที่ปลาจะเป็นโรคก็มีมากขึ้น

สภาพแวดล้อมที่สำคัญได้แก่ อุณหภูมิ ในเขตหนาวปลาที่มีเชื้อ *A. hydrophila* อยู่ในร่างกาย (Latent infection) จะไม่เป็นโรคเมื่อเลี้ยงในน้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7-8 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของน้ำต่ำลงเป็นเหตุให้ปลากินอาหารน้อยลง การสร้างภูมิคุ้มกันอยู่ในระดับต่ำกว่าปกติ การตายน้อย แต่โรคระบาดเมื่ออุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้นเกิน 12-14 องศาเซลเซียส แบคทีเรียเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว แต่การสร้างภูมิคุ้มกันของปลาเพิ่มอย่างช้าๆ ไม่ได้สัดส่วนกับกับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย โรคนี้ระบาดอย่างรวดเร็วในปลาที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* และอ่อนแอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อปลาเครียดและมีเชื้อปริมาณมากในน้ำเป็นสาเหตุให้การตายเพิ่มขึ้น โรคระบาดในประเทศไทยน่าสังเกตว่ามักจะเกิดขึ้นในช่วงปลายฤดูฝนต่อกับต้นฤดูหนาว ทำให้สภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปในเวลา

อันรวดเร็ว ในรอบวันอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 28 องศาเซลเซียส ปลาไม่อาจปรับตัวได้ทัน และหลังจากน้ำท่วมมักจะเกิดโรคระบาด

นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ปลาที่บอบช้ำจากการขนส่ง มีบาดแผลผิวหนังและเหงือกถูกทำลายเนื่องจากประสิทธิภาพของน้ำไม่เหมาะสม เช่น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำเกินไปเป็นเวลานาน ๆ ปริมาณ Unionized ammonia (NH₃) ในน้ำมีมากเกินไปมาตรฐาน (0.025 ppm.) การปนเปื้อนของสารมลพิษ เลี้ยงปลาหนาแน่นเกินไปมีช่องเสียขยับถ่ายออกมาปริมาณมาก ให้อาหารมากเกินไป จนเหลือตกค้างในบ่อหรือกระชัง เป็นสาเหตุให้ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำลดน้อยลง สิ่งเหล่านี้จะเป็นสาเหตุให้ปลาลดการกินอาหารและเครียด เปิดโอกาสให้เชื้อแบคทีเรียเข้าไปทำอันตรายได้

กลไกการเกิดโรค Motile aeromonas

การเกิดโรค Motile aeromonas เนื่องจาก *A. hydrophila* เป็นการติดเชื้อในระบบภายในตัวปลา (System infection) เชื้อแบคทีเรียมักจะเข้าไปทางปาก ยืนเมื่อผิวหนังหรือเหงือกถูกทำลายเชื้อนี้ก็เข้าไปได้ จะไปเพิ่มจำนวนในลำไส้และบริเวณที่เข้าไป แล้วแพร่กระจายตามกระแสเลือดทั่วร่างกาย ปลาที่ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อชนิดนี้ แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในทางเดินอาหาร หลอดเลือด และแพร่ไปทุกเนื้อเยื่อที่มีเลือดไปหล่อเลี้ยง หลังจากนั้นผนังหลอดเลือดถูกทำลาย ตกเลือด พลาสมาไหลซึมออกมาสะสมระหว่างเซลล์ได้เกล็ดทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นบวม น้ำ เกล็ดตั้งพอง (Lepidorthosis) แต่จากรายงานกลไกการเข้าสู่ตัวปลาของเชื้อ *A. hydrophila* ในประเทศไทยพบว่าปลาจำนวนมากที่เป็นโรคระยะต่าง ๆ วิจารณ์ของโรคที่เด่นชัดที่สุดคือแผลที่ผิวหนัง มีตุ่มแดงหรือตุ่มฝี (Vesicle) เล็กๆ เกิดขึ้นก่อน ต่อมาจะแตกออกเกิดเป็นแผลเปิด แผลลุกลามขยายวงกว้างออกไป แสดงว่าการติดเชื้อเฉพาะที่ที่จุดใดจุดหนึ่งในบริเวณเนื้อเยื่อของตัวปลา โดยการ

เลือดลอดผ่านเนื้อเยื่อผิวหนังเข้าไป ไม่ได้เข้าสู่ภายในตัวปลา ก่อนแล้วจึงสู่ระบบหมุนเวียนเลือดแล้วจึงมาก่อแผลตามผิวหนังที่หลัง ส่วนกลไกการเลือดลอดผ่านเนื้อเยื่อผิวหนังของตัวปลาได้อย่างไรนั้นยังไม่มีเป็นที่ทราบกัน ขอยืนยันที่สำคัญประการหนึ่งคือ *Aeromonas* เป็นเชื้อชนิดเดียวที่สามารถแยกได้จากตุ่มฝีที่ยังไม่แตกแทบทุกตุ่ม และตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียใดๆในตัวอย่างเลือดและอวัยวะภายในที่สำคัญในปลาเกือบทั้งหมดที่นำมาศึกษา

อาการของโรค

อาการโดยทั่วไปของโรค Motile aeromonas เนื่องจากเชื้อ *A. hydrophilla* แบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มดังต่อไปนี้

1. อาการรุนแรงแบบเฉียบพลัน (Acute) ปลาจะตายอย่างรวดเร็วมากโดยไม่ปรากฏอาการภายนอกให้เห็นหรือมีอาการเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อวัยวะภายในมีเลือดคั่ง บริเวณลำไส้ส่วนปลายตกละเอียด เยื่อช่องท้องและกล้ามเนื้อตกละเอียดเป็นจุดเล็กๆ การระบาดของโรคเกิดขึ้นภายใน 1 หรือ 2 วัน เนื่องมาจากความเครียดที่เกิดจากการขนส่ง การที่ปลาอยู่รวมกันอย่างหนาแน่นและการที่อุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้น

2. อาการรุนแรงแบบเฉียบพลันและมีอาการบวมหน้า (Dropsy) เป็นแผลพอง (Blisters), มีฝี, เกล็ดตั้งพอง, ตาโปน (Exophthalmia) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นดังกล่าวเป็นผลมาจากสารพิษ (Toxin) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ปลาจะตายภายใน 1-2 วันหลังจากมีอาการดังกล่าว

3. อาการเรื้อรังแบบมีแผลลึกถึงชั้นกล้ามเนื้อ (Chronic ulcerous) ระยะแรกแผลอาจจะตื้น มีขนาดเล็ก ต่อมาขยายขนาดขึ้นและลึกลงไปถึงชั้นกล้ามเนื้อ ปลาที่รอดตายจากอาการดังกล่าวส่วนมากจะมีแผลเป็นสีดำเห็นได้ชัด

4. ปลาไม่แสดงอาการของโรค (Latent form) ไม่สามารถเห็นอาการทั้งภายนอกและภายใน แต่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จากอวัยวะภายในและ

เยื่อช่องท้อง เป็นต้น ปลาเหล่านี้มักจะสร้างภูมิคุ้มกันสำหรับแบคทีเรีย *A. hydrophilla* สายพันธุ์นั้นๆ และเป็นพาหะของโรค (Carrier)

สำหรับในประเทศไทยพบว่า โรคติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจาก *A. hydrophilla* ทำให้ความเสียหายให้แก่ผู้เลี้ยงปลามากที่สุด มักจะตรวจพบเชื้อนี้ในสัตว์น้ำที่มีแผลเรื้อรัง เกิดเนื้อตายและแผลเน่า เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะทำให้ปลาน้ำจืดชนิดต่างๆเป็นโรคเมื่อปลาอ่อนแอ อาการของโรคมีบาดแผลบนลำตัวและครีบกร่อนมีเลือดไหลซึมออกมา ตับ โต และม้ามบวมโตกว่าปกติ ตกละเอียดในอวัยวะภายในทั้งหมด



รูปแสดงปลาที่ติดเชื้อ *A. hydrophilla*

การวินิจฉัยโรค

สามารถวินิจฉัยโรคนี้ได้จากปลาที่ปรากฏอาการติดเชื้อแล้วทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *A. hydrophilla* เป็นแบคทีเรียแกรมลบและสามารถแยกเชื้อได้จากบริเวณแผลและอวัยวะเป้าหมาย เช่น ตับ ม้าม น้ำในช่องท้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากไต ทำการเพาะเชื้อโดย streak บน RS-medium หรือ Trypticase soy agar (TSA) และสามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา แต่ RS-medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะสำหรับ *A. hydrophilla* ถึงแม้ว่า RS-medium จะไม่สามารถแยก *A. hydrophilla* ออกจาก *Vibrio* group F หรือ EF6 ก็ตาม แต่โดยทั่วไปถ้าปลามีอาการของโรคแบบ bacterial hemorrhage

septicemia และพบแบคทีเรียแกรมลบเคลื่อนที่ได้ รูปร่างเป็นแท่งสั้น ไซโตโครมออกซิเดสบวก สามารถใช้น้ำตาลในสภาพที่มีและไม่มีอากาศได้ เจริญในอาหารที่มี Vibriostat 0/129 เชื้อชนิดนั้นคือ *A. hydrophilla* อย่างแน่นอน ความแตกต่างระหว่าง *A. hydrophilla* กับ คือ *A. hydrophilla* เคลื่อนที่ได้ แต่ *A. salmonicida* ไม่เคลื่อนที่

การรักษาและการควบคุมโรค

การรักษาโรคติดเชื้อ Motile aeromonas โดยทั่วไปใช้

- Oxytetracycline ผสมในอาหารในอัตรา 55 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 10 วัน
- Sulfamerazine 264 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ผสมในอาหารเป็นเวลา 3 วัน ตามด้วย 154 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม เป็นเวลาอีก 11 วัน
- Enrofloxacin hydrochloride ขนาด 10 มก./ลิตร ติดต่อกัน 5 วัน

การป้องกัน

การป้องกันเป็นวิธีที่ดีที่สุดเพื่อที่จะลดอัตราการตายของปลาจากโรคนี้เพราะปลาที่เป็นโรคติดเชื้อรักษายากและสิ้นเปลืองมาก เนื่องจาก *A. hydrophilla* จะทำให้ปลาเป็นโรคเมื่อเกิดความเครียด จะสังเกตได้ว่าหลังจากการขนส่งลูกปลา เมื่อปล่อยลงเลี้ยงใหม่จะมีปลาตายเป็นจำนวนมากในช่วงสัปดาห์แรกแม้ว่าจะแช่ปลาในยาต้านจุลชีพเพื่อป้องกันการติดเชื้อก็ตาม การลดความบอบช้ำจากการคัดเลือกปลาเพื่อบรรจุในภาชนะและไม่ใส่ปลาแน่นจนเกินไป ตลอดจนการใส่เกลือแกงในปริมาณ 0.1-0.5% (ขึ้นอยู่กับขนาดของปลา) จะสามารถลดอัตราการตายได้มาก แม้ว่าความเข้มข้นของเกลือในระดับนี้จะไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ก็ตาม แต่เกลือจะสามารถควบคุมสมดุลของไอออนในตัวปลา หรือทดแทนคลอไรด์ไอออนที่ปลาเสียไปเนื่องจากอาการเครียด จากรายงานการวิจัยส่วนมากจะพบว่าเมื่อปลาเครียดปริมาณคลอไรด์ไอออนในเลือดจะลดลง นอกจากนั้นเกลือสามารถลด

ความเป็นพิษของแอมโมเนียและไนไตรท์ที่สะสมเพิ่มขึ้นตามเวลาในขณะที่ขนส่งได้

โรคที่เกิดจากเชื้อรา

• โรค Saprolegniasis

เป็นโรคที่เกิดขึ้นกับปลาและไข่ปลา ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อราในแฟมิลี Saprolegniaceae ชนิดของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคอยู่ในสกุล Saprolegnia, Achlya หรือ Dictyuchus ในบางครั้งเรียกชื่อโรคนี้ว่า Achlyaiasis ถ้าวินิจฉัยพบว่ามีสาเหตุมาจาก Achlya ทั้ง Saprolegnia และ Achlya มีความคล้ายคลึงกันมากทางด้านลักษณะและรูปร่าง หน่วยสืบพันธุ์ของ Dictyuchus แตกต่างไปจากหน่วยสืบพันธุ์ของ Saprolegnia และ Achlya แต่ลักษณะของโรค Dictyuchiasis ในปลาและไข่ปลาจะเหมือนกับโรคที่เกิดจาก Saprolegnia และ Achlya การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เพียงอย่างเดียวสามารถบอกเชื้อราที่เป็นตัวทำให้เกิดโรคได้ การรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราเหล่านี้เหมือนกัน ดังนั้นจึงเรียกชื่อรวมๆกันว่า Saprolegniasis หรือเรียกว่า fish fungus disease หรือ fungus disease

เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรค

ราในแฟมิลี Saprolegniaceae พบได้ทั่วโลก อาจจะเรียกว่าราน้ำ (water mold) พบครั้งแรกในน้ำจืดแต่มีบางชนิดเจริญได้ในน้ำกร่อยที่มีความเค็ม 2.8 ส่วนในพันส่วน (ppt.) แต่ไม่พบในน้ำทะเลที่มีความเค็มสูงกว่า 3.5 ส่วนในพันส่วน มีหลายชนิดพบอยู่ในดินที่ชื้น

ราส่วนมากในแฟมิลีนี้เป็นพวก saprophyte บนอินทรีย์วัตถุที่ตายแล้ว ชนิดของราที่ทำให้เกิดโรคในปลาเป็นทั้งพวก saprophyte และ facultative parasite

เชื้อราที่ทำให้เกิดโรค Saprolegniasis คือ *Saprolegnia parasitica*, *Achlya hoferi*, *Dictyuchus* sp. และมีชนิดอื่นๆที่อยู่ในสกุลเหล่านี้กระจายทั่วไปในโลก ลักษณะของราเหล่านี้คือ เป็นเส้นใยมีขนาดยาว แตก

แขนงและไม่มีผนังกันระหว่างเซลล์ มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้าง zoosporangia บน fertile hyphae zoosporangia มีลักษณะยาวเรียว และมีเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่าเส้นใยอื่นๆ มีผนัง 2 ชั้น ภายในมี zoospore รูปทรงกลม sporangia ของ *S. parasitica* และ *A. hoferi* จะแตกออกแล้วปล่อย zoospore ลงสู่หน้าหรือดินในขณะที่ zoosporangia ยังติดอยู่บน hyphae ส่วน zoosporangia ของ *Dictyuchus sp.* จะหลุดออกจาก hyphae เมื่อเจริญเต็มที่ primary zoospore ของ *S. parasitica* หรือ *A. hoferi* อาจสร้าง cyst แล้วปล่อย secondary zoospore เป็นจำนวนมาก secondary zoospore นี้สามารถงอกเป็น hyphae ใหม่ต่อไป zoosporangia ของ *Dictyuchus sp.* ที่ยังติดอยู่บน hyphae มีการสร้าง cyst หุ้ม zoospore แล้วผลิต secondary zoospore ก่อนที่จะปล่อยออกภายนอก ราแต่ละชนิดที่กล่าวถึงสามารถสร้าง zoospore ได้เป็นจำนวนมากและสามารถเกิดการติดต่อได้ทั้งในลักษณะที่เป็น saprophyte อยู่ในน้ำที่มีปลาอยู่หรือบนตัวปลา ไข่ปลา การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราแต่ละชนิดดังกล่าวนี้เกิดขึ้นได้

