

วารสารเกษตร 6,1:21-40 (2533)

Journal of Agriculture 6,1:21-40 (1990)

การประเมินประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนม โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเซ

เพทาย พงษ์เพียจันทร์ และ ทศนีย์ อภิชาติสร่างกูร

ASSESSMENT OF REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN DAIRY CATTLE BY RADIOIMMUNOASSAY

Petai Pongpiachan and Tusanee Apichartsrungkoon

ABSTRACT: Milk progesterone were taken from dairy cows in Chiang Mai province on days 22, 42 and 64 postbreeding. Milk progesterone concentration was measured by radioimmunoassay (RIA) method. The milk samples were obtained from cross-bred cows (Native x Holstein-Friesian) with Holstein-Friesian blood ranging from 50 to over 80 percent. Mean milk progesterone concentration of nonpregnant cows on days 22, 42 and 64 after insemination were 4.25, 3.70 and 3.58 ng/ml respectively. Among pregnant groups, the average milk progesterone levels were 9.76, 11.47 and 11.08 ng/ml on days 22, 42 and 64 after insemination respectively. Accuracy of nonpregnant and pregnant forecast on days 22, 42 and 64 after breeding were 90.9 and 82.8, 50.0 and 96.4, 100 and 92.3 percent respectively. Reproductive efficiency of the cows, in terms of pregnancy rate, were 67.3 percent. This study confirm that the use of RIA provides great potential in pregnancy diagnosis and increase reproductive efficiency in dairy cows.

บทคัดย่อ: ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนม จากโคนมในจังหวัดเชียงใหม่ ในวันที่ 22, 42 และ 64 หลังวันผสมเทียม เพื่อวิเคราะห์ หาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone) โดยวิธี เรดิโออิมมูโนแอสเซ (Radioimmunoassay, RIA) โคส่วนใหญ่เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์พื้นเมืองและโฮลสไตน์-ฟรีเซียน (Holstein-Friesian) โดยมีเลือดโคพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน อยู่ระหว่าง 50 ถึง มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ วัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมของโคที่ไม่ตั้งครรภ์ได้ 4.25, 3.70 และ 3.58 นนก./มล. ส่วนโคกลุ่มที่ตั้งครรภ์วัดได้ 9.76, 11.47 และ 11.08 นนก./มล. ในวันที่

ภาควิชาสัตวบาล, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50002.

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Chiangmai University, Chiang Mai 50002.

22, 42 และ 64 หลังวันผสมพันธุ์ตามลำดับ ความแม่นยำในการวัดสถานะไม่ตั้งครรภ์ และ ตั้งครรภ์ ในวันที่ 22 หลังวันผสมพันธุ์มีค่า 90.9 และ 82.8 วันที่ 42 หลังวันผสมพันธุ์มีค่า 50.0 และ 98.4 วันที่ 64 หลังวันผสมพันธุ์มีค่า 100 และ 92.3 เปอร์เซนต์ตามลำดับ อัตราการตั้งท้องของโคมีค่าเฉลี่ย 67.3 เปอร์เซนต์ การทดลองครั้งนี้ยืนยันได้ว่า วิธีการเรดิโออิมมูโนแอสเซ ช่วยการตรวจสอบการตั้งครรภ์ในโคนมได้อย่างแม่นยำ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนมได้เป็นอย่างดี.

คำนำ

ในการประกอบกิจการโคนม ผู้เลี้ยงจำเป็นต้องควบคุมต้นทุนการผลิตให้ต่ำที่สุดเท่าที่จะทำได้ สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนการผลิตน้ำนมเพิ่มขึ้นคือความล่าช้าในการผสมติดของแม่โค โดยแต่ละรอบการเป็นสัด (Oestrous cycle) ที่แม่โคผสมไม่ติด หมายถึงเวลาการเริ่มต้นผลิตน้ำนมหลังการคลอดลูกตัวต่อไปจะล่าช้าออกไป ทำให้รายได้ที่ควรจะได้รับจากการขายน้ำนมบางส่วนหายไป ดังนั้น การเพิ่มอัตราการผสมติด (Conception rate) จึงช่วยเพิ่มทั้งประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ และการผลิตน้ำนมของโคนม การเพิ่มอัตราการผสมติดในเบื้องต้นนี้ จำเป็นต้องทราบก่อนว่าแม่โคผสมติดแล้วหรือไม่ วิธีการดั้งเดิมได้แก่ เกษตรกรดูจากการที่แม่โคไม่แสดงอาการเป็นสัด (Oestrus) ในวันที่ 21 หลังการผสมพันธุ์ ซึ่งถ้าโคเป็นสัดไม่ชัด หรือ การตรวจการเป็นสัดคลาดเคลื่อนไป อาจทำให้เข้าใจว่าโคตัวนั้นตั้งท้องแล้ว จากการค้นพบวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเซ (Radioimmunoassay; RIA) ของ Yarlow and Berson (1960) ทำให้มีการประยุกต์วิธีการนี้ในทางชีววิทยา และวิทยาศาสตร์สุขภาพอย่างกว้างขวาง รวมทั้งใช้ตรวจสอบการตั้งครรภ์ในโคด้วย วิธีการหนึ่งในการตรวจการตั้งครรภ์ในโคสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone) ในพลาสมา (Plasma) ดังรายงานของ Donaldson *et al.* (1970)., Stabenfeldt *et al.* (1970)., Hendericks *et al.* (1971)., Robertson and Sada (1971)., Glencross *et al.* (1973)., Shemesh *et al.* (1973); Hoffmann *et al.* (1976)., และ Walters (1976) หรือ วิเคราะห์จากน้ำนม (Darling *et al.* 1974., Hoffmann *et al.* 1976., Holdsworth *et al.* 1976., Pennington *et al.* 1976., Walters, 1976., Bulman, 1979., Booth *et al.* 1979., Eastman, 1979., Shemesh *et al.* 1983., และ กมลพัฒนา และคณะ 2531) แต่การตรวจจากพลาสมา นั้นทำให้โคเครียดเนื่องจากการเจาะเลือดซึ่งเกษตรกรไม่ชอบ การตรวจจากน้ำนมจึงง่ายกว่า และเกษตรกรสามารถเก็บตัวอย่างน้ำนมได้ด้วยตนเอง (Bulman, 1976).