การแพร่กระจายของโรค

ทั้ง zoospore และ mycelium ของ *S. parasitica*, *A. hoferi* หรือ *Dictyuchus sp.* พบทั่วไปทุกแห่งในโลก zoospore สามารถติดไปกับขนนก ขนสัตว์ ลม หรือกระแสน้ำ ดังนั้นการเกิดโรค Saprolegniasis ในปลาหรือไข่ปลาเกิดได้ตลอดไป

ชนิดของปลาที่เป็นโรค

ปลาน้ำจืดและน้ำกร่อยทุกชนิด และไข่ปลา มีโอกาสที่จะเป็นโรค Saprolegniasis ไข่ปลาที่ยังมีชีวิตอยู่ไม่ค่อยติดเชื้อรา *Saprolegnia* แต่ไข่ปลาที่เสียจะเป็นอาหารสำหรับการเจริญของเชื้อรา

การระบาดของโรค

สาเหตุเบื้องต้นของการเกิดโรค Saprolegniasis ได้แก่ อันตรายที่เกิดขึ้นแก่ผิวหนัง ครีบ และเหงือก อาจจะเนื่องมาจากปรสิตภายนอก สารมลพิษต่างๆ การ

เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ หรือการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่าง สิ่งต่างๆเหล่านี้เป็นปัจจัยเบื้องต้นที่ทำให้เชื้อราเข้าไปทำอันตรายต่อไป จึงถือว่าเชื้อราพวกนี้เป็น secondary infection บ่อยครั้งเราจะพบว่าเชื้อราจะเกิดร่วมหรือหลังจากโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียต่างๆ

Zoospore ของ *Saprolegnia* จะสร้างเส้นใยปกคลุมเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บหรือบริเวณที่เชื้อราบุกรุก และกระจายออกไปในเนื้อเยื่อที่ปกติซึ่งอยู่รอบๆ แล้วปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยเนื้อเยื่อบริเวณนั้น เส้นใยของราจะกระจายออกไปเรื่อยๆจนกระทั่งเส้นใยลงไปในน้ำที่อยู่รอบๆ ทำให้ดูคล้ายกับปุ๋ยฝ้ายปกคลุมลำตัว ถ้าเกิดที่บริเวณเหงือกอาจทำให้ปลาตายได้เนื่องจากจะไปขัดขวางการหายใจ

ปลาที่ตายจะเป็นอาหารสำหรับการเจริญของเชื้อรา และการสร้าง zoospore ทำให้จำนวน zoospore ในน้ำเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก มีโอกาสที่จะเข้าไปทำอันตรายปลาตัวอื่นที่บาดเจ็บเพียงเล็กน้อย

ไข่ปลาที่ตายเป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Saprolegnia* zoospore เพียงหนึ่ง zoospore สามารถเริ่มมีการเจริญเติบโตบนไข่ปลานี้ได้ กลุ่มของเส้นใยจะกระจายออกจากไข่ลงสู่หน้าที่อยู่รอบๆ และเส้นใยที่เกิดขึ้นบนไข่ปลาที่ตายนี้จะไปขัดขวางการหายใจของไข่ปลาที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ ทำให้ไข่ปลาที่มีชีวิตนั้นตายและถูกบุกรุกโดยราต่อไป

การเจริญเติบโตของรบบนปลาที่ยอมรับเชื้อหรือไข่ปลาขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำ อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 15-30 องศาเซลเซียส แต่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 18-26 องศาเซลเซียส และเจริญเติบโตช้าที่อุณหภูมิ 0-15 องศาเซลเซียส

อาการทางคลินิก

ปลาหรือไข่ปลาที่เป็นโรค Saprolegniasis จะมีลักษณะคล้ายปุ๋ยฝ้ายสีขาวอมเทาจนถึงสีเทาอมน้ำตาล เจริญอยู่บนผิวหนัง ครีบ เหงือก ตา หรือบนไข่ปลา บางครั้งเชื้อราอาจจะบุกรุกลึกลงไปเนื้อเยื่อ

กล้ามเนื้อใต้ผิวหนัง หรือเชื้อราเกิดจากภายในแล้วส่ง
เส้นใยออกมาภายนอกที่ผิวหนัง



รูปแสดงปลาที่มีรอยโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา

การวินิจฉัยโรค

ปลาที่ติดเชื้อราสังเกตได้ง่ายจากลักษณะคล้าย
ปุ๋ยฝ้ายสีขาวอมเทาเจริญอยู่บนผิวหนังหรือบนไข่ปลา
ที่ตายแล้ว และเพื่อความแน่นอน น้ำตัวอย่างเส้นใย
จากตัวปลาหรือไข่ปลามาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์
จะพบเส้นใยที่แตกแขนง ไม่มีผนังกันระหว่างเซลล์ ที่
ปลายสุดของเส้นใยจะมี zoospore primary zoospore มี
แล้ว 2 เส้น มีเกราะหุ้ม ภายในมี secondary zoospore

การรักษาและควบคุมโรค

การควบคุมโรค Saprolegniasis โดยการกำจัด
สาเหตุเบื้องต้นที่ทำให้เกิดโรคหรือควบคุมสภาวะ
แวดล้อมให้ดี

การรักษาที่นิยมกันโดยใช้สารเคมี ได้แก่

- malachite green (zine-free) เข้มข้น 0.1
ส่วนในล้านส่วน 24 ชั่วโมง
- เปลี่ยนถ่านน้ำอย่างสม่ำเสมอ

โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส

• Koi Herpes Virus (KHV)

ในปัจจุบัน มีโรคที่เกิดขึ้นกับปลาสวยงามที่อาจ

ทำให้ผู้ที่เลี้ยงหรือกำลังเลี้ยงปลาสวยงามอยู่เกิด
ความสับสนกลัวได้ นั่นคือ Koi Herpes Virus ซึ่งพบ
รายงานในปลาสวยงามของอิสราเอลและญี่ปุ่น แต่ไม่
อาจวินิจฉัยได้ว่า โรคนี้เกิดในญี่ปุ่นหรือไม่ เพียงแต่รู้ว่า
ปลาสวยงามจากประเทศข้างต้นป่วยเป็นโรคนี้ และ
ตอนนี้พบว่า ผู้แทนจำหน่ายปลาสวยงามใน California,
Ohio, Louisville, Atlanta, Texas, Chicago, New York,
Indiana, Nevada, Arizona, Verginia และ Florida ต่าง
ก็พบว่า มีปลาของตัวเองป่วยเป็นโรคนี้ ส่วนใน
ปลาทองไม่พบการเกิดโรค โรค Koi Herpes Virus
นับเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งในปลาแคร์พ เนื่องจากมี
อัตราการตายสูง ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ
เป็นอย่างมาก ที่ USA ปี 2003 โรค KHV ทำปลาทาย
มาก ในประเทศไทย ยังไม่เคยมีรายงานการเกิดโรค
แต่ก็ควรระมัดระวัง เนื่องจากการนำเข้าปลาแคร์พ
จากต่างประเทศ มีรายงานการเกิดโรคนี้ครั้งแรกใน
ประเทศอิสราเอลในปี 2541 จากนั้นได้แพร่ระบาด
ไปในหลายประเทศ ได้แก่ เบลเยียม เดนมาร์ก อังกฤษ
เยอรมนี เนเธอร์แลนด์ ล่าสุดในเดือนตุลาคม 2546 ได้
มีการระบาดครั้งใหญ่ในประเทศญี่ปุ่นที่จังหวัด Ibaraki
ทางตะวันออกเฉียงเหนือของกรุงโตเกียว ซึ่งข้อมูล
ทางการข่าวรายงานว่า ปลาแคร์พตายถึง 1.124 ตัน
เสียหายเป็นเงิน 280 ล้านบาท

เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค

เกิดจากเชื้อไวรัส Herpes เป็นชนิดของ DNA
virus ที่ทำให้เกิดโรคกับปลาได้มากที่สุดโรคแผลพุพอง
ที่เกิดกับปลาแคร์พ (Carp pox) ที่เป็นสาเหตุให้เกิด
ก้อนเนื้อใสๆ ไม่น่าดูในอากาศที่เย็นขึ้น มีชื่อว่า
Cyprinid Herpes Virus (CHV) ไม่ควรสับสนกับ KHV
ชื่อของ KHV ไม่ได้ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย และ
ผู้ที่เชื่อว่าโรคนี้ไม่ได้มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส Herpes
ชอบที่จะใช้ KV เรียกแทนมากกว่า

เชื้อจะสามารถก่อโรคที่อุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าที่
อุณหภูมิสูง (ไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิ
เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดระยะห่างระหว่าง exposure

กับ onset โดยที่อุณหภูมิต่ำทำให้เชื้อไวรัส Herpes virus ดำรงชีวิตได้ยาวนาน โรคมักเกิดที่อุณหภูมิระหว่าง 18-28 องศาเซลเซียส

ชนิดของปลาที่เป็นโรค

โรค Koi Herpes Virus เกิดได้ในปลาคาร์พทั่วไป ปลาไน และปลาสวยงามอื่นๆ อีกหลายชนิด

อาการทางคลินิก

ส่วนใหญ่ปลาจะได้รับเชื้อจากการสัมผัสปลาป่วยด้วยกัน อาจจะมีบ้างที่ได้รับเชื้อจากน้ำหรืออุปกรณ์บางชนิด เช่น ตาข่าย ปลาคาร์พที่ได้รับเชื้อ มีทั้งที่ตายหายป่วยและเป็นพาหะ (พาหะ หมายถึง ติดเชื้อแล้วไม่ป่วย แต่จะแพร่เชื้อออกมาเป็นระยะเวลานาน) โดยเมื่อได้รับเชื้อแล้ว จะแสดงออกมาได้ 4 แบบ คือ

1. ไม่ติดเชื้อ (โดยระบบภูมิคุ้มกัน หรือความต้านทานการติดเชื้อโดยธรรมชาติ)
2. ติดเชื้อและตาย
3. ติดเชื้อแต่รอดชีวิต และกำจัดไวรัสออกจากร่างกาย
4. ติดเชื้อและรอดชีวิต แต่เป็นตัวเก็บกักโรค โดยไม่แสดงอาการ แต่มี KHV แฝงอยู่ และเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสม จะถูกกระตุ้นและแพร่เชื้อออกมา (กลไกยังไม่ทราบแน่ชัด) โดยความเครียดมีผลดังกล่าว และมักทำให้เกิด secondary infection ตามมา

หลังจากปลาติดเชื้อไวรัสตัวนี้เข้าไปแล้ว เชื้อไวรัสจะทำลาย Epithelium cell ของ Koi โดยเฉพาะที่ผิวหนังและเหงือก เป็นผลทำให้เมือกมาก ผิวแห้ง ทำให้เกิดการลอกหลุด และ cell ของเหงือกตาย มีการติดเชื้อรา ประสิทธิภาพที่เรียกว่าตามมา ปลาจะไม่กินอาหาร ไม่ค่อยหายใจ และตายอย่างช้า ๆ

ยิ่งไปกว่านั้นคือ จะทำให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนได้โดยเฉพาะ *Aeromonas sp.* และแบคทีเรียตัวอื่นที่ก่อโรคกับปลา มีผู้เลี้ยงปลาจำนวนมากกล่าวว่า ปลาที่ติดเชื้อไวรัสตัวนี้ จะก่อให้เกิดความสูญเสียภายใน 10-14 วันหลังการติดเชื้อ แต่กระนั้นก็มีบ้างที่ไม่ได้เกิดความเสียหายขึ้นในช่วงเวลาดังกล่าว ซึ่ง

ปฏิกิริยาทางร่างกายของปลาภายนอกที่เราสังเกตได้คือ ลักษณะเป็นแผลไหม้ตามข้างลำตัว มีการหลังเมือกออกมามาก และปลาจะมีอาการแย่งลงเมื่อเหงือกของมันถูกทำลาย

อาการของปลาที่ติดเชื้อที่พอสังเกตได้ เช่น การว่ายน้ำ โดยที่หัวดิ่งลง ไม่กินอาหารและอ่อนแอ ตาจม พบรอยโรคที่เหงือก มีเมือกเหนียวๆ ที่ผิวหนัง รอยแผลมีสีดำนในปลาป่วยระยะสุดท้าย มีความเจ็บปวดตามร่างกาย และมีบ้างที่พบว่า ที่เหงือกของปลาป่วยจะมีลักษณะเป็นแนวรอบขาวๆ ซึ่งปกติเหงือกจะมีสีแดง แต่บางทีจะไม่พบรอยโรคเหงือกของปลาป่วยเลยก็ได้ อัตราการตาย 50-100 % (highly mortality) และเป็น permanent carrier fish พบว่า ปลาที่ป่วยเป็นโรคนี้ ลักษณะรอยโรคคล้ายๆ กับโรคที่เกิดจาก *Aeromonas sp.* ซึ่งอัตราการเกิดโรคมีประมาณ 10-20 % แต่อัตราการตายเพียง 7-8 %

การระบาดของโรค

เมื่อปลาที่มีเชื้ออยู่อ่อนแอหรือได้รับบาดเจ็บ เชื้อจะแบ่งตัวและก่อโรคได้ถึงแม้จะอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ดี ตัวแทนจำหน่ายหรือผู้ค้าปลาที่มีความรู้ว่าการทำให้น้ำที่เลี้ยงปลา มีความอุ่นที่ 30 องศาเซลเซียส สามารถหยุดอาการของโรค และอาจจะทำให้ปลาหายป่วยได้ จากนั้นนำปลาเหล่านี้ไปขาย เมื่อมีคนอื่นซื้อไปเลี้ยง แม้ไม่มีความเข้าใจในโรค Koi Herpes Virus ก็อาจทำให้ปลาดังกล่าวเกิดโรคขึ้นได้อีก และจากที่อัตราการตายต่ำ อีกทั้งปลาหลายชนิดก็มีความทนต่อการติดเชื้อ แต่เมื่อนำไปเลี้ยงรวมกันกับปลาหลายๆ ชนิด ก็จะเป็นสาเหตุให้ปลาที่ไม่ทนต่อเชื้อ เกิดโรคขึ้นได้ นอกจากนี้ ภาวะความเครียดต่างๆ เช่น การขนส่ง การติดเชื้อปรสิต และคุณภาพน้ำไม่ดี จะมีบทบาทสำคัญที่จะช่วยเสริมให้เกิดโรคได้ง่ายขึ้น

การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัยโรค มีหลายวิธี ได้แก่

- วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัส แล้วตรวจจับ

ด้วยสารพันธุกรรมที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุ ควรส่งตัวอย่างปลามาตรวจอย่างน้อย 3 ตัว เพื่อให้ได้ผลการตรวจสอบที่น่าเชื่อถือ และเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการตรวจสอบผิดพลาดได้ ตัวอย่างที่ส่งตรวจควรจะอยู่ในน้ำสะอาด มีออกซิเจนเพียงพอ แม้ว่าผลที่ออกมาจะสรุปว่า เกิดจากเชื้อไวรัส แต่ก็ยังไม่อาจยืนยันได้ว่า KHV เป็นตัวการที่ทำให้เกิดโรคเสมอไป

- วิธีเพาะแยกเชื้อไวรัส (Virus Isolation) ใน Koi Fin (KF 1 cells) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
- วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry) ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสในการตรวจหาเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุในเนื้อเยื่อของปลา
- วิธีอินไซตูลาไรเซชัน (In Situ Hybridization) โดยใช้สารพันธุกรรมที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสเข้าไปเกาะกับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อของปลา

การรักษาและควบคุมโรค

ไม่มีทางรักษาโรคนี้ได้โดยตรงเนื่องจากเป็นเชื้อไวรัส มีเพียงการรักษาภาวะแทรกซ้อนต่างๆที่อาจจะเกิดขึ้น เช่น การติดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อปรสิต ดังกล่าวได้แก่

- คลอรามินที (Chloramin T) หรืออาจจะใช้ต่างทับทิม (KMnO₄) ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่เหงือก ในอัตรา 2 พีพีเอ็ม (ส่วนในล้านส่วน) หากใช้เกินขนาด จะกลายเป็นพิษต่อปลา เพื่อควบคุมเชื้อราและปรสิต มีรายงานว่า คลอรามินที และ KMnO₄ จะช่วยลดจำนวนของเชื้อไวรัสที่มีอยู่ในน้ำบ้าง
- ยาปฏิชีวนะ สำหรับรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียภายใน



การนำเสนอผลงานภาคบรรยาย (18/10/2550)

14.45–15.00 น.