การเก็บตัวอย่างน้ำนมเพื่อตรวจสภาพการตั้งครรภ์ นิยมเก็บภายหลังจากผสมพันธุ์ไปแล้ว 21 ถึง 24 วัน ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมโคหลังการผสมพันธุ์ 19 ถึง 25 วัน มีค่า 2.0 และ 13.9 นาโนกรัมต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร (นกก./มล.) ในโคไม่ตั้งท้อง และ ตั้งท้อง ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมของโคทั้งสองกลุ่ม

Table 1. Progesterone concentration in milk in pregnant and nonpregnant cows assayed by radioimmunoassay at various days after insemination.

Days after insemination	Milk progesterone (ng/ml $\pm$ S.E.M.)		References
	Nonpregnant	Pregnant	
19	-	21.3	Ginther <i>et al.</i> (1976)
19-23	2.1	15.7	Dobson and Fitzpatrick (1976)
21	1.80 $\pm$ 0.26	7.23 $\pm$ 0.89	Schiavo <i>et al.</i> (1975)
	1.45 $\pm$ 0.20	6.01 $\pm$ 0.23	Cavestany and Foode (1985)
21-22	3.00 $\pm$ 0.30	18.5 $\pm$ 0.60	Pennington <i>et al.</i> (1976)
21-30	4.20 $\pm$ 0.92	7.50 $\pm$ 0.52	Heap <i>et al.</i> (1976)
	3.60 $\pm$ 0.70	7.70 $\pm$ 0.57	Heap <i>et al.</i> (1976)
22	-	21.3 $\pm$ 3.90	Ginther <i>et al.</i> (1976)
22-26	1.56 $\pm$ 2.03	21.9 $\pm$ 9.67	Kamonpatana <i>et al.</i> (1988)
23	1.00 - 4.30	3.40 - 23.6	Macfarlane <i>et al.</i> (1977)
	1.06 $\pm$ 0.10	5.89 $\pm$ 0.17	Cavestany and Foote (1985)
24	-	12.7 - 29.0	Booth and Holdsworth (1976)
	-	19.3 - 24.3	Booth <i>et al.</i> (1979)
	-	31.8 $\pm$ 2.90	Holdsworth <i>et al.</i> (1980)
	-	4.73 $\pm$ 2.20	Shemesh <i>et al.</i> (1983)
25	1.14 $\pm$ 0.06	6.15 $\pm$ 0.19	Cavestany and Foote (1985)
	2.0	13.9	
Mean			

มีความแตกต่างอย่างเด่นชัดเพียงพอสำหรับใช้ตรวจสอบการตั้งครรภ์ เนื่องจากค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในโคที่ไม่ตั้งท้อง มีช่วงตั้งแต่ 0.1 ถึง 4.3 นนก./มล. และพวกที่ตั้งท้องมีค่าตั้งแต่ 3.4 ถึง 31.8 นนก./มล. ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับวิธีการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการแต่ละที่ และตัวอย่างน้ำนมที่มีธรรมชาติแตกต่างกันอยู่แล้ว ดังนั้น มาตรฐานความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งใช้ในการตัดสินใจสภาพการตั้งครรภ์ จึงมีค่าที่แตกต่างกันไป สภาพการตั้งครรภ์ของโคนมอาจแบ่งได้ 3 กลุ่ม คือไม่ตั้งท้อง, ตั้งท้อง และ สงสัย กลุ่มสงสัยมีค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนใกล้เคียงกับกลุ่มไม่ตั้งท้องและตั้งท้อง

ทำให้ตัดสินอย่างแน่นอนไม่ได้ จากการตรวจเอกสารเกณฑ์เฉลี่ยของการแบ่งกลุ่มมีดังนี้ ต่ำกว่า 4.62, มากกว่า 8.97 และระหว่าง 4.61 และ 8.52 นก./มล. เป็นค่าตัดสินสภาพไม่ตั้งท้อง ตั้งท้อง และ สงสัยตามลำดับ (ตารางที่ 2) ส่วนความแม่นยำในการทำนายการตั้งครรภ์ที่

Table 2. Classification of dairy cows as nonpregnant, pregnant or doubtful from progesterone levels in milk.