1. A preliminary study on digestion of individual fatty acids
in growing–finishing pigs fed diets containing either beef tallow or sunflower oil
J. Mitchaothai C. Yuangklang S. Wittayakun K. Vasupen,
S. Wongsuthavas P. Srenanul R. Hovenier and A. C. Beynen

15.00–15.15 น.

2. Review Study of the Comparison on Response of Estrus Induction in Dairy Cows by Intramuscular,
Intraischiorectal fossa and Intravulvosubmucosa Injection of Prostaglandin F2
Jatuporn Kajaysri

15.15–15.30 น.

3. Sex Identification of Some Psittacine Birds by Polymerase Chain Reaction
Chanathip Thammakarn Apichart Punchukrang Kanya Jirajaroenrat and Kanokrat Srikijkasemwat

15.30–15.45 น.

4. Effect of Reduced FSH Dose on Superovulatory Response and Embryo Yield in Brahman Cows :
A Case Study
ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท์ เทืองสันเทียะ กิรติ อีแจ้ บันลือ กล้าพู พิระพงษ์ สำราญทรัพย์
สุรสิทธิ์ ดวงสอนยา จุรีย์รัตน์ สำเร็จประสงค์ และ มาลี อภิเมธีอามัง

15.45–16.00 น.

5. Investigation of Relationship and Agreement between Serum P4 Concentration and Estrous Signs
in Thai Swamp Buffalo (Bubalus bubalis): A Preliminary Study
T. Chaikhun J. Suwimontheerabut C. Usawarerker J. Ratanadhep and M. Techakumphu

16.00 – 16.15 น.

6. การพัฒนาอุปกรณ์ฉีดยาสัตว์ระยะไกล Development of veterinary injector ; Vet remote injection
equipment
เฉลิมพงศ์ จิรพณศิริ และ สมพัทธ์ พูนสุข

การศึกษาเบื้องต้นของการย่อยได้ของกรดไขมัน ในสุกรรุ่น-ขุนที่ได้รับอาหารผสมไขว้หรือน้ำมันทานตะวัน

จำลอง มิตรชาวยไทย^{1, 3 *} เอลิมพล เยื้องกลาง² สุนทร วิทยาคุณ² ไกรสิทธิ์ วสุพิณ²
ศศิพันธ์ วงศ์สุรทราวาส² ไพรวลย์ ศรีนานวล² โรเบิร์ต โฮวีเนีย³
และ แอนตอน ซี ไบเนิน³

¹Department of Clinic for Swine, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology,
Nong Chok, Bangkok 10530, Thailand

²Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan, Phangkhon,
Sakon Nakhon 47160, Thailand

³Department of Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ใช้สุกรจำนวน 4 ตัว เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของไขมันที่มาจากสัตว์ (ไขว้) กับ ไขมัน
ที่มาจากพืช (น้ำมันทานตะวัน) ต่อความสามารถในการย่อยได้ของไขมันรวม และกรดไขมันแต่ละตัว สุกรทั้ง
4 ตัวถูกจัดเข้ากลุ่มทดลองได้เป็น 2 กลุ่มทดลอง ตามแผนการทดลองแบบ 2 x 2 จตุรัสละติน โดยมีสุกรจำนวน
2 ตัวต่อกลุ่มทดลอง และใช้เวลา 5 อาทิตย์ต่อช่วงเวลาทดลอง สุกรทั้งหมดเลี้ยงในกรงเมตาโบลิซึมแบบราย
ตัว และได้รับอาหารทดลองแบบเต็มๆ ที่ทำการจัดบันทึกปริมาณอาหารที่ให้และที่เหลือตลอดงานทดลอง อาทิตย์
ที่ 5 และ 10 หลังจากเริ่มทดลองทำการเก็บตัวอย่างมูลสุกรแบบเก็บทั้งหมดตลอดทั้งวันเป็นเวลา 7 วันติดต่อกัน
จากนั้นนำตัวอย่างอาหารและมูลไปหาปริมาณองค์ประกอบของไขมันรวม และกรดไขมัน ผลการทดลองครั้งนี้
พบว่าอาหารทดลองที่ใช้ไม่มีผลต่อความสามารถการย่อยได้ของไขมันรวม, กรดปาล์มมิติก, กรดสเตียริก,
กรดโอเลอิก และ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน แต่สุกรที่ได้รับอาหารสูตรที่เสริมด้วยน้ำมันทานตะวันมีความ
สามารถในการย่อยได้ของกรดลิโนเลอิก, กรดอัลฟาไลโนเลนิก และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว สูงกว่าสุกรที่รับ
อาหารที่เสริมด้วยไขว้ ซึ่งทั้งกรดลิโนเลอิกและกรดอัลฟาไลโนเลนิกเป็นกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับสุกร ด้วย
เหตุนี้สุกรจึงได้รับประโยชน์สูงกว่าจากการเสริมน้ำมันทานตะวันในอาหาร ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็น
ว่าการให้อาหารที่เสริมด้วยน้ำมันทานตะวันแก่สุกร ทำให้สุกรสามารถย่อยกรดไขมันที่จำเป็นได้มากกว่า
และได้รับพลังงานเมตาโบไลต์มากกว่า

A preliminary study on digestion of individual fatty acids in growing–finishing pigs fed diets containing either beef tallow or sunflower oil

J. Mitchaothai^{1, 3 *}, C. Yuangklang², S. Wittayakun², K. Vasupen²,
S. Wongsuthavas², P. Srenanul², R. Hovenier³ and A. C. Beynen³

¹Department of Clinic for Swine, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology,
Nong Chok, Bangkok 10530, Thailand

²Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan, Phangkhn,
Sakon Nakhon 47160, Thailand

³Department of Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

Abstract

Four castrated, male pigs (Landrace X Large White X Duroc) were used in the current study to determine the effect of an animal fat (beef tallow; BT) and a vegetable oil (sunflower oil; SO) source on the digestibility of fat and individual fatty acids. The pigs were allotted to one of two experimental diets (BT or SO diet) according to a 2 X 2 Latin Square Design with 2 replications per treatment and 5 weeks for each period. The pigs were kept in individual metabolism cages and were fed ad libitum. The amount of feed supplied and feed refusals, if any, were recorded twice a day. At 5 and 10 weeks after the start of the experiment, the faeces of all individual pigs were collected for 24 hours on 7 consecutive days. The dietary and faecal samples were analyzed for crude fat and fatty acid composition. In this study, there was no effect of dietary treatment on the digestibility of crude fat, palmitic acid, stearic acid, oleic acid and PUFA. However, the pigs fed the sunflower oil diet had a higher digestibility of the essential fatty acids linoleic acid, α -linolenic acid and MUFA ($p < 0.05$). As a result, pigs fed the sunflower diet obtained more essential fatty acids and more metabolizable energy from their diets when compared to pigs fed the beef tallow diet.

Key Words : Fatty acids, Digestibility, Sunflower oil, Beef tallow, Pigs

*Corresponding author

Jamlong Mitchaothai, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Nong Chok, Bangkok, 10530, Thailand, Tel. +66-(0)2-988-3655 ext. 246, 247 Fax. +66-(0)2-988-4040, E-mail address : jmitchothai@yahoo.com

INTRODUCTION

The fat source (animal or vegetable origin) in the diet of pigs can affect the utilization of fat and fatty acids. It is known that supplementation of fat from a vegetable source in pig diets results in a higher fat digestibility than supplementation from an animal source (Cera et al., 1989; Li et al., 1990). As a consequence, the pigs fed vegetable oil could benefit from a higher availability of fat and fatty acids. Although there were many studies on the digestibility of fat in pigs fed different kinds of fat or oil, the effect of sunflower oil supplementation (rich in linoleic acid, C18:2, n-6) in on the fat and fatty acid digestibility is not well established in pigs. Hence, the current preliminary study was designed to yield information on the utilization of fat and fatty acids of pigs fed diets supplemented with sunflower oil. The authors hypothesized that the digestibility of the dietary fat and polyunsaturated

fatty acids would be higher in the pigs fed the diet containing sunflower oil.

MATERIALS AND METHODS

Animal, experimental diets and design

Four castrated-male pigs (crossbred : Landrace Large White Duroc), with an average BW of 24.6 kg, were allotted to one of two groups of 2 pigs on the basis of their body weight. The four pigs were housed individually in metabolism cages. The experiment was conducted according to a 2 x 2 Latin square design with 5 weeks for each period. The pigs were fed ad libitum with one of the two experimental diets (beef tallow ; BT or sunflower oil ; SO) and had free access to drinking water throughout the experiment. The ingredients and macronutrient composition of the diets are shown in Table 1.

Table 1. Ingredient and analyzed composition of the diets on as-fed basis

	Beef tallow diet	Sunflower oil diet
Raw materials (%)		
Cassava chips	45.53	45.53
Soybean meal (44% CP)	34.00	34.00
Extruded soy beans	7.00	7.00
Beef tallow	5.00	-
Sunflower oil	-	5.00
Molasses	4.00	4.00
Calcium carbonate	1.00	1.00
Di-calcium phosphate	2.70	2.70
NaCl	0.35	0.35
DL-Methionine	0.17	0.17
Premix*	0.25	0.25
Analyzed macronutrients (%)		
Dry matter	86.5	86.3
Crude protein	19.3	19.2
Crude fat	6.8	6.7
Dietary fiber	4.7	4.9
Ash	7.7	8.2

*1 kg of vitamin and mineral premix contained: 325,000 IU vitamin A; 75,000 IU vitamin D3; 75 IU vitamin E; 1 mg vitamin B12; 80 mg vitamin K3; 300 mg riboflavin; 1,200 mg niacinamide; 540 mg pantothenic acid; 6,000 mg choline chloride; 4,700 mg Fe; 6,500 mg Zn; 4,500 mg Mn; 20 mg Co; 1,400 mg Cu and 45 mg I.

Sample collection and analysis

Amounts of feed offered were recorded and was any feed remains were weighed. At 5 and 10 weeks after the start of the experiment and after the adaptation period, faeces of all individual pigs were quantitatively collected for 24 hours a day on 7 consecutive days. The bags were weighed and kept at -20°C until analysis. Feed and faecal samples were collected for chemical analyses (AOAC, 1990).

The dried samples of diets and faeces were extracted as described previously (Horwitz, 1975). Each sample was added to a flask and 2 ml of ethanol was added. Subsequently, 10 ml of HCl (8 mol/L) was added; the content was gently mixed, and the flask was placed in a water-bath of 80°C for 30–40 min. The tubes were cooled down, 10 ml of ethanol (96%, w/w) and 25 ml of petroleum ether (boiling point between 40 and 60°C) were added and the tube was shaken for one min. The fat-containing upper layer was decanted into a 150-ml round-bottom flask. The extraction procedure was repeated twice with 15 ml of diethyl ether and 15 ml of petroleum ether and the lipid extract was evaporated to dryness under N_2 in a water-bath of 40°C . The round-bottom flasks with the lipids were dried overnight at 60°C and the total lipids were measured gravimetrically. Total lipids, the small samples of adipose tissue and the dripping oil were saponified and methylated according to the procedure of Metcalfe et al. (1966) followed by gas chromatography for determination of fatty acid composition (Javadi et al., 2004).

Statistical analysis

The effect of dietary treatments on fat and fatty acid digestibility statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) assuming a linear model (SAS, 1996). Differences between treatments were considered to be significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, beef tallow and sunflower oil were equally added into the experimental diets. Consequently, the fatty acid composition of each diet depended on the fatty acid pattern of supplemented fat or oil. Beef tallow mainly consists of saturated fatty acids (SFA, 53% of total fat), while sunflower oil mainly contains polyunsaturated fatty acids (PUFA, 51% of total fat).

The digestibilities of crude fat for the BT and SO diets are approximately 75% and 79%, respectively (Table 3). The absence of any significant effects of treatments could be due to the high variation in the obtained data. When the digestibilities of individual fatty acids are compared between both treatments, there was no difference in the digestibility of palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0) and oleic acid (C18:1 n-9) acid, whereas the digestibility of linoleic acid (C18:2 n-6) and α -linolenic acid (C18:3 n-3) was higher for pigs fed the sunflower oil diet (Table 3). The negative digestibility of stearic acid on the SO diet could be the result of the hydrogenation of undigested unsaturated fatty acids from the sunflower oil by microbes in the large intestine (Jørgensen et al., 2000). The higher digestibility of dietary

fat rich in linoleic acid, as opposed to fats rich in saturated fatty acids, is well known (Cera et al., 1989; Li et al., 1990). For poultry, fat digestibility was also increased, when the fat source in the feed contained more unsaturated fatty acids (Lessire and Leclereq, 1982). A higher formation of micelles with unsaturated instead of saturated fatty acids could be an explanation for this higher absorption (Stahly, 1984) and as a result, the higher fat digestibility in the pigs fed the diet with sunflower oil. Thus, diets containing unsaturated oils will generally provide pigs with more essential fatty acids and relatively more metabolizable energy (ME) than diets containing similar amounts of animal fat sources. However, in this study, the digestibility for MUFA was higher ($p<0.05$) for the pigs fed the SO diet, but there was no dietary effect on the digestibility of PUFA. The absence a significant effect on the digestibility of PUFA might be due to the low number of pigs in the current study. Therefore, a greater number of pigs should be included in any further research.