Days after insemination	Milk progesterone (ng/ml±S.E.M.)			References
	Nonpregnant	Pregnant	Doubtful	
21	< 2.36	> 7.12	2.36-7.12	Schiavo <i>et al.</i> (1975)
	< 2.00	> 11.0	2.00-11.0	Hoffmann <i>et al.</i> (1976)
	< 8.90	> 15.5	8.90-15.5	Heap <i>et al.</i> (1976)
	< 1.50	-	-	Pop <i>et al.</i> (1976)
	< 8.00	> 11.0	8.00-11.0	Pennington <i>et al.</i> (1976)
23	< 3.20	> 3.20	-	Macfarlane <i>et al.</i> (1977)
	< 5.50	> 7.50	5.50-7.50	Booth <i>et al.</i> (1979)
24	< 5.50	> 7.50	5.50-7.50	Holdsworth <i>et al.</i> (1980)
Mean	< 4.62	> 8.97	4.61-8.52	

แม่นยำที่สุดคือ ไม่ตั้งท้องทำนายถูกต้อง 97 เปอร์เซ็นต์ การทำนายว่าตั้งท้องมีความแม่นยำ 82.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3 และ 4)

Table 3. Accuracy of prediction of nonpregnant in dairy cows from milk progesterone levels.

% Accuracy	References
100	Bulman (1976)
91	Dobson and Fitzpatrick (1976)
100.0	Hoffmann <i>et al.</i> (1976)
97.1	Heap <i>et al.</i> (1976)
97.5	Pope <i>et al.</i> (1976)
98.0	Pennington <i>et al.</i> (1976)
98.7	Pennington <i>et al.</i> (1976)
98.0	Pennington <i>et al.</i> (1977)
100.0	Macfarlane <i>et al.</i> (1977)
97.0	Booth <i>et al.</i> (1979)
100.0	Eastman (1979)
98.0	Foote <i>et al.</i> (1976)
100.0	Holdsworth <i>et al.</i> (1980)
100.0	Shemesh <i>et al.</i> (1983)
83.4	Laitinen <i>et al.</i> (1985)
94.5	Nebel <i>et al.</i> (1987)
95.3	Worsfold <i>et al.</i> (1987)
Mean 97.0	

Table 4. Accuracy of prediction of pregnant in dairy cows from milk progesterone levels.

% Accuracy	References
81.7	Bulman (1976)
81.0	Dobson and Fitzpatrick (1976)
78.3	Hoffmann <i>et al.</i> (1976)
79.5	Heap <i>et al.</i> (1976)
77.6	Pennington <i>et al.</i> (1976)
77.4	Pennington <i>et al.</i> (1976)
94.6	Macfarlane <i>et al.</i> (1977)
76.3	Pennington <i>et al.</i> (1977)
84.5	Booth <i>et al.</i> (1979)
83.3	Eastman (1979)
80.0	Foote <i>et al.</i> (1979)
96.7	Holdsworth <i>et al.</i> (1980)
79.0	Shemesh <i>et al.</i> (1983)
85.6	Laitinen <i>et al.</i> (1985)
75	Nebel <i>et al.</i> (1987)
89.7	Worsfold <i>et al.</i> (1987)
Mean 82.5	

ประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของโคนม วัดในรูปอัตราการตั้งครรภ์ มีค่าตั้งแต่ 54.5 ถึง 88.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ย 74 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสัดส่วนของโคที่อยู่ในสภาพไม่ตั้งท้องมี 10.3 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ย 23.4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5 และ 6) ส่วนโคในกลุ่มสงสัยมี 1.2 ถึง 1.7 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ย 3.6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7) ความแปรปรวนนี้ขึ้นกับฝูงโคและสภาพการจัดการที่แตกต่างกัน

วัตถุประสงค์ในการทดลองครั้งนี้เพื่อตรวจสอบการใช้นิวเคลียร์เทคโนโลยี ในการตรวจการตั้งครรภ์ของโคนมโดยวิธีเรดิโออิมมูโนโนแอสเซ และวัดประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนมในจังหวัดเชียงใหม่

Table 5. Test results of nonpregnant in dairy cows from milk progesterone levels.

Percentage	References
10.3	Booth and Holdsworth (1976)
16.3	Hoffmann <i>et al.</i> (1976)
19.5	Heap <i>et al.</i> (1976)
25	Pope <i>et al.</i> (1976)
39.8	Pennington <i>et al.</i> (1976)
30.3	Macfarlane <i>et al.</i> (1977)
40.0	Pennington <i>et al.</i> (1977)
20.0	Booth <i>et al.</i> (1979)
40.0	Foote <i>et al.</i> (1979)
12.9	Holdsworth <i>et al.</i> (1980)
17.9	Laitinen <i>et al.</i> (1985)
17.0	Davies <i>et al.</i> (1987)
15.6	Worsfold <i>et al.</i> (1987)
Mean 23.4	

Table 6. Test results of pregnant in dairy cows from milk progesterone levels.

Percentage	References
88.5	Booth and Holdsworth (1976)
79.4	Hoffmann <i>et al.</i> (1976)
73.0	Heap <i>et al.</i> (1976)
54.5	Pennington <i>et al.</i> (1976)
69.7	Macfarlane <i>et al.</i> (1977)
57.3	Pennington <i>et al.</i> (1977)
77.9	Booth <i>et al.</i> (1979)
60.0	Foote <i>et al.</i> (1979)
85.7	Holdsworth <i>et al.</i> (1980)
82.1	Laitinen <i>et al.</i> (1985)
80.2	Davies <i>et al.</i> (1987)
79.6	Worsfold <i>et al.</i> (1987)
Mean 74.0	

Table 7. Test results of doubtful in dairy cows from milk progesterone levels.

Percentage	References
1.2	Booth and Holdsworth (1979)
4.4	Hoffmann <i>et al.</i> (1976)
7.5	Heap <i>et al.</i> (1976)
5.7	Pennington <i>et al.</i> (1976)
2.8	Pennington <i>et al.</i> (1977)
2.1	Booth <i>et al.</i> (1979)
1.4	Holdsworth <i>et al.</i> (1980)
2.8	Davies <i>et al.</i> (1987)
4.8	Worsfold <i>et al.</i> (1987)
Mean 3.6	

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองนี้ใช้โคนมลูกผสม ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์โฮลสไตน์ฟรียเซียน (Holstein-Friesian) กับโคพื้นเมือง มีเลือดโคโฮลสไตน์ฟรียเซียน ตั้งแต่ 50 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป โคเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นของเกษตรกรรายย่อยในจังหวัดเชียงใหม่ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมเพื่อวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในวันที่ 22 หลังการผสมเทียม มีการเก็บน้ำนมวันผสม และวันที่ 6 หลังผสมพันธุ์เพื่อใช้ตัดสินสภาพไม่ตั้งท้อง และกลุ่มสงสัย ส่วนตัวอย่างน้ำนมวันที่ 42, 120 และ 180 หลังจากการผสมพันธุ์จากแม่โคที่แน่ใจว่าตั้งครรรภ์แล้ว ใช้เป็นกลุ่มตัวอย่างในการตัดสินการตั้งท้อง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ประกอบไปด้วย เครื่องนับการแผ่รังสีของตรีเทียม (Tritium, ^3H) จากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ชนิด Liquid Scintillation Counter (1209 RACKBETA)¹ เครื่องปั่นแยกที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (MISTRAL 3000)² เครื่องวัดพีเอช (pH-Meter CG 803)³ เครื่องผสมวอร์เทกซ์ (Vortex mixer, Vortex-Genie) โมเดล K-550-GE⁴ และเครื่องแมกเนติก สเตอร์เรอร์ (Magnetic stirrer)⁴

สารละลายฟอสเฟต (Phosphate-buffered saline., PBS) เตรียมจากสารละลาย 3 ชนิดคือ

ก โซเดียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต ไดไฮเดรต (Sodium dihydrogen phosphate dihydrate, Merk; Art. 6345) สูตรโครงสร้าง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (M) หรือ 78.004 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

ข ไดโซเดียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate, May and Baker) สูตรโครงสร้าง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ หรือ 35.814 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

ค โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, Fluka; 71381) 1.05 โมลาร์ หรือ 61.365 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร และเติมโซเดียม เอทิลเมอร์คิวไรธาลิไซเลต (Sodium ethylmercurithiosalicylate, Thimerosal, Sigma; No. T-5125) 0.75 กรัม

นำสารละลายทั้ง 3 นี้ ผสมกันในสัดส่วน 6.66, 66.67 และ 133.3 มล. สำหรับสารละลาย ก, ข และ ค ตามลำดับ ต่อจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรประมาณ 900 มล. ปรับพีเอชให้ได้ 7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร เติมเจลาติน (Gelatin, Merk; Art. 4070) 1 กรัม ปั่นจนเจลาตินละลาย เก็บเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5° เซลเซียส

สารละลายกัมมันตคาร์บอน (Charcoal suspension) เตรียมโดยซึ่งเด็กซ์แทรน โซเดียมซัลเฟต (Dextran sodium sulfate, Fluka; 31395) 0.0625 กรัม ปั่นให้ละลายในน้ำกลั่น 100

1. บริษัท LKB WALLAC ประเทศฟินแลนด์

2. บริษัท MSE ประเทศอังกฤษ

3. บริษัท Schott Gerate ประเทศเยอรมันนี

4. บริษัท LABINCO

มล. เติมกัมมันตคาร์บอน (Charcoal activated, Merk; Art. 2186) 0.625 กรัม บั่นในถ้วย น้ำแข็งประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในตู้เย็น 4° เซลเซียส

การทำเจือจางฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนที่ติดฉลากด้วยตรีเทียม (1, 2, 6, 7-³H) progesterone, ³H-P4; Amessham UK) ความเข้มข้น 250 ไมโครคิวรี (μCi) ด้วยเบนซีน (Benzene) 50 มล. จากนั้นนำมาเจือจางในสารละลายฟิปีเอสให้วัดพลังงานจากรังสีได้ 8000 ครั้งต่อนาที (cpm) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียส

เตรียมสารละลายสำหรับวัดพลังงานจากรังสี หรือซินทิลเลเตอร์ (Scintillator) โดยซิง สารฟิฟิ (p-terphenyl, Sigma; No. T-1250) 3 กรัม ฟิโอฟิโอฟิ [POPOP, 2,2-p-phenylene-bis (5-phenyloxazole), Merk; Art. 7249] 0.1 กรัม ละลายในโทลูอิน (Toluene, Merk; 8325) 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 1 วันก่อนใช้งาน

การวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนใช้วิธีเรดิโออิมมูโนโนแอสเซซของ กมลพัฒนะและคณะ (2531) ซึ่งคล้ายคลึงกับวิธีของ Gadsby *et al.* (1974)., Hoffmann *et al.* (1976)., Heap *et al.* (1976)., Holdsworth *et al.* (1979) และ Dobson (1983) ส่วน แอนติซีรัม (Antiserum) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ มณีวรรณ กมลพัฒนะเช่นเดียวกัน โดยเป็นแอนติซีรัมที่สร้างจากกระต่าย ปฏิกริยาของแอนติ ซีรัมกับฮอร์โมนชนิดต่างๆ แสดงไว้ในตารางที่ 8 และทำการไตเตรท (Titration) หาอัตรา ส่วนแอนติซีรัม : สารละลายฟิปีเอส จากอัตรา 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1, 600, 1:3, 200, 1:6, 400 ถึง 12, 800 โดยการผสมระหว่าง ³H-P4, แอนติซีรัม และฟิปีเอสในอัตรา 100, 100 และ 400 ไมโครลิตร ตามลำดับ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 5° เซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แหะลดกระว้าใส่หลอดแก้วสำหรับปั่นในเครื่องปั่นไว้ที่อุณหภูมิ -15° เซลเซียส แหะลดแก้วใน อย่างน้ำแข็งเพื่อให้อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 0 ถึง 5° เซลเซียส เติมสารละลายกัมมันตคาร์บอน 200 ไมโครลิตรทิ้งไว้ 20 นาที บรรจุหลอดแก้วลงในกระว้าใส่หลอดแก้ว นำเข้าเครื่องปั่นแยกที่ปรับ อุณหภูมิไว้ที่ 4° เซลเซียส บั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นแยก ส่วนของเหลวลงในขวดที่ใช้สำหรับการวัดพลังงานของสารรังสี (Vial) เติมสารละลายซินทิลเลเตอร์ 4 มล. ทิ้งไว้ข้ามคืน นำเข้าเครื่องวัดรังสี 1209 RACKBETA ค่าซีฟิเอ็มที่วัดได้นี้นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของซีฟิเอ็มที่เดิม ³H-P4 เพียงอย่างเดียวและเรียกค่านี้ว่า % binding ซึ่ง เมื่อนำมา สร้างเป็นกราฟให้แทนที่แทน % binding และแทนนอนแทนอัตราการใช้ของของ แอนติซีรัม โดยสามารถหาอัตราการใช้แอนติซีรัมที่เหมาะสมได้จากจุดที่มีค่า % binding เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ จากการไตเตรทได้ค่าอัตราการใช้แอนติซีรัมระหว่าง 1 : 1, 500 ถึง 1 : 2, 500.

การวิเคราะห์หาระดับโปรเจสเตอร์โรน มีกลุ่มที่เกี่ยวข้องประกอบด้วย

1 กลุ่มโปรเจสเตอร์โรนมาตรฐานเพื่อสร้างเส้นกราฟมาตรฐาน (Standard curve) มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, และ 1000 พิโคกรัมต่อ 0.05 มล.

2 กลุ่มเปรียบเทียบ คือ น้ำนมเก็บวันที่ 0, 6, 120, 150 และ 180 หลังวันผสมเทียม

3 ตัวอย่างน้ำนมจากฟาร์มขนาดเล็กในจังหวัดเชียงใหม่

Table 8. Cross reaction of various steroids with the antiserum to progesterone.