Table 2. Selected fatty acid composition of the experimental diets

	Beef tallow diet	Sunflower oil diet
<i>Fatty acid, g methylester/100 g methylesters</i>		
C 16:0 (Palmitic acid)	19.23	9.26
C 18:0 (Stearic acid)	29.48	4.34
C 18:1 n-9 (Oleic acid)	21.91	31.52
C 18:2 n-6 (Linoleic acid)	11.65	49.07
C 18:3 n-3 (α -linolenic acid)	1.63	1.42
Unidentified fatty acids	4.75	0.57
Σ Saturated fatty acids (SFA)	52.92	15.27
Σ Monounsaturated fatty acids (MUFA)	28.49	33.60
Σ Polyunsaturated fatty acids (PUFA)	13.65	50.54
Σ SFA = C8:0 + C10:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C24:0		
Σ MUFA = C14:1 + C15:1 + C16:1 + C17:1 + C18:1 n-7 + C18:1 n-9 + C20:1 n-9 + C22:1 n-9		
Σ PUFA = C18:2 n-6 + C18:3 n-3 + C18:3 n-6 + C18:4 n-3 + C20:5 n-3		

In conclusion, pigs fed the SO diet had a similar digestibility of crude fat, palmitic acid, stearic acid and oleic acid, but a higher digestibility of the essential fatty acids linoleic acid and α -linolenic acid when compared to pigs fed the BT diets. Thus, pigs fed the SO diet obtained more essential fatty acids and more metabolized energy from their diets.

Table 3. Digestibility of crude fat and individual fatty acids

	Beef tallow diet	Sunflower oil diet	Pooled SE	p-value
<i>Apparent faecal digestibility, % of intake</i>				
Crude fat	74.59	78.96	6.50	0.4426
C 16:0 (Palmitic acid)	71.11	78.90	6.97	0.2547
C 18:0 (Stearic acid)	50.35	-31.39	27.40	0.0518
C 18:1 n-9 (Oleic acid)	92.37	94.81	1.53	0.1522
C 18:2 n-6 (Linoleic acid)	91.10a	94.93b	0.66	0.0147
C 18:3 n-3 (α -linolenic acid)	90.43a	95.28b	0.63	0.0083
Σ Saturated fatty acids (SFA)	72.10	63.24	3.25	0.0613
Σ Monounsaturated fatty acids (MUFA)	91.37a	98.07b	0.57	0.0037
Σ Polyunsaturated fatty acids (PUFA)	94.97	95.72	0.70	0.2699

Σ SFA = C8:0 + C10:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C24:0

Σ MUFA = C15:1 + C16:1 + C18:1 n-9

Σ PUFA = C18:2 n-6 + C18:3 n-3 + C20:1 n-9

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology for providing the facilities, the Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University for the laboratory analysis, and the Mahanakorn University of Technology for the financial support.



References

- AOAC. 1990. Association of official analysis chemists, Washington DC.
- Cera, K.R., D.C. Mahan, and G.A. Reinhart. 1989. Apparent fat digestibilities and performance responses of postweaning swine fed diets supplemented with coconut oil, corn oil or tallow. *Journal of Animal Science* 67:2040-2047.
- Horwitz, W. 1975. *Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemist*, p. 225 *Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemist*, 12 ed. Benjamin Franklin Station, DC.
- Javadi, M., H. Everts, R. Hovenier, S. Kocsis, A.E. Lankhorst, A.G. Lemmens, J.T. Schonewille, A.H. Terpstra, and A.C. Beynen. 2004. The effect of six different C18 fatty acids on body fat and energy metabolism in mice. *Br J Nutr* 92:391-9.
- Jørgensen, H., V.M. Gabert, M.S. Hedemann, and S.K. Jensen. 2000. Digestion of fat does not differ in growing pigs fed diets containing fish oil, rapeseed oil or coconut oil. *J Nutr* 130:852-7.
- Lessire, M., and B. Leclereq. 1982. Metabolisable energy value of fats in chicks and adult cockerels, 365-374. *Animal Feed Science and Technology* 7:365-374.
- Li, D.F., R.C. Thaler, J.L. Nelssen, D.L. Harmon, G.L. Allee, and T.L. Weeden. 1990. Effect of fat sources and combinations on starter pig performance, nutrient digestibility and intestinal morphology. *J Anim Sci* 68:3694-704.
- SAS. 1996. *User's guide; Statistics Statistical analysis system inst.*, Cary, NC, USA.
- Stahly, T.S. 1984. *Use of fats in diets for growing pigs*. 1st ed. Anchor Bredon Ltd., Essex.

Review Study of the Comparison on Response of Estrus Induction in Dairy Cows by Intramuscular, Intraischiorectal fossa and Intravulvosubmucosa Injection of Prostaglandin $F_{2\alpha}$

Jatuporn Kajaysri*

Department of Clinic for Obstetrics and Gynecology Andrology and Artificial Insemination of Domestic animals,
Faculty of Veterinary medicine, Mahanakorn University of Technology, Nong-Chock, Bangkok 10530
Tel. 0 2988 3655 ext. 247, 107, Fax. 0 2988 4040, *Corresponding person; e-mail: paully95@hotmail.com

Abstract

The experiments were carried out in sixty crossbred Holstein Fresian of postpartum cycling dairy cows with Corpus luteum on the one side of ovary. The animals were divided in to three groups of twenty cows. Every cow in the first group was induced estrus with prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) analogue (Cloprostenol) by intramuscular (IM) injection with 500 μ g (2 ml/cow, full dose) Cloprostenol. In the second group every cow was induced estrus by injecting into intraischiorectal fossa (IRF) with 300 μ g (1.2 ml/cow, 60% of full dose) Cloprostenol. And every cow in the third group was injected intravulvosubmucosal (IVSM) on the same side of finding persistent Corpus luteum in the ovary with 125 μ g (0.5 ml/cow, 25% of full dose) Cloprostenol. The signs of estrus were detected in all of 60 cows on day 3 after $PGF_{2\alpha}$ injection. Every cow presented the sign of estrus with uterine contraction when cows were palpated by rectal palpation. The concentration of serum progesterone (P_4) levels and Estradiol (E_2) levels from each individual cows in all groups were lower than 0.1 ng/ml and above 7.17 pg/ml respectively. The mean and standard deviation values of Estradiol (E_2) levels from 20 cows of group 1, 2 and 3 after $PGF_{2\alpha}$ injection were 27.35 ± 8.09 pg/ml, 26.15 ± 9.07 pg/ml and 27.40 ± 6.61 pg/ml respectively. The mean $\pm$ SD of serum E_2 levels from all groups were not significantly different ($p > 0.05$). The confirmation of successful estrus synchronization after $PGF_{2\alpha}$ treatment with 3 above methods were done by Artificial Insemination (AI). The results showed that the pregnant cows in group 1, 2 and 3 were 75% (15/20 cows), 75% (15/20 cows) and 45% (9/20 cows) respectively. The data from this study indicates that the dose reduction at 40% of the $PGF_{2\alpha}$ full dose, injected via IRF and 75% of the full dose injected via IVSM produced similar estrus induction effectiveness comparable to that of IM full dose.

Keyword : Prostaglandin, Intramuscular, Intraischiorectal fossa, Intravulvosubmucosal, Dairy cow

Introduction

Anestrus cows has been known as the major problems in dairy production industry. Especially in case of anestrus postpartum cows are they prolong day open and calving interval that can cause economic loss (Mwaagna and Janowski, 2000). In Thailand Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) and its analogues have been used to produce luteolytic effects of Corpus luteum especially in luteal phase of bovine estrus cycle. $PGF_{2\alpha}$ can regress Corpus luteum and manipulate estrus in through its action by a decrease progesterone hormone and increase estrogen hormone in the blood (De Rensis and Peters, 1999). Several products of $PGF_{2\alpha}$ have been used in Thailand normally for inducing estrus with single dose > 25 mg/cow or double doses 15 and 10 mg/cow (24 hours interval period of injection) (Atthapinit et al., 2001) or with usually single dose of $PGF_{2\alpha}$ analogue (Cloprostenol) 500 μ g/cow, 2 ml (Virakul et al., 2001). Because of the cost of $PGF_{2\alpha}$ is considerably expensive and for the highest benefit of farmer to be worthwhile using $PGF_{2\alpha}$, clinicians and scientists try to reduce effective dose of $PGF_{2\alpha}$ to the minimum. Some studies in Thailand reported that the decreasing dose of $PGF_{2\alpha}$ has been administrated in dairy cows to intravulvosubmucosal (IVSM) or intrauterine (IU) at 25% of full dose (Wenkoff, 1984, Virakul et al., 2001) and inraischiorectal fossa (IRF) at 60% of full dose (Punyapornwithaya et al., 2005). Those results were presented that the dose of $PGF_{2\alpha}$ can be reduced when administrated by IVSM, IU and IRF methods. However, it is quite difficult to use IU methods as administration route in dairy cows in the field when compared to IVSM and IRF methods, but IRF method must use dose of $PGF_{2\alpha}$ higher than

decreasing dose of $PGF_{2\alpha}$ by IVSM administration methods.

The primary objective of this study is to compare the efficiency of decreasing dose of prostaglandin in between inraischiorectal fossa (IRF) and intravulvosubmucosal (IVSM) to intramuscular (IM) methods base on estrus response and concentration of serum estrogen hormone (Estradiol, E2) levels during estrus period of crossbred Holstein Friesian dairy cows under field condition in Thailand.

Materials and Methods

Experimental animals

Sixty crossbred Holstein Fresian of postpartum cycling dairy cows varying in ages between 3-10 years old from three farms in Chonburi and Ratchaburi provinces were studied. These farms were similar in general and reproductive management. All of experimental cows with body condition score 2.5-3.5 (5-scales; Edmonson et al., 1989) were chosen to examine by rectal palpation by one fixed veterinarian. The cows were housed in individual stall barns and could be free in grazing field near their barns area. This study was conducted during November 2004 to February 2005.

Estrus induction

All sixty postpartum cycling cows with Corpus luteum on ovary without other abnormality of reproductive tract to find out by rectal palpation were divided in 3 groups (each 20 cows/group) and induced estrus with prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) analogue. First control group was injected intramuscular (IM) with 500 μ g (2 ml/cow, full dose) Cloprostenol. Second experimental group

was injected in traischiorectal fossa (IRF) with 300 μg (1.2 ml/cow, 60% of full dose) Cloprostenol. Third experimental group was injected intravulvosubmucosal (IVSM) on the same side of finding persistent Corpus luteum in the ovary with 125 μg (0.5 ml/cow, 25% of full dose) Cloprostenol.

Estrus detection

Estrus detection was done on day 3 after $\text{PGF}_{2\alpha}$ injection in all groups of cows by visual observation of signs by the fixed veterinarian. The signs of estrus were detected by the presence of standing heat, mounting and riding other cows, vaginal mucous or uterine contraction when cows were palpated by rectal palpation.

Serum progesterone and estrogen hormonal assay

The experiment was designed to measure serum progesterone (P_4) and estrogen hormone (Estradiol, E_2) on day 3 after $\text{PGF}_{2\alpha}$ injection to find out the estrus cows by comparing the levels of hormones in Secondly experimental group and thirdly experimental group with Firstly control group. 20 ml of blood samples were collected by jugular vein puncture from each cow. The blood samples were allowed to clot overnight in a refrigerator. The serum was separated by centrifugation at 3,000 rpm for 15 minutes. Each serum sample was pipetted, collected and stored at -20°C until E_2 Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA) as previously described of Central Laboratory co., Ltd., Maung district Nonthaburi province.

Artificial Insemination and Pregnancy detection

Artificial Insemination was done with all of estrus cow in 3 groups at the time of estrus after

$\text{PGF}_{2\alpha}$ injection by the same skillful veterinarian throughout the experiment. The frozen semen (0.25 ml/dose) of Holstein Fresian used in AI was single dose/estrus cow which prepared from Lamphayaklang AI Bull Center, Department of Livestock Development at Lopburi provinces. Pregnancy detection was preformed with the same skillful veterinarian by rectal palpation method on day 60 after AI.

Statistical analysis

Estrus response of each group was defined: % of estrous cows that the cows showed signs or symptoms of estrus, serum progesterone (P_4) levels $< 0.1 \text{ ng/ml}$ (Virakul et al., 2001) and serum estrogen hormone (Estradiol, E_2) levels $\geq 7.17 \text{ pg/ml}$ when the cows were in estrus (Pavasuthipaisit et al., 1986). All values of Estradiol level from each individual cows in the same group were expressed as the mean and standard deviation. Statistical analysis were performed with Statistical package for the social sciences (SPSS) program version 11 by one way ANOVA method.

Results

The signs of estrus were detected in all of 60 cows on day 3 after $\text{PGF}_{2\alpha}$ injection. Every cow presented the sign of estrus with uterine contraction when cows were palpated by rectal palpation. The least of estrus cows showed the sign of mounting and riding other cows after $\text{PGF}_{2\alpha}$ injection. The sign of estrus response were expressed in table 1.

Table 1 The sign of estrus response of all estrus cows in 3 groups after PGF_{2α} injection at IM, IRF and IVSM

Parameter	Value (no./total) of estrus cows after PGF _{2α} injection at IM	Value (no./total) estrus cows after PGF _{2α} injection at IRF	Value (no./total) estrus cows after PGF _{2α} injection at IVSM
-Percentage cows showed the sign of standing heat	25% (5/20)	45% (9/20)	15% (3/20)
-Percentage cows showed the sign of mounting and riding other cows	15% (3/20)	10% (2/20)	20% (4/20)
-Percentage cows showed the sign of vaginal mucous	40% (8/20)	45% (9/20)	50% (10/20)
-Percentage cows showed the sign of uterine contraction	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)

The concentration of serum progesterone (P₄) levels and serum Estradiol (E₂) levels from each individual cows in all of 3 groups < 0.1 ng/ml and > 7.17 pg/ml respectively. The mean and standard deviation values of Estradiol (E₂) levels from 20 cows of group 1 after PGF_{2α} injection at IM, from 20 cows of group 2 after PGF_{2α} injection at IRF and from 20 cows of group 3 after PGF_{2α} injection at IVSM were 27.35±8.09 pg/ml, 26.15±9.07 pg/ml and 27.40±6.61 pg/ml respectively. The mean±SD of serum E₂ levels from all of 3 groups were not significant different (p > 0.05) and expressed in table 2.

Table 2 The mean±SD of serum E₂ levels from all cows of each group on day 3 after PGF_{2α} injection.

Group no.	Parameter	Value (pg/ml)
1	Mean±SD of serum E ₂ levels from 20 cows after PGF _{2α} injection at IM	27.35±8.09*
2	Mean±SD of serum E ₂ levels from 20 cows after PGF _{2α} injection at IRF	26.15±9.07*
3	Mean±SD of serum E ₂ levels from 20 cows after PGF _{2α} injection at IVSM	27.40±6.61*

* No differential significant (p > 0.05)

The result of pregnancy detection from all cows of 3 groups by rectal palpation method showed in table 3. The number of pregnant cows from the first and the second group were similar but the least number of pregnant cows was found from the third group.

Table 3 The result of pregnancy detection from all cows of 3 groups by rectal palpation method on day. 60 after AI.

Group no.	Parameter	Value (no./total)
1	Percentage of pregnant cows	75% (15/20)
2	Percentage of pregnant cows	75% (15/20)
3	Percentage of pregnant cows	45% (9/20)

Discussion

The results from this study showed that use of PGF_{2α} injection with full dose at IM or reduce dose at IRF or IVSM, can synchronize estrus in dairy cows and improve estrus cow by the sign of estrus detection and the concentration of serum progesterone (P₄) levels and serum Estradiol (E₂) levels. From this experiment showed the sign of estrus with uterine contraction when cows were palpated by rectal palpation in all of 60 cows after PGF_{2α} treatment. But the estrus sign of mounting and riding other cows was found in the least number (9 cows) of estrus cows. It was observed that the sign of estrus was difference in each cow. Because it depended on the individual cow, estrus detection (Pursley et al., 1997) and the stage of follicular growth in ovary at the time of luteal regression (De Rensis and Peters, 1999). For the concentration of serum progesterone (P₄) levels < 0.1 ng/ml and Estradiol (E₂) levels > 7.17 pg/ml were found in all of 60 cows that express all 60 cows were in estrus period (Virakul et al. 2001, Pavasuthipaisit et al., 1986). The mean±SD of serum E₂ levels from 20 cows in group 2 on day 3 after PGF_{2α} injection at IRF with the mean±SD of serum E₂ levels from 20 cows in group 3 on day 3 after PGF_{2α} injection at IVSM were similarly (p > 0.05) and this both groups had the mean±SD

of serum E₂ levels not significant difference from the mean±SD of serum E₂ levels from 20 cows in group 1 on day 3 after PGF_{2α} injection at IM (p > 0.05). The confirming of successfully estrus synchronization after PGF_{2α} treatment at IRF and IVSM with IM were pregnancy detection of cow after AI by rectal palpation. They were found, had the pregnant cows in all of 3 groups about on day 60 after estrus synchronization and AI. Although in the third group was found percentage of pregnant cows less than the first and the second groups. Because the conception rate of estrus cow after synchronization might be also depending on many other factors.

Then in this study presented that the using of reduced dose PGF_{2α} by injection at IRF or IVSM with IM to synchronize estrus cows were more similarly efficiency. It was similar to the previous report of Atthapinit et al. (2001), Colazo et al. (2002a), Colazo et al. (2002b), Horta et al. (1986), Punyapornwithaya et al. (2005) or Virakul et al. (2001).

The success of estrus synchronization by reduced dose PGF_{2α} injection at IRF was discussed by Colazo et al. (2002a). The PGF_{2α} was deposit in fat tissue of subcutaneous when it was injected into IRF. Its distribution from injection area to blood flow was prolonging. The large number of PGF_{2α}

signals and more effectively CL luteolysis were done from this mechanism. For Atthapinit et al. (2001) discussed the success of estrus synchronization by reduced dose $\text{PGF}_{2\alpha}$ injection at IVSM. The $\text{PGF}_{2\alpha}$ would be deposit in fat tissue of vulva-submucosa and absorpted to utero-ovarian vein for effectively CL luteolysis on ovary in the same side of injection area.

Conclusion

We can conclude, based on economic benefit, from this study that the using of reduced

40% $\text{PGF}_{2\alpha}$ from full dose injection at IRF and 75% $\text{PGF}_{2\alpha}$ from full dose injection at IVSM will produce full effective route for estrus synchronization in dairy cows.

Acknowledgements

The finance was supported by Mahanakorn University of technology. The Authors thank to Dr.Samphan Singhajan and Asst. Prof. Dr.Udom Tipayamontri for their beneficial advices in this study, Dr.Apiradee Intarapuk for statistic analysis.



References

- Atthapinit, P., Ratanadheb, C. and Krasairsintukomol, V. 2001. Intravulva technique for prostaglandin $F_{2\alpha}$ synchronization in beef cows. *Artif. Insem Bulletin*. 11 (2): 18-25.
- Colazo, M.G., Martinez, M.F., Kastelic, J.P., Mapletoft, R.J. and Carruthers, T.D. 2002a. The ischiorectal fossa : an alternate route for the administration of prostaglandin in cattle. *Can. Vet. J.* 43 (7): 535-541.
- Colazo, M.G., Martinez, M.F., Kastelic, J.P. and Mapletoft, R.J. 2002b. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 72: 47-62.
- De Rensis, F and Peters, A.R. 1999. The control of follicular dynamics by $PGF_{2\alpha}$, GnRH, hCG and oestrus synchronization in cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 34: 49-59.
- Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Faver, T., and Webster, G. 1989. A body condition scoring chart of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72: 68-78.
- Horta, A.E.M., Costa, C.M.S.G., Robalo, S.J. and Rios, V.M.L. 1986. Possibility of reducing the luteolytic dose of Cloprostenol in cycling dairy cows. *Theriogenology* 25: 291-301.
- Mwaagna, E.S. and Janowski, T. 2000. Anoestrus in dairy cows: Causes, prevalence and clinical forms. *Reprod. Dom. Anim.* 35: 193-200.
- Pavasuthipaisit, K., Boabucha, W., Trivitayaratn, C., Punprapa, M. and Kijisuksa, S. 1986. Optimal period for artificial insemination in cows by measurement of reproductive hormones. *Thai. J. Vet. Med.* 16 (1): 17-30.
- Punyapornwithaya, V., Pintana, P., Chokeboonmongkol, C., Rangabpit, E. and Teepratimakorn, S. 2005. Characteristics of estrus response in dairy cows induced by a reduced dose of prostaglandin injecting at ischiorectal fossa. *KKU. Vet. J.* 15 (1): 79-85.
- Pursley, J.R., Michael, R.K. and Milo, C.W. 1997. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J. Dairy Sci.* 80: 301-306.
- Virakul, P., Butchareon, S. and Suwimolteerabutr, J. 2001. Induction of estrus in postpartum dairy cows using a lowered dose of $PGF_{2\alpha}$ administered by intrauterine and intravaginosubmucosa injections. Present at: 27th Annual Conference of the TVMA. 24-26 October 2001. Bangkok.
- Wenkoff, M. 1984. Estrus synchronization in cattle. *Current veterinary therapy 3: Food animal practice.* Howard, L.J. (ed). W.B. Saunders Co., Philadelphia. P. 158.

การศึกษาบทบาท เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองต่อการใช้ฮอร์โมน พรอสตาแกลนดิน เหนียวนำการเป็นสัดในแม่โคนม ด้วยวิธีการฉีด เข้ากล้ามเนื้อ การฉีดเข้าแองไคนหาง และการฉีดเข้าเยื่อเมือกปากช่องคลอด

จุฑพร กระจายศรี*

ภาควิชา คลินิกสำหรับสัตว์-โค แพทย์ฯ แอนโดรวิทยา และการผสมเทียมของสัตว์เลี้ยง
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ถนนจอก กรุงเทพฯ 10530

โทรศัพท์ 0 2988 3655 9 ต่อ 247, 107, โทรสาร 0 2988 4040 *ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ; e-mail: paully95@hotmail.com

บทคัดย่อ

แม่โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ ฟรีเซียน หลังคลอดลูก มีวงรอบการเป็นสัดปกติ และมีคอร์ปัส ลูเทียม อยู่บน
รังไข่ข้างใดข้างหนึ่ง จำนวน 60 ตัว ถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว กลุ่มที่ 1 แม่โคทุกตัวถูกเหนียวนำ
ให้เป็นสัดด้วยการฉีดฮอร์โมน พรอสตาแกลนดิน ชนิดสังเคราะห์ (Cloprostenol) ขนาด 500 ไมโครกรัม
(2 มล./แม่โค 1 ตัว) ของ Cloprostenol เข้ากล้ามเนื้อ กลุ่มที่ 2 แม่โคทุกตัวถูกเหนียวนำให้เป็นสัดด้วยการฉีด
Cloprostenol ขนาด 300 ไมโครกรัม (1.2 มล./แม่โค 1 ตัว) เข้าแองไคนหาง และกลุ่มที่ 3 แม่โคทุกตัวถูก
เหนียวนำให้เป็นสัดด้วยการฉีด Cloprostenol ขนาด 125 ไมโครกรัม (0.5 มล./แม่โค 1 ตัว) เข้าเยื่อเมือก
ปากช่องคลอด พบว่า 3 วันหลังจากฉีด พรอสตาแกลนดินแม่โคทั้ง 60 ตัวแสดงอาการเป็นสัดโดยมีการบิพัดตัว
และเกิดโทนของมดลูกเมื่อถูกคลำผ่านทางทวารหนักของแม่โค นอกจากนี้ยังพบว่าระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน
โปรเจสเตอโรน และเอสตราไดออล ในซีรัมของแม่โคทุกตัวอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า 0.1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ
สูงมากกว่า 7.17 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยค่าเฉลี่ยระดับความเข้มข้นของ เอสตราไดออล ในซีรัม
ของแม่โคในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 คือ 27.35 ± 8.09 พิโคกรัม/มิลลิลิตร, 26.15 ± 9.07 พิโคกรัม/มิลลิลิตร และ
 27.40 ± 6.61 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยดังกล่าวของทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี
นัยสำคัญ ($p > 0.05$) และเพื่อยืนยันว่าการให้ฮอร์โมน พรอสตาแกลนดิน แบบทั้ง 3 วิธีดังกล่าวข้างต้น
สามารถเหนียวนำให้แม่โคเป็นสัดได้จริง จึงทำการผสมเทียมแม่โคทั้ง 60 ตัวนี้ที่เป็นสัดหลังถูกเหนียวนำ ผล
ปรากฏว่าในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีแม่โคตั้งท้อง 75% (15/20 ตัว), 75% (15/20 ตัว) และ 45% (9/20 ตัว)
ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน ในขนาดที่ลดลง 40% ของขนาด
เต็ม ฉีดเข้าตำแหน่งแองไคนหาง และในขนาดที่ลดลง 75% ของขนาดเต็ม ฉีดเข้าได้เยื่อเมือกปากช่องคลอด
มีประสิทธิภาพในการเหนียวนำการเป็นสัดในแม่โคนม ไม่ต่างจากวิธีการฉีดเต็มขนาดเข้ากล้ามเนื้อ

คำสำคัญ : พรอสตาแกลนดิน, เข้ากล้ามเนื้อ, เข้าแองไคนหาง, เข้าเยื่อเมือกปากช่องคลอด, โคนม

Sex Identification of Some Psittacine Birds by Polymerase Chain Reaction

Chanathip Thammakarn¹, Apichart Punchukrang²,
Kanya Jirajaroenrat¹, Kanokrat Srikijkasemwat¹

¹Department of Animal Production Technology, Faculty of Agricultural Technology,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

²The Subproject Graduate Study and Research in Agricultural Biotechnology, Faculty of
Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

Corresponding author : ktchanat@kmitl.ac.th

Abstract

Blood samples from many Psittacine birds including Green-cheeked conure (*Pyrrhura molinae*), Sun conure (*Aratinga solstitialis*), Rosella (*Platycercus* spp.), Amazon parrot (*Amazona* spp.), Congo african gray parrot (*Psittacus erithacus erithacus*) and Blue - and - gold macaw (*Ara ararauna*) were collected for sex identification by PCR - based method. The design of the P2/NP/MP primers was based on differences in sequences between CHD1W and CHD1Z genes using 3'-terminal mismatch primer on point mutation of the female CHD1W gene. We tested this set of primers with DNA samples extracted from a variety of these birds. The PCR amplification using the P2/NP/MP primers showed clearly different patterns of the PCR products between male and female birds of Green-cheeked conure, Sun conure, Rosella, Amazon parrot. For Congo african gray parrot and Blue - and - gold macaw, only male birds were identified. Therefore the results for these two species need to be confirmed by further testing. The results clarify that the PCR method using the P2/NP/MP primers is suitable for sex identification of some Psittacine birds. This method may be applied for sexing of other Psittacine bird species in the future.

Keyword : Psittacine bird, Sex identification, Chromo-helicase-DNA binding protein (CHD) gene, Polymerase chain reaction (PCR)

ผลของการลดขนาดฮอร์โมนเอฟเอสเอชต่อการตอบสนอง
การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่
และตัวอ่อนที่ได้ ในโคพันธุ์บราห์มัน : กรณีศึกษา
Effect of Reduced FSH Dose on Superovulatory
Response and Embryo Yield
in Brahman Cows : A Case Study

ณรงค์ เลียงเจริญ¹ อนนท์ เกื้อองสันติยะ¹ กิรติ ริแฉะ¹ บัณลือ กล่ำพู่¹
พีระพงษ์ สำราญกรวิทย์¹ สุรสิทธิ์ ดวงสอนยา² จุริยรัตน์ สำเร็จประสงค์³
และ มาลี อภิเมธีรัง¹

¹สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

²สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดมหาสารคาม จ.มหาสารคาม

³คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50100

บทคัดย่อ

จากการดำเนินงานย้ายฝากตัวอ่อนในโคพันธุ์บราห์มันในระยะเริ่มแรก การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ได้ใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอชขนาดตามน้ำหนักตัวที่แนะนำไว้บนฉลาก พบว่าตัวอ่อนคุณภาพดีที่เก็บได้มีจำนวนน้อย แต่มีไข่ที่ไม่ได้รับการผสมเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงทดลองใช้ขนาดฮอร์โมนเอฟเอสเอชที่ลดลงเพื่อกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ ในช่วงปี 2548-2550 ได้ทำการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในโคพันธุ์บราห์มัน จำนวน 34 ตัว โดยเป็นพันธุ์บราห์มันแดง (RAB) 2 ตัวและอเมริกันบราห์มัน (AB) 32 ตัว น้ำหนักตัวระหว่าง 400-550 กก. อายุระหว่าง 4-8 ปี โคทุกตัวได้รับฮอร์โมนเอฟเอสเอช (Folltropin®, Vetrepharm, Canada) ขนาด 200 มก. (10 มล.) ฉีดเข้ากล้ามเนื้อเป็นเวลา 3 วัน วันละ 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง แบ่งฉีดแบบลดโดส (2.5/2.5, 1.5/1.5 และ 1.0/1.0 มล.) ฉีดเข็มแรกวันที่ 9 หลังเป็นสัดยืนหนึ่ง จากการเหนี่ยวนำด้วย CIDR-B และ PGF2 จากนั้นเก็บตัวอ่อนวันที่ 7 หลังผสมเทียม นับจำนวน CL โดยการล้วงตรวจ ณวันที่เก็บตัวอ่อน จากการดำเนินงานเก็บตัวอ่อนทั้งหมด 46 ครั้ง ในโค 34 ตัว มีโค 5 ตัว (AB) ไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมน (10.86%) จึงไม่เก็บตัวอ่อน พบว่ามีจำนวน CL ทั้งหมด 481 จากการเก็บ 41 ครั้ง (1 ครั้งนับเป็นการเก็บ 1 ตัว) เก็บตัวอ่อน/ไข่ รวม 307 ใบ (อัตราการเก็บ 63.83%) เฉลี่ย 7.49 ใบ/ตัว เป็นตัวอ่อนคุณภาพย้ายฝากได้ (transferable embryos: A, B, C grades) จำนวน 224 ใบ เฉลี่ย 5.46 ใบ/ตัว เป็นตัวอ่อนคุณภาพแช่แข็งได้ (freezable embryos: A, B grades) จำนวน 203 ใบ เฉลี่ย 4.95 ใบ/ตัว ทำการฝากตัวอ่อนจำนวน 27 ใบ ในโคตัวรับ 27 ตัว โดยเป็นตัวอ่อนสด 12 ใบ ตัวอ่อนแช่แข็ง 15 ใบ ตรวจท้องด้วยอัลตราซาวนด์หลังฝาก 35-40 วัน พบว่าตัวรับท้องจากการฝากตัวอ่อนสด 8 ตัว (66.67%, 8/12) และจากตัวอ่อนแช่แข็ง 6 ตัว (40%, 6/15) ผลจากการศึกษาครั้งนี้ แสดงว่า สามารถใช้ฮอร์โมนกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ (Folltropin®) ขนาด 200 มก.ได้ โดยค่าเฉลี่ยตัวอ่อนคุณภาพดีที่เก็บได้อยู่ในเกณฑ์สำหรับการย้ายฝากตัวอ่อนโคบราห์มัน