Steroids %		Cross reaction
C ₂₁	Steroids	
	progesterone	100
	17 α -hydroxy progesterone	0.74
	corticosterone	0.68
	cortisol	<0.001
C ₁₉	Steroids	
	1-androsterone	<0.001
	3-androstenedione	<0.001
	Testosterone	<0.001
	5 -dihydroxytestosterone	<0.001
	4,4 -androstene - 17 β -ol	<0.001
C ₁₈	Steroids	
	Oestradiol 17 (E2)	<0.001
	Oestrone	<0.001
	Oestriol	<0.001
	9,17 β - oestradiol	<0.001

(Ater RIA Laboratory, Biochemistry Unit, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND, 1986)

วิธีวิเคราะห์เริ่มจากดูดตัวอย่างน้ำมัน 20 ไมโครลิตร หรือโปรเจสเตอโรนมาตรฐาน 50 ไมโครลิตร แล้วเติมแอนติซีรัม 100 ไมโครลิตร ในอัตรา 1:1500 เขย่าด้วยวอร์เทกซ์ มิกเซอร์ เสร็จแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เติม ³H-P4 100 ไมโครลิตร เขย่า แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4° เซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นแยกฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในรูปอิสระ (free form) และรูปที่เกาะกับแอนติซีรัม (bound form) ออกจากกันด้วยการเติมสารละลายกัมมันตคาร์บอน ขั้นตอนต่อไปจากนี้ทำเช่นเดียวกับการไตเตรทแอนติซีรัมทุกประการ นำค่าซีพีเอ็มของกลุ่มมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการอ่านค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำมันจากค่าซีพีเอ็มที่วัดได้ โดยมีเกณฑ์ที่ใช้ตัดสินสภาพการตั้งครรภ์คือ ความเข้มข้นของ ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ต่ำกว่า 3 นก./มล. ไม่ตั้งครรภ์ สูงกว่า 7 นก./มล. ตั้งครรภ์ และอยู่ระหว่าง 3 ถึง 7 นก./มล. เป็นกลุ่มสงสัย โดยยืนยันการตั้งครรภ์จากการคลอดลูกของแม่โค และคำนวณความแม่นยำในการทำนายการตั้งครรภ์จากสูตร :

$$\begin{aligned} \text{ความแม่นยำในการทำนายไม่ตั้งครรภ์} &= \frac{\text{จำนวนโคที่กลับมาเป็นสัด} \times 100 \%}{\text{จำนวนโคที่ทำนายว่าไม่ตั้งครรภ์}} \\ \text{ความแม่นยำในการทำนายการตั้งครรภ์} &= \frac{\text{จำนวนโคที่คลอดลูก} \times 100 \%}{\text{จำนวนโคที่ทำนายว่าตั้งครรภ์}} \end{aligned}$$

ผลการทดลอง

กราฟมาตรฐาน (รูปที่ 1) เป็นแบบ Semilogarithm มีแกนนอน คือ ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเป็น log scale ส่วนแกนตั้งคือค่า % binding เป็นแบบธรรมดาที่

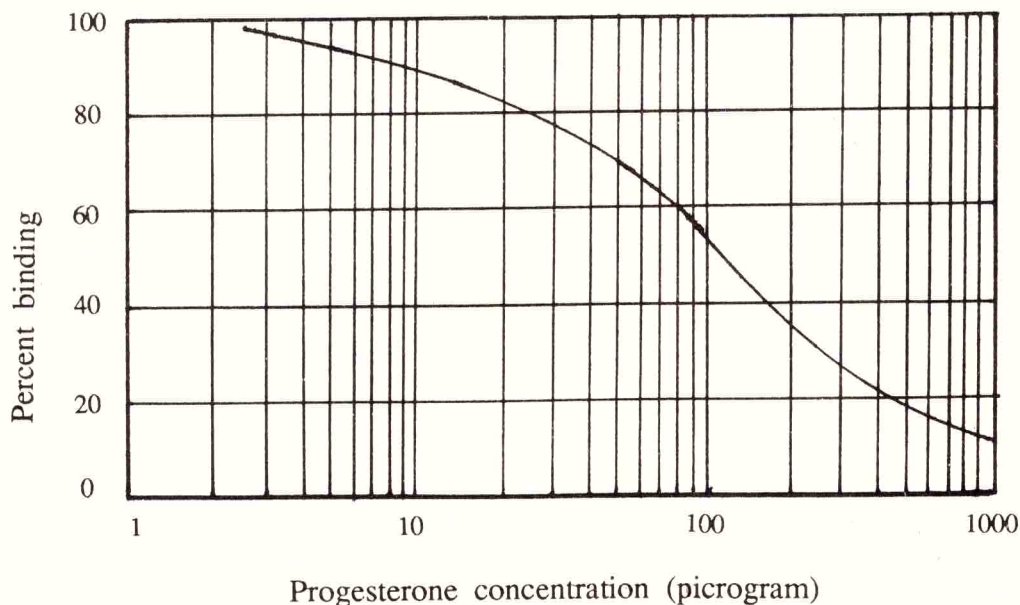


Figure 1. Standard curve for direct radioimmunoassay of milk progesterone.

50 % binding ตรงกับความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 พิโคกรัม (picrogram) ตัวอย่างน้ำมันใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ดังนั้นค่าความเข้มข้น คือ 5.0 นนก./มล.