คำสำคัญ : การย้ายฝากตัวอ่อน โคบราห์มัน ตัวอ่อนคุณภาพย้ายฝากได้

การสำรวจความสัมพันธ์และความสอดคล้องระหว่างความเข้มข้น ของโปรเจสเตอโรนในซีรัมกับการแสดงออกของอาการเป็นสัดใน กระบือปลักไทย (*Bubalus bubalis*): การศึกษาเบื้องต้น

รัชฎาพร ไชยคุณ^{1, 2*} จันทรพิณ สุวิมลธีระบุตร² ชานชัย ทัศนฤกษ์³
จิรุตม์ รัตนเทพ³ มงคล เตชะกำพูน²

¹Department of Clinic for Obstetrics Gynaecology Andrology and Artificial Insemination of Domestic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Nong Chok, Bangkok 10530, Thailand

²Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³Chonburi Artificial Insemination Research Center, Banbung, Chonburi 20220, Thailand

บทคัดย่อ

การศึกษาเบื้องต้นนี้ใช้กระบือปลักไทยเพศเมีย จำนวน 18 ตัว ที่เลี้ยงตามฟาร์มเกษตรกรรายย่อยในเขตพื้นที่จังหวัดชลบุรี มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจความสัมพันธ์และความสอดคล้องระหว่างความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนในซีรัมกับการแสดงออกของการอาการเป็นสัด โดยกลุ่มตัวอย่างเป็นกลุ่มกระบือปลักที่ได้รับแจ้งให้บริการผสมเทียม ทำการเก็บตัวอย่างเลือดและบันทึกลักษณะอาการเป็นสัด ณ วันผสมเทียม นำตัวอย่างซีรัมตรวจหาระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยวิธี Solid-phase¹²⁵ I-radioimmunoassay (RIA) ผลการทดลองพบว่าค่ามัธยฐานของระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัมของแม่กระบือทั้ง 18 ตัว เท่ากับ 0.215 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า 0.155 และ 0.315 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรที่ระดับเปอร์เซ็นต์ไทล์ 25 และ 75 ตามลำดับ ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 0.12-1.56 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ถึงแม้ว่าการเป็นสัดจากการสังเกตและการเป็นสัดโดยคาตการณ์จากระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัมไม่มีความสัมพันธ์กันและสอดคล้องกันเพียงเล็กน้อย แต่พบว่ากระบือที่สังเกตพบอาการเป็นสัดและมีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัมต่ำกว่า 0.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีโอกาสผสมติดมากที่สุด อย่างไรก็ตามการเพิ่มขนาดกลุ่มตัวอย่างในการศึกษาครั้งต่อไปอาจได้ผลความแตกต่างทางสถิติที่ชัดเจนและมีระดับความน่าเชื่อถือมากขึ้น

คำสำคัญ : กระบือปลัก โปรเจสเตอโรน ระยะสัด การผสมเทียม

Investigation of Relationship and Agreement between Serum P4 Concentration and Estrous Signs in Thai Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*): A Preliminary Study

T. Chaikhun^{1, 2 *}, J. Suwimontheerabut², C. Usawarerker³,
J. Ratanadhep³ and M. Techakumphu²

¹Department of Clinic for Obstetrics Gynaecology Andrology and Artificial Insemination of Domestic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Nong Chok, Bangkok 10530, Thailand

²Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³Chonburi Artificial Insemination Research Center, Banbung, Chonburi 20220, Thailand

Abstract

This preliminary study was carried out in eighteen female Thai swamp buffaloes in small holding farms in Chonburi Province. The objective of this study is to investigate of relationship and agreement between serum progesterone (P4) concentration and estrous signs. All buffaloes were inseminated by inseminator service. Blood samples were collected and the estrus signs on insemination day were recored. Then serum were detected the progesterone concentration by Solid-phase¹²⁵I-radiimmunoassay (RIA). The results showed that the median for the P4 concentration is 0.215 ng/ml with 25th and 75th percentile at 0.155 ng/ml and 0.315 ng/ml, respectively. The range of the P4 concentration is 0.120 to 1.560 ng/ml. Although, the agreement between both methods is slight and fair indicating very low relationship between the methods used. However, the buffalo that have estrous signs and more than 0.04 ng/ml P4 were highly successful to conception. Therefore, the further research needs a larger sample size to increase statistic power for detecting significant differences.

Keyword : swamp buffalo, progesterone, estrus, artificial insemination

บทนำ

การผสมเทียมเป็นเทคโนโลยีชีวภาพอย่างแรกที้นำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตสัตว์

เกือบทุกชนิด รวมไปถึงกระบือซึ่งได้นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศที่เลี้ยงกระบือเพื่อผลิตน้ำมัน ซึ่งการผสมเทียมสามารถลดปัญหาการระบาดของโรคเนื่องจากการเคลื่อนย้ายสัตว์ และโรคติดต่อจากการผสมพันธุ์ได้ อีกทั้งสามารถพัฒนาพันธุ์กรรมของฝูงได้อย่างรวดเร็วและสะดวกในการปฏิบัติ ส่วนประเทศไทยนั้นการผสมเทียมกระบือแม้ว่าได้มีการพัฒนามากไม่น้อยกว่า 50 ปี แต่ยังไม่เป็นที่นิยมมากนักเนื่องจากมีอุปสรรคของการผสมเทียมในกระบือที่สำคัญที่สุดคือปัญหาที่แม่กระบือไม่แสดงอาการเป็นสัดชัดเจน ทำให้การกำหนดเวลาผสมเป็นไปได้ยาก (Presicce et al., 2004; De Araujo Berber et al., 2002; De Rensis et al., 2005; Campanile et al., 2005; Paul and Prakash, 2005; Neglia et al., 2003; Madam and Raina, 1984.; Madam, 1998; Lohachit et al., 2006) สำหรับเทคนิคการผสมเทียมกระบือในประเทศไทยทั้งการจับสัด ระยะการเป็นสัด การสังเกตอาการเป็นสัดและการกำหนดเวลาผสมจะใช้หลักการเช่นเดียวกันกับโค คือ กำหนดเวลาผสมเทียมหลังจากกระบือเป็นสัดยืนนิ่งให้ตัวอื่นขึ้นป็น (standing heat) 12 ชั่วโมง แต่กระบือมีความแตกต่างจากโค โดยกระบือจะไม่ค่อยแสดงอาการสัดต่างๆ ให้เห็นเด่นชัด หรือเป็นสัดเงียบ (Silent heat) ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 28 ชั่วโมง จากการรายงานของ Chantalakhana (1992) พบว่าช่วงระยะการเป็นสัดในกระบือปลักอยู่ระหว่าง 12-36 ชั่วโมง หรือนานถึง 3-5 วัน อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่รายงานว่าอยู่ในช่วง 24-36 ชั่วโมง และมีการตกไข่ 6-21 ชั่วโมง หลังสิ้นสุดการเป็นสัด (เฉลี่ย 13.3 ชั่วโมง) (Kanai and Shimizu, 1983) ทั้งนี้มีการใช้เทคโนโลยีหลากหลายนำมาใช้สำหรับตรวจหาระยะต่างๆ ในวงจรการเป็นสัดในกระบือ และวิธีที่ค่อนข้างนิยมและเป็น

ที่ยอมรับคือการตรวจหาระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน โดยมีรายงานการวิจัยตรวจหาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยวิธี Radioimmunoassay (RIA) ในกระบือปลักไทยครั้งแรกในปี 1976 (Kamonpatana et al., 1976) ซึ่งสามารถนำมาใช้ศึกษาสภาพของระบบสืบพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ในวงจรการเป็นสัดของกระบือมาแล้วทั่วโลก ได้แก่ การศึกษาของ Kumad (1999) ในกระบือมูร่าห์ พบว่าระดับของฮอร์โมน โปรเจสเตอโรนจะสูงสุดประมาณ วันที่ 13-15 ของวงจรการเป็นสัด และจะมีค่าระหว่าง 0.13-0.27 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในช่วงเป็นสัดทั้งกระบือปลักและกระบือมูร่าห์ แต่จะยังไม่เปลี่ยนแปลงจนกว่าหลังวันที่ 5 โดยฮอร์โมนจะเพิ่มขึ้นตามลำดับจนกระทั่งวันที่ 14-16 มีค่าประมาณ 1.51-2.6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในกระบือปลัก ขณะเดียวกันเมื่อเทียบกับกระบือมูร่าห์จะอยู่ที่ 4.0-4.26 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร Chua et al. (1983) รายงานว่าระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในพลาสมาในช่วงเป็นสัดเท่ากับ 0.24 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.76 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 12-14 โดยที่ Leenauuraksa และคณะ (1979) พบว่า ในวันที่ทำการผสมระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะอยู่ในระดับต่ำประมาณ 0.16 ± 0.20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัดว่าการกำหนดเวลาผสมเทียมที่กระทำกันในพื้นที่ (12 ชั่วโมงหลังเป็นสัดยืนนิ่ง) เป็นเวลาที่เหมาะสมอยู่ในระยะการเป็นสัดและสามารถนำมาใช้ในกระบือปลักไทยได้จริงหรือไม่ อีกทั้งไม่มีการรายงานว่าการเกษตรกรผู้เลี้ยงกระบือในพื้นที่ที่สามารถจับสัดได้มีประสิทธิภาพเพียงใด รวมถึงเวลาผสมของเจ้าหน้าที่ผสมเทียมเหมาะสมหรือไม่

จากปัญหาดังกล่าวคณะผู้วิจัยจึงมีความต้องการศึกษาเบื้องต้นเพื่อสำรวจความสัมพันธ์และความสอดคล้องระหว่างความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนใน

เข้าร่วมการแสดงผลของการอาการเป็นสัดในกระป๋อง
ปลั๊กไทยของฟาร์มเกษตรกรรายย่อย ในเขตพื้นที่
จังหวัดชลบุรี

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

กระป๋องที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นกระป๋องปลั๊ก
ไทยอายุระหว่าง 4 - 8 ปี เป็นกระป๋องสาว 6 ตัว และ
กระป๋องนาง 12 ตัว จากฟาร์มเกษตรกรรายย่อยใน
เขตพื้นที่จังหวัดชลบุรี โดยเลี้ยงแบบปล่อยแปลงหญ้า
ไม่มีพ่อกันดักระป๋องคอก และได้ผ่านการตรวจ
อวัยวะสืบพันธุ์โดยการส่องตรวจผ่านทางทวารหนัก
ก่อนเข้ารับการศึกษาว่ามีลักษณะเป็นปกติ

วิธีการศึกษา

เกษตรกรจะแจ้งเจ้าหน้าที่ผสมเทียมเมื่อสังเกต
พบว่ากระป๋องแสดงอาการเป็นสัด ได้แก่ อวัยวะเพศ
บวมแดง ร้องกระวนกระวาย มีเมือกใสไหลออกมา
จากช่องคลอด และกระป๋องตัวอื่นขึ้นป็น (การจับสัด
ของเกษตรกรอาจพบว่ากระป๋องอาจแสดงอาการเป็น
สัดเพียงบางอาการเท่านั้น) หลังจากนั้นเจ้าหน้าที่
ผสมเทียมจะเข้าพื้นที่เพื่อผสมเทียม 12 ชั่วโมง หลัง
จากได้รับแจ้งจากเกษตรกร บันทึกลักษณะอาการ
เป็นสัดขณะผสม ได้แก่ อวัยวะเพศบวมแดง มีเมือกใส
ไหลจากช่องคลอด การหดเกร็งของมดลูก และ
สามารถสอดป็นผสมเทียมไปยังปากมดลูก โดย
กำหนดว่ากระป๋องอยู่ในระยะเป็นสัด (estrus) หาก
พบว่ามีอาการหดเกร็งของมดลูกและสามารถสอดป็น
ผสมเทียมไปยังปากมดลูกได้ และเจาะเก็บเลือดจาก
Jugular vein ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยหลอดเก็บ
ซีรัม (Monovette®, SARSTEDT, Germany) ตั้งทิ้งไว้ที่
อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง และแยกซีรัมด้วย
เครื่องปั่นความเร็วสูง (Centrifuge) 3,000 รอบ 5
นาที เก็บซีรัมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดขนาด 1.5
มิลลิลิตร (Microtube) นำไปแช่แข็งรักษาไว้ที่อุณหภูมิ
-70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำตัวอย่างมาวิเคราะห์

หาระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วย
วิธี Solid-phase¹²⁵ I-radioimmunoassay (RIA)
(Coat-a-Count®, Diagnostic Products; Los Ange-
les, CA, USA)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

คำนวณค่ามัธยฐานของระดับความเข้มข้นของ
ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัมของกระป๋องทั้งหมด
เนื่องจากการแจกแจงความถี่ของข้อมูลเป็นแบบไม่ปกติ
วิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์และระดับความสอดคล้อง
กันของการเป็นสัดจากการสังเกตและการเป็นสัดโดย
คาดการณ์จากระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัม โดยเลือกจุดตัด (cutoff) ของระดับ
ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ 0.2, 0.4
และ 1.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และวิเคราะห์ความ
สัมพันธ์ระหว่างการวัดสองวิธี ด้วยโปรแกรม SPSS
for Windows version 11.5 (Chicago, IL, SPSS Inc.)
โดยวิธี Fisher's exact test และความสอดคล้อง
ระหว่างการวัดทั้งสองวิธีด้วย โปรแกรม Winepiscope
2.0 (Borland International Inc.) โดยวิธี Kappa
statistics ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลและอภิปราย

ค่ามัธยฐานของระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน
โปรเจสเตอโรนในซีรัมของแม่กระป๋องทั้ง 18 ตัว เท่ากับ
0.215 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับเปอร์เซ็นต์ไทล์
25 และ 75 มีค่าเท่ากับ 0.155 และ 0.315 นาโน
กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นของฮอร์โมน
โปรเจสเตอโรนทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 0.12 - 1.56
นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง 1 ผลการวิเคราะห์ด้วยตาราง 2 X 2 แสดงความสัมพันธ์ของการเป็นสัดจากการสังเกตและการเป็นสัดโดยคาดการณ์จากระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัม (เลือกค่าจุดตัดระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ 0.20, 0.40 และ 1.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

Cutoff at P4 = 0.20 ng/ml	Oestrus	Non-oestrus	Total
Expected oestrus ($p4 \leq 0.20$ ng/ml)	6 (75.0%)	2 (40.0%)	8
Expected non-oestrus ($p4 > 0.20$ ng/ml)	9 (90.0%)	1 (10.0%)	10
Total	15	3	18

Fisher's exact test; $p = 0.559$

Cutoff at P4 = 0.40 ng/ml	Oestrus	Non-oestrus	Total
Expected oestrus ($p4 \leq 0.40$ ng/ml)	13 (86.7%)	2 (13.7%)	15
Expected non-oestrus ($p4 > 0.40$ ng/ml)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	3
Total	15	3	18

Fisher's exact test; $p = 0.442$

Cutoff at P4 = 1.00 ng/ml	Oestrus	Non-oestrus	Total
Expected oestrus ($p4 \leq 1.00$ ng/ml)	14 (87.5%)	2 (12.5%)	16
Expected non-oestrus ($p4 > 1.00$ ng/ml)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	2
Total	15	3	18