รูปที่ 2 แสดงรอบการเป็นสัด (Oestrous cycle) ของโคบางตัวเป็นตัวอย่างที่ชี้ให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในโคที่ไม่ได้ตั้งครรภ์ที่มีค่าต่ำที่สุดในวันเป็นสัด 0.14 นนก./มล. วันที่ 3 เพิ่มอีกเล็กน้อยเป็น 0.50 นนก./มล. วันที่ 4 เริ่มสูงต่างจาก 3 วันแรกอย่างเห็นได้ชัด คือ 2.25 นนก./มล. จากนี้ค่าจะสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 19 จึงจะลดลงเหลือ 1.30 และต่ำสุดในวันที่ 20 คือ 0.28 นนก./มล. ครบรอบการเป็นสัด ต่อ

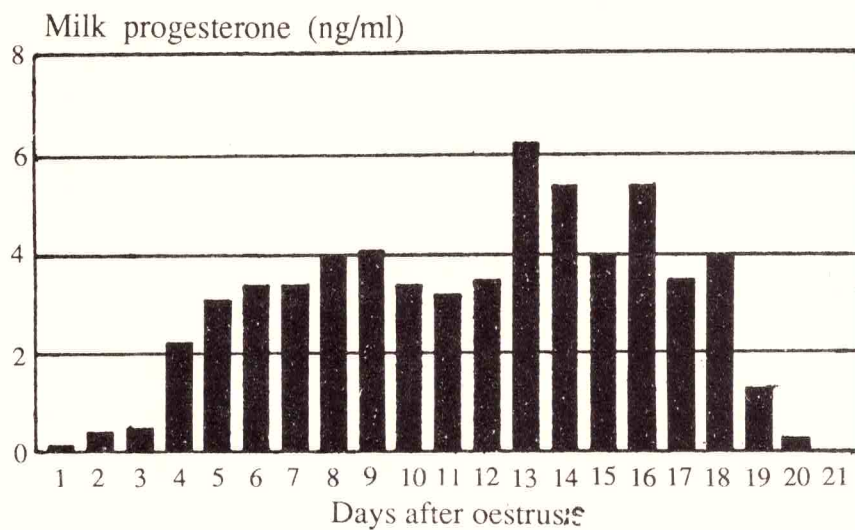


Figure 2. Progesterone concentration in the milk of the cow name Mai during the oestrous cycle.

จากนั้นจะเข้าสู่รอบการเป็นสัดถัดไป แต่ถ้าโคตั้งท้อง (ตารางที่ 9) ค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจากวันผสม 0.04 ± 0.21 เพิ่มขึ้นเป็น 4.45 ± 0.77 นนก./มล. ในวันที่ 6 และเพิ่มขึ้นไปอีกเป็น 7.07 ± 0.55 นนก./มล. ในวันที่ 22 หลังการผสมพันธุ์ ต่อจากนั้นความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนม จะรักษาระดับสูงกว่า 7.0 นนก./มล. ไปจนถึงวันที่ 180 หลังการผสมพันธุ์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมระหว่างโคนมที่ตั้งท้องได้ 22 วัน (9.76 ± 0.98 นนก./มล.) กับโคที่อยู่ในช่วงการเป็นสัด (0.14 ถึง 0.50 นนก./มล.) จะเห็นได้ชัดเจนว่าแตกต่างกันมาก

ผลการตรวจการตั้งครรภ์แสดงไว้ในตารางที่ 10 จากตัวอย่างนมเก็บวันที่ 22 หลังการผสมเทียมวัดค่าเฉลี่ยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมของโคนมที่ตั้งครรภ์และตั้งครรรภ์ได้เท่ากับ 4.25 ± 1.35 และ 9.76 ± 0.98 นนก./มล. ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ทั้งหมด 32.7 และ 67.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังวันผสมพันธุ์ 42 วัน ค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในโคที่ตั้งท้องต่ำกว่ากลุ่ม 22 วัน คือลดเหลือ 3.70 ± 2.02 นนก./มล. พวกไม่ตั้งครรรภ์มีสัดส่วนลดลงเหลือ 9.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มตั้งครรรภ์มีค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเท่ากับ 11.47 ± 1.47 นนก./มล. มีสัดส่วนเพิ่มขึ้นเป็น 90.2 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในระยะ 64 วันหลังการผสมพันธุ์มีค่า 3.58 ± 3.31 นนก./มล. ในกลุ่มไม่ตั้งครรรภ์ และ 11.08 ± 1.65 นนก./มล. ในกลุ่มตั้งครรรภ์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม 42 วัน สัดส่วนโคนมที่ตั้งท้องเพิ่มขึ้นในขณะที่โคกลุ่มตั้งท้องลดลง สำหรับอัตราการตั้งครรรภ์ (Pregnancy rate, %) จากการศึกษารั้งนี้ มีโคทั้งลูก 2-4.7 เปอร์เซ็นต์ ทำให้อัตราการตั้งครรรภ์ลดลง พวกที่มีค่าต่ำสุดคือ 66 เปอร์เซ็นต์คือกลุ่มหลังผสมพันธุ์ 22 วัน และสูงสุด 86 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มหลังผสมพันธุ์ 42 วัน ส่วนกลุ่มหลังผสมพันธุ์ 64 วัน มีอัตราการตั้งครรรภ์อยู่ระหว่างสองกลุ่มแรกคือ 72 เปอร์เซ็นต์

Table 9. Milk concentration of progesterone (ng/ml) in pregnant cows after insemination.