Fisher's exact test; $p = 0.314$

ตาราง 2 แสดงระดับความสอดคล้องระหว่างการเป็นสัดจากการสังเกตและการเป็นสัดโดยคาดการณ์จากระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัม ด้วยวิธีวิเคราะห์ทางสถิติ (Kappa statistics) โดยเลือกค่าจุดตัดระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ 0.20, 0.40 และ 1.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

	Kappa^a	Classification of agreement
Cutoff at P4 = 0.20 ng/ml	-0.138 (-0.968; 0.692)	Slight agreement
Cutoff at P4 = 0.40 ng/ml	0.200 (-0.351; 0.751)	Fair agreement
Cutoff at P4 = 1.00 ng/ml	0.308 (-0.301; 0.916)	Fair agreement

^aThe numerical values inside the parentheses indicate the 95% confidence interval

จากตาราง 1 พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ของการเป็นสัตว์จากการสังเกตและการเป็นสัตว์โดยคาดการณ์จากระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัม ในทุกค่าจุดตัด (cutoff) ของระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ 0.20, 0.40 และ 1.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสังเกตจากค่า Fisher's exact test; $p = 0.559$, $p = 0.442$ และ $p = 0.314$ ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์ระดับความสอดคล้องระหว่างทั้งสองค่าดังกล่าวพบว่ามีความสอดคล้องกันในระดับน้อย (slight agreement) จนถึงระดับปานกลาง (fair agreement) โดยค่าความสอดคล้องกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีช่วงกว้างมากซึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องจากจำนวนสัตว์ทดลองที่น้อย อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าระดับความสอดคล้องของทั้งสองวิธีจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มค่าจุดตัดระดับการวิเคราะห์ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัม (cutoff) ดังแสดงในตาราง 2 เมื่อติดตามผลอัตราการตั้งท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวนด์ที่ 60 วันหลังผสมพบว่า กลุ่มกระปือที่เป็นสัตว์ทั้งจากการสังเกตและมีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนต่ำกว่า 0.20 และกลุ่มที่อยู่ระหว่าง 0.20-0.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากับ 37.5% (3/8) และ 57.14% (4/7) ตามลำดับ โดยที่กลุ่มที่มีค่ามากกว่า 0.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีตัวใดตั้งท้อง (0/3) ซึ่งสอดคล้องกันกับการศึกษาระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในพลาสมาช่วงระยะสัดของกระปือแม่น้ำอยู่ที่ 0.13 - 0.27 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Chua et al., 1983; Jainudeen et al., 1981 and Kumad, 1999) ซึ่งเป็นระยะที่กระปือแสดงอาการเป็นสัตว์ชัดเจนและมีโอกาสผสมติดมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้โดยพบว่ากระปือที่สังเกตพบอาการเป็นสัตว์และมีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัมต่ำกว่า 0.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีโอกาสผสมติดมากที่สุด อย่างไรก็ตามมีกระปือที่มีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัม

ต่ำกว่า 0.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่การเป็นสัตว์จากการสังเกตไม่ชัดเจนโดยเฉพาะสัดป็นผสมเทียมไม่ผ่านเข้าปากมดลูกทั้งนี้อาจเป็นเพราะกระปือดังกล่าวเป็นกระปือสาวทั้งหมด (2/2)

จากการศึกษาเบื้องต้นนี้ พบว่าการเป็นสัตว์จากการสังเกตและการเป็นสัตว์โดยคาดการณ์จากระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัมไม่มีความสัมพันธ์กันและสอดคล้องกันเพียงเล็กน้อย แต่พบว่ากระปือที่สังเกตพบอาการเป็นสัตว์และมีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัมต่ำกว่า 0.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีโอกาสผสมติดมากที่สุด อย่างไรก็ตามการเพิ่มขนาดกลุ่มตัวอย่างในการศึกษาครั้งต่อไปอาจได้ผลความแตกต่างทางสถิติที่ชัดเจนและมีระดับความน่าเชื่อถือมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณความร่วมมือร่วมใจจากเจ้าหน้าที่ผสมเทียมจากศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติในพื้นที่ ศูนย์อนุรักษ์และพัฒนาควายไทยในเครือเจริญโภคภัณฑ์ อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี ที่ได้อนุเคราะห์น้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์กระปือปลักไทยชั้นเยี่ยมเพื่อใช้ในการวิจัย อ.น.สพ.ดร.จำลอง มิตรชาวไทย และ อ.น.สพ.ดร.เอกชาติ พรหมดีเรกที่ให้คำปรึกษาแนะนำในด้านการวิเคราะห์ และเรียบเรียงข้อมูล และที่สำคัญขอขอบคุณกระปือทุกตัวและเกษตรกรทุกคนในเขตพื้นที่จังหวัดชลบุรีที่ให้ความร่วมมือและให้กำลังใจจนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี



เอกสารอ้างอิง

- Campanile, G., Neglia, G., Gesparrini, B., Galieno, G., Prandi, A. DiBlo, R. 2005. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. *Theriogenology*. 63: 2334-2340.
- Chantalakana, C. 1992. Genetics and breeding of swamp buffaloes . In Buffalo Production. The Natherlands: Elsevies Science Publishers B.V.
- Chau, L.n., Sarabia, S.S , Roxas, N.P., Nava, Z.M. and Momongan, V.G. 1983. Blood plasma progesterone in normal cycling and anestrous carabao heifers. Vth World Conference on Animal Production, Tokyo, Japan, Abstracts. pp 88.
- De Araujo Berber, R.C., Madureira, E.H. and Baruselli, P.S. 2002. Comparison of two Ovsynch protocols (GnRH versus LH) for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 57: 1421-1430.
- De Rensis, F., Ronci, G., Guarneri, P., Xuan Nguyen, B., Presicce, G.A. Huszenicza, G., and Scaramuzzi, R.J. 2005. Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementation in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 63: 1824-1831.
- Jaindudeen, M.R., Tan, H.S. and Bongso, T.A. 1981. Plasma progesterone profiles in relation to postpartum ovarian activity in the swamp buffalo. Second RCM Nuclear Techniques for Improving Buffalo Production, Bangkok, Thailand. pp. 159-171.
- Kamonpatana, M., Luvira, Y., Bodhipaksha, P. and Kunawongkrit, A. 1976. Serum progesterone, 17-Hydroxyprogesterone and 17- β oestradiol during estrous cycle in swamp buffalo in Thailand. On Nuclear Techniques in Animal Production and Health as Related to the Soil- plant System. IAEA. Vienna. 569- 578.
- Kanai, Y. and Shimisu, H. 1983. Characteristics related to oestrous cycle in the swamp buffalo under temperate conditions. The 5th World Conference on Animal Production, Tokyo, Japan, Abstract. 87.
- Kumud, N. 1999. Determination of plasma oxytocin profile in crossbred cows and murrah buffaloes using a sensitive EIA procedure. Ph.D. thesis submitted to National Dairy Research Institute, Karnal, Haryana, India.
- Leenanuraksa, D., Usanakarnkul, S. and Kamonpatana, M. 1979. Plasma progesterone level during early pregnancy of villaged swamp buffalo in Thailand. National Conference on Agriculture and Biological Science. Febuary., 1979. Kasetsart University, Bangkok.
- Lohachit, C., Sirivaidyapong, S. and Techakumphu, M. 2006. Treands in swamp buffalo reproductive biotechnology. International course of buffalo reproduction and reproductive biotechnology. 3rd ed. Bangkok: Chulalongkorn University. 91-96.
- Madam, M. L. 1998. Status of reproduction in female buffalo. Buffalo Production and Health: a compendium of lastest research information based on Indian studies. ICAR publication. New Delhi, India. 89-100.
- Madam, M. L. and Raina, V. S. 1984. Fertility and performance of buffaloes under tropical conditions. In: 10th Int. Congr. on Anim. Reprod. and Artificial Insemination. Illinois. 2: 142.1-142.4.
- Neglia, G., Gasparrini, B., Di Palo, R., De Rosa, C., Zicarelli, L. and Campanile, G. 2003. Comparison of pregnancy rates with two oestrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows. *Theriogenology*. 60: 125-133.
- Paul, V. and Prakash, B. S. 2005. Efficacy of the Ovsynch protocol for synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 64: 1049-1060.

การพัฒนาอุปกรณ์ฉีดยาสัตว์ระยะไกล

Development of veterinary injector (Vet remote injection equipment)

เฉลิมพงศ์ จิรพณศิริ¹ สมพิสตร์ พูนสุข²

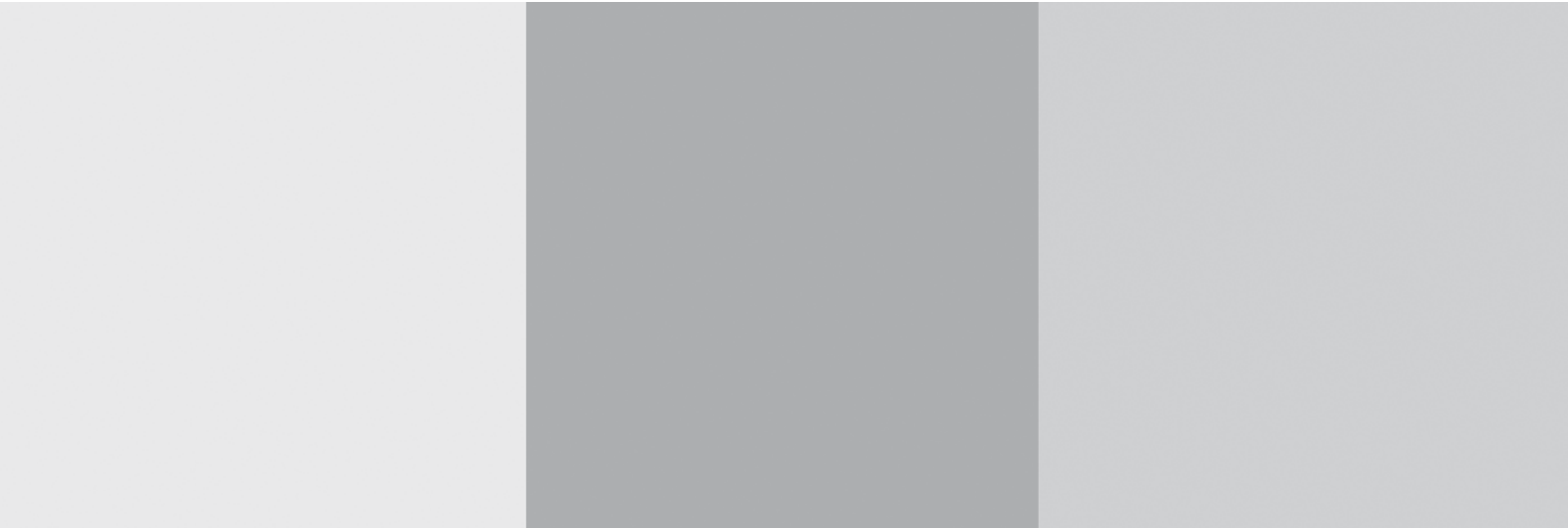
¹ สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดอุทัยธานี กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

² ภาควิชาช่างกลโรงงาน วิทยาลัยเทคนิค อุทัยธานี กรมอาชีวศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

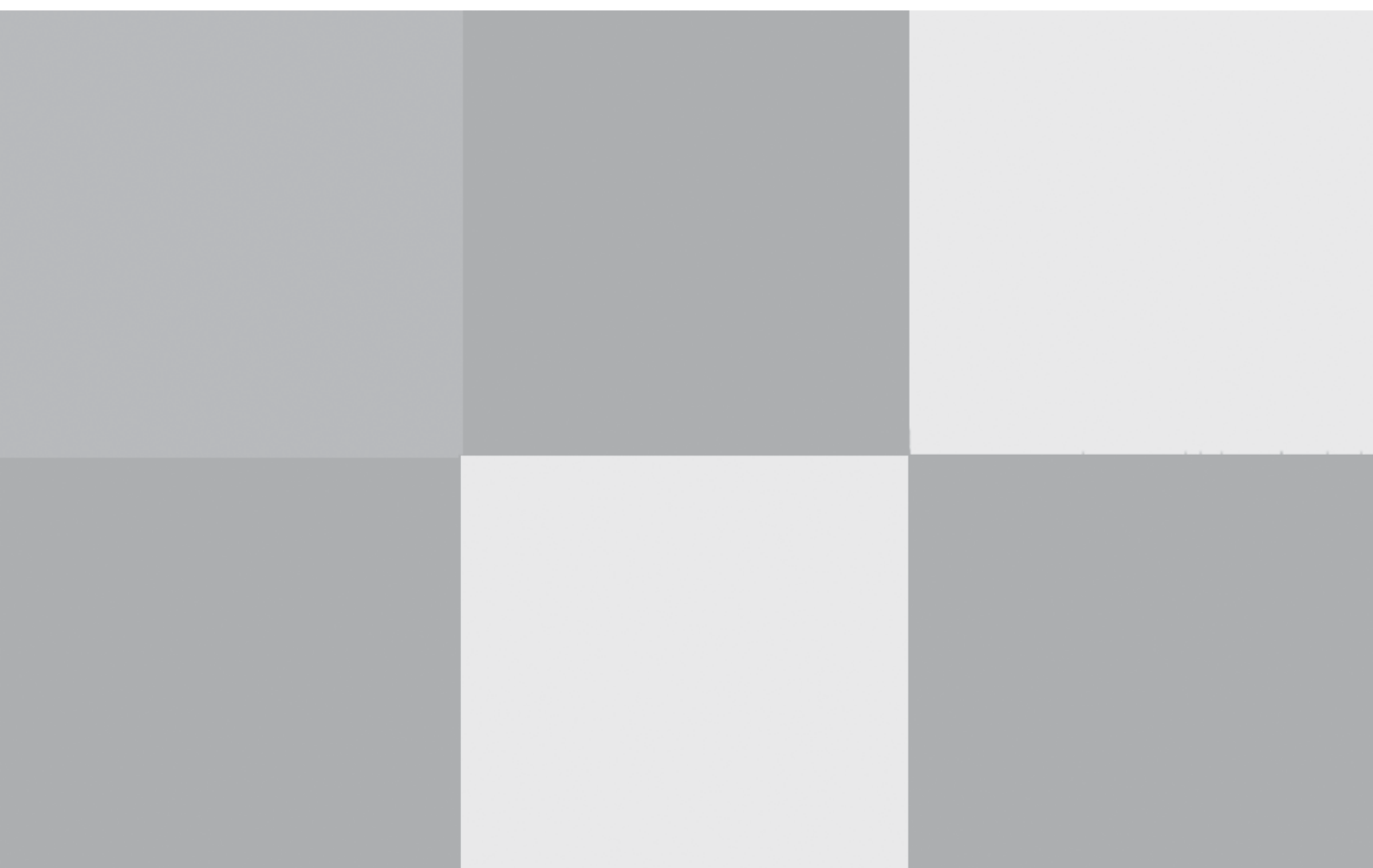
บทคัดย่อ

อุปกรณ์ฉีดยาสัตว์ระยะไกล หรือเครื่องมือยิงยาสลบสัตว์ เป็นเครื่องมือแพทย์เฉพาะทาง เพื่อให้ยาแก่สัตว์ระยะไกลเป็นอุปกรณ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศราคาแพงมาก อีกทั้งมีปัญหาด้านอะไหล่ การซ่อมแซมและบำรุงรักษา ผู้ทำการศึกษาได้คิดค้นและสร้างอุปกรณ์ขึ้นมา ในครั้งนี้เป็นการพัฒนาต่อเนื่องจากครั้งแรกได้เลือกใช้วัสดุตัวใหม่ที่หาได้ในประเทศ ประกอบด้วยตัวท่อลำกล้อง กล้องพักลม กลไกควบคุม โครงอุปกรณ์ เป็นโลหะผสมแมกนีเซียม/อลูมิเนียม(แมกนีเซียม อัลลอยด์) มีน้ำหนักเบา แข็งแรง ไม่เป็นสนิม และเคลือบผิวด้วยวิธีอะโนไดซ์เป็นสีที่สวยงาม สาวนลูกเลื่อนปิดท้าย และสปริงกลไกเป็นสแตนเลสไม่เป็นสนิม และด้ามไม้หลักการทำงานใช้ได้สะดวกรวดเร็วขึ้นจากการอัดอากาศจากปั๊มลม เป็นการใช้ก๊าซบรรจุกระป๋อง เต็มอัดเข้ากล่องเก็บลมให้ได้ความดันที่ต้องการ แล้วเหวี่ยงกลไกปล่อยก๊าซขับเคลื่อนลูกดอกบรรจุเวชภัณฑ์หรือวัคซีน ฟุ้งตรงไปยังตัวสัตว์ เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ฉีดยากล่อมประสาท ยาสลบ ในกรณีจับสัตว์ไม่ได้ เช่นสุนัขไม่มีเจ้าของ หรือเป็นสัตว์ดุร้าย สัตว์ป่า ปศุสัตว์ เพื่อบำบัดการทางอาชญากรรม ศัลยกรรม ฉีดวัคซีน ยาคุมกำเนิด เป็นการยิงวัคซีน หรือเวชภัณฑ์เหล่านี้เข้าไปในตัวสัตว์โดยตรง จากการพัฒนาในครั้งนี้ 2 นี้ สัตว์แพทย์หลายท่านนำไปใช้ในภาคสนามได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

คำสำคัญ : อุปกรณ์ฉีดยาสัตว์ระยะไกล ลูกดอกบรรจุเวชภัณฑ์



Poster Presentation



แกรนูโลมาจากเชื้อราที่ลำไส้ใหญ่ของสุนัข: case report

กนกศักดิ์ มะมม¹

¹ สาขาวิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ถนนจอก กม. 10530

บทคัดย่อ

ก้อนเนื้อขนาดใหญ่ที่ลำไส้ใหญ่ได้ถูกผ่าตัดออกมาพร้อมกับลำไส้บางส่วนจากสุนัขพันธุ์ไทยบางแก้ว เพศผู้ อายุ 3 ปี ที่มีประวัติท้องเสียเรื้อรัง ก้อนเนื้อมีลักษณะคล้ายก้อนมะเร็งลำไส้ใหญ่อยู่โดยไม่พบการแทรกตัวไปในท่อลำไส้ ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาจากก้อนเนื้อพบ การอักเสบแบบ แกรนูโลมาตัส โดยตรวจพบเส้นใยของเชื้อราชนิดแตกแขนงแต่ไม่มีข้อปล้องจำนวนมาก ยืนยันผลการตรวจด้วยการย้อมสีพิเศษสำหรับเชื้อรา ข้อมูลทางคลินิกและทางพยาธิวิทยาได้ถูกนำมาวิเคราะห์และวิจารณ์ในรายงานนี้

คำสำคัญ : แกรนูโลมา เชื้อรา ลำไส้ใหญ่ สุนัข จุลพยาธิวิทยา

Intramural fungal granuloma at colon in a dog: case report

Thanongsak Mamom¹

¹ Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology,
Bangkok, Thailand, 10530

Abstract

A large mass at colon was surgically removed from a 3-year-old male Thai-Bangkaew dog with a history of chronic diarrhea. Macroscopically, the mass entrapped colon without involvement of mucosal surface. Histopathologic examination revealed multifocal granulomatous inflammation with tremendous branched non-septate fungal hyphae which were confirmed by Grocott's and PAS staining. The clinical data and pathological diagnosis were discussed.

Keyword : granuloma fungal colon dog histopathology

มะเร็งเต้านมชนิด mixed mammary tumor ในแมว

อารยา อุนไพรวรรณ¹ และ กนกศักดิ์ มะมม²

¹ สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

² สาขาวิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร

บทคัดย่อ

แมวพันธุ์ผสมเพศเมียอายุ 10 ปี น้ำหนัก 4.1 กก. ไม่มีประวัติการใช้ฮอร์โมนคุมกำเนิด และได้รับการผ่าตัดนำมดลูกและรังไข่ออกไปแล้วเมื่ออายุ 2 ปี การตรวจทางคลินิกพบก้อนเนื้อขนาด 7x7 ซม. บริเวณเต้านมคู่ที่ 4 ก้อนเนื้อนี้มีลักษณะแตกเป็นแผล โดยพบเนื้อตายและหนองร่วมด้วย แมวได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดเอาก้อนเนื้อดังกล่าวออกไป และก้อนเนื้อดังกล่าวถูกส่งมาตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ผลการตรวจสรุปได้ว่าเป็นมะเร็งของเต้านม โดยพบเนื้อตายและการอักเสบร่วมด้วย หลังการผ่าตัดประมาณ 3 เดือน พบก้อนเนื้ออก ขนาด 6.5x6.5 ซม. โตขึ้นมามีบริเวณใกล้เคียงกับตำแหน่งเดิม สัตว์ได้รับการรักษาอีกครั้งโดยผ่าตัดเอาก้อนเนื้ออกและต่อมน้ำเหลืองที่อยู่บริเวณใกล้เคียงออกไป ก้อนเนื้อดังกล่าวถูกส่งมาตรวจทางจุลพยาธิวิทยาอีกครั้ง ผลการตรวจ พบกลุ่มของเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด ในก้อนเนื้อเดียวกันคือ มะเร็งของเซลล์บุผิวของต่อมน้ำนม และเซลล์มะเร็งที่มีรูปร่างเป็นรูปกระสวย โดยพบเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนด้วย นอกจากนี้ยังพบการเกิดเนื้อตายและเลือดออกในเนื้อเยื่อ ที่ต่อมน้ำเหลืองพบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยเซลล์มะเร็งดังกล่าวให้ผลบวกต่อ pancytokeratin marker และให้ผลลบต่อ vimentin ในการย้อมเนื้อเยื่อด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี แสดงว่าเป็นชนิดที่เจริญมาจากเซลล์บุผิวของต่อมน้ำนม ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาสรุปได้ว่าแมวเป็นมะเร็งเต้านมชนิด malignant mixed mammary gland tumor เนื้ออกของเต้านมจัดว่าเป็นหนึ่งในสามของเนื้ออกที่พบบ่อยในแมวมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของเนื้ออกเต้านมในแมวเป็นชนิด adenocarcinoma และส่วนที่เหลือส่วนใหญ่เป็นชนิด fibroadenoma แต่มะเร็งชนิด malignant mixed mammary gland tumor ที่พบนี้เป็นชนิดที่มีรายงานการพบน้อยมากในแมว

คำสำคัญ : มะเร็ง mixed mammary tumor เต้านม การแพร่กระจาย แมว

การผลิตลูกโคพื้นเมืองไทยและโคนมด้วยเทคนิคการเก็บเซลล์ไข่ ผ่านทางผนังช่องคลอดและการปฏิสนธิในอกร่างกาย Production of Thai Native and Dairy Calves Using OPU and IVF Techniques

มาลี อภิเมธีรัง¹ อนนท ก้องสันเทียะ¹ ณรงค์ เลี้ยงเจริญ¹ กิรติ ริแฉ¹
และ จุริยรัตน์ สำเร็จประสงค์²

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

² คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50100

บทคัดย่อ

ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตลูกโคพื้นเมืองและโคนมโดยใช้เทคนิคการเก็บเซลล์ไข่ผ่านทางผนังช่องคลอดและปฏิสนธิในอกร่างกาย เจาะเก็บเซลล์ไข่จากโคพื้นเมือง 6 ตัว และ โคนมพันธุ์ดี 19 ตัว โดยไม่ใช้เครื่องอัลตราซาวด์ โคแต่ละตัวถูกเจาะเก็บเซลล์ไข่ซ้ำอย่างน้อย 4 ครั้ง ได้ไข่ทั้งหมด 338 ใบ จากโคพื้นเมือง 88 ใบ และโคนม 250 ใบ เป็นเซลล์ไข่คุณภาพดีรวม 192 ใบ โดยเป็นเซลล์ไข่คุณภาพดีของโคพื้นเมือง 56 ใบ (63.6%, 56/88) และของโคนม 136 ใบ (54.4%, 136/250) นำไข่คุณภาพดีไปเข้ากระบวนการปฏิสนธิในอกร่างกายในห้องปฏิบัติการที่อยู่ห่างจากสถานที่เจาะเก็บไข่ประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากเลี้ยงตัวอ่อน 7 วัน ได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ รวม 72 ใบ โดยเป็นตัวอ่อนของโคพื้นเมือง 17 ใบ และของโคนม 55 ใบ ทำการฝากตัวอ่อนโคพื้นเมือง 15 ใบ ในโคตัวรับพันธุ์โคนมลูกผสม 6 ตัว มีโคตัวรับท้อง 2 ตัว (ท้อง 33.3%, 2/6) โดย และจากการฝากตัวอ่อนโคนม 47 ใบ ในโคตัวรับ 24 ตัว มีโคตัวรับท้อง 7 ตัว (29.2%, 7/24) มีลูกโคพื้นเมืองเกิด 2 ตัว และลูกโคนมเกิด 7 ตัว สรุปผลการดำเนินงานในตารางที่ 1 ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคการเก็บเซลล์ไข่ผ่านทางผนังช่องคลอดและการปฏิสนธิในอกร่างกายเพื่อผลิตลูกโคพื้นเมืองไทยและลูกโคนม นับเป็นครั้งแรกที่มีลูกโคพื้นเมืองไทยเกิดจากวิธีการนี้

ตารางที่ 1 ผลการเก็บเซลล์ไข่ การผลิตตัวอ่อน การฝากตัวอ่อนและลูกเกิดในโคพื้นเมืองและโคนม

พันธุ์โค	จำนวนโคที่เก็บไข่*	เซลล์ไข่ที่เก็บได้	เซลล์ไข่คุณภาพดี (%)	ตัวอ่อนที่ได้** (%)	ตัวรับท้อง/ฝาก (%)	ลูกเกิด
พื้นเมือง	6	88	56 (63.6)	17 (30.4)	2/6 (33.3)	2
โคนม	19	250	136 (54.4)	55 (40.4)	7/24 (29.2)	7

*โคแต่ละตัวถูกเจาะเก็บไข่ซ้ำอย่างน้อย 4 ครั้ง

**แช่แข็งตัวอ่อนโคพื้นเมือง 2 ตัวอ่อนและโคนม 8 ตัวอ่อน เก็บไว้ในธนาคารตัวอ่อน

คำสำคัญ: การเก็บเซลล์ไข่ผ่านทางผนังช่องคลอด การปฏิสนธิในอกร่างกาย โค เซลล์ไข่

คำสำคัญ : การเก็บเซลล์ไข่ผ่านทางผนังช่องคลอด การปฏิสนธิในอกร่างกาย โค เซลล์ไข่

Determination of nitrofurans in animal feeds by LC/MS Ion Trap.

Wittaya Sungthong^{1*}, Piromporn Tuantumkaew¹, Suttiporn Piriyaon¹,
Wilawan Kotesompat¹ and Sriumporn Ardsri¹

Abstract

Nitrofurans in animal feeds has been prohibited according to the Thai Feed Quality Control Regulation BE. 2525 because they are carcinogenic substances. The determination and confirmation of nitrofurans was analyzed by liquid chromatography with ion trap mass spectrometry. The extraction liquid was acetonitril-water (1:4, v/v) by using shaker. The sample extracts were purified by solid phase extraction-C₁₈. This proposed method is simple and reproducible with a low detection limit and successfully separates the nitrofurans from the sample matrix which is normally influence in feed analysis. An average recoveries of nitrofuran spiked into the feed at levels of 5,10,20,50,100 and 200 µg/kg were 40.5–78.9% and the coefficients of variation were 6.13–14.22%. The limit of detection were 1.55 and 1.42µg/kg,in furazolidone and furaltadone respectively. These result indicated that the method is suitable as preliminary validation for analysis.

Keyword : nitrofurans, LC/ MS Ion Trap, solid phase extraction-C18

¹Feed Quality Control Laboratory Division, Bureau of Quality Control of Livestock products. Department of Livestock Development Tivanon Road, Bangkadee Muang, Pathumthani, 12000, Thailand

Electron Microscopic Studies on Brachial Glands of the Slow Loris

Kazumi Taniguchi¹⁾, Piboon Yutisri²⁾, Luxsana Prasittichai³⁾,
Suppaluk Kaewkwan²⁾, Waradee Buddhakosai²⁾,
Doungjit Kanungpean²⁾, Jitra Sanisuriwong²⁾,
Chatmongkol Pracharoenwanich⁴⁾, Anuwat Wattananorrasate⁴⁾,
Pongsiwa Sotthibandhu^{1,2)}, Jun Saito¹⁾, Kazuki Yoshioka¹⁾
and Ken-ichiro Mutoh¹⁾

¹⁾ Laboratory of Veterinary Anatomy, School of Veterinary Medicine, Kitasato University, Towada 034-8628, Japan,

²⁾ Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Bangkok 10530

³⁾ Khao Pratubchang Wildlife Breeding Center, Ratchaburi 70150

⁴⁾ Safari World, Bangkok 10510 Thailand

Introduction

Slow lorises possess venom glands in the subcutaneous regions medial to the elbow joints. When attacked, they lick the secretory products of the glands to mix with saliva and deliver them when biting predators. We reported this gland was composed of two histologically different types of glands (the second congress of Asian Association of Veterinary Anatomists in Bangkok, Sep 2007). In the present study, we aim to elucidate the cytological features of these two types of glands.

Keyword : apocrine, brachial gland, eccrine, transmission electron microscopy, venom

Materials and Methods

Three male slow lorises, dead from pneumonia, found in Khao Pratubchang Wildlife Breeding Center, and one male slow loris, died of malnutrition, from Safari World, Bangkok, were examined using a transmission electron microscopy.

Results

The glands were a blend of two different types. One of them was provided with apocrine protrusions on the luminal surface, while the other with electron lucent vacuoles and electron dense granules in the apical cytoplasm. Some cells had rows of regularly arranged smooth endoplasmic reticulum. Both types of glands were densely surrounded by myoepithelial cells. Adjacent to them, a large number of nerve fibers were observed.

Discussion

While similar to sweat glands, the venom glands do not exactly show the apocrine or eccrine characteristics; they might have their origin in sweat glands, then evolved into a specialized venomous gland.

สนับสนุนการประชุมโดย



RESEARCH • PERFORMANCE • INTEGRITY