Days after insemination	Mean concentration $\pm$ S.E.M. of progesterone (ng/ml)
0	1.04 $\pm$ 0.22
6	4.45 $\pm$ 0.77
22	7.07 $\pm$ 0.55
42	9.65 $\pm$ 1.00
64	8.42 $\pm$ 1.32
90	8.06 $\pm$ 1.19
120	7.90 $\pm$ 2.97
150	10.08 $\pm$ 0.87
180	7.88 $\pm$ 1.13

Table 10. Progesterone in milk 22, 42 and 64 days after insemination.

Days after insemination	Milk progesterone (ng/ml + S.E.M.)		Percentage	
	Nonpregnant	Pregnant	Nonpregnant	Pregnant
22	4.25 $\pm$ 1.35	9.76 $\pm$ 0.98	32.7	67.3
42	3.70 $\pm$ 2.02	11.47 $\pm$ 1.47	9.8	90.2
64	3.58 $\pm$ 3.31	11.08 $\pm$ 1.65	23.5	76.5

ความแม่นยำในการทำนายสภาพการตั้งครรภ์แสดงในตารางที่ 11 การทำนายว่าไม่ตั้งครรภ์มีความแม่นยำที่สุดคิดเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำ (% accuracy) เท่ากับ 90.9, 50.0 และ 100 จากตัวอย่างน้ำนมหลังการผสมพันธุ์วันที่ 22, 42 และ 64 ตามลำดับ ส่วนการทำนายว่าตั้งครรภ์มีความแม่นยำ 82.8, 96.4 และ 92.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Table 11. Accuracy of prediction of pregnancy status in dairy cows from milk progesterone levels.

Days after insemination	Interpretation	Milk progesterone (ng/ml)	Number		% Accuracy
			True results	False result	
22	Nonpregnant	<3	10	1	90.9
	Pregnant	>7	24	5	82.8
	Doubtful	3-7	8	4	66.7
42	Nonpregnant	<3	2	2	50.0
	Pregnant	>7	27	1	96.4
	Doubtful	3-7	8	1	88.9
64	Nonpregnant	<3	3	0	100
	Pregnant	>7	12	1	92.3
	Doubtful	3-7	2	0	100

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้ ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมของโคที่ทำนายว่าไม่ตั้งครรภ์มีค่า 1.04 นนก./มล. ค่านี้เป็นค่าเฉลี่ย ซึ่งเมื่อทำนายในโคแต่ละตัวพบว่ามีความแปรปรวนมาก สาเหตุหนึ่งเกิดจากการวิเคราะห์ต่างชุดกัน ดังนั้นจึงใช้ค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมวันที่ 0 ช่วยในการตัดสินใจผลการตั้งครรภ์ในแต่ละครั้ง อย่างไรก็ตาม ค่าเฉลี่ยที่ 1.04 นนก./มล. นี้ใกล้เคียงกับผลงานของ Schiavo *et al.* (1975)., Macfarlane *et al.* (1977)., Cavestany and Foote (1985) และ กมลพัฒนะและคณะ (1988) ในวันที่ 22 หลัง การผสมพันธุ์โคกลุ่มที่ตรวจสอบว่าตั้งครรภ์ มีค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 9.76 นนก./มล. ซึ่งสูงกว่า Heap *et al.* (1976) และ Cavestany and Foote (1985) ที่รายงาน ไว้แต่ต่ำกว่าผลทดลองของ Dobson and Fitzpatrick (1976)., Ginther *et al.* (1976)., Pennington *et al.* (1976) และ กมลพัฒนะ และคณะ (2531) ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า มีความแปรปรวนระหว่างค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมที่วัดได้ในแต่ละห้องปฏิบัติการ ในการทดลองครั้งนี้ใช้วิธีวัดในน้ำนมโดยตรงไม่มีการสกัดใดๆ Hoffmann *et al.* (1976) ทดลองสกัดไขมันในน้ำนมออกก่อน โดยเติมปิโตรเลียมอีเธอร์ (Petroleum-ether) และเมทานอล (Methanol) เนื่องจากโปรเจสเตอโรนละลายได้ดีในไขมัน Wimpy *et al.* (1986) พบว่าถ้าเปอร์เซ็นต์ไขมันในน้ำนมลดจากช่วง 2.0-9.3 เป็น 0.7-6.5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้

ความแม่นยำในการทำนายสภาพการไม่ตั้งครรภ์เพิ่มจาก 68 เป็น 78 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดไขมันในนมนี้ Eastman (1979) ใช้ N- butanol และ N-butylamine เป็นการช่วยปรับปรุงความแม่นยำในการวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมได้ แต่ค่าใช้จ่ายและเวลาในการวิเคราะห์จะเพิ่มตามไปด้วย เมื่อคิดอัตราการตั้งท้องในวันที่ 22 เปรียบเทียบกับวันที่ 42 หลังผสม มีค่า 67.3 และ 90.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ตัวอย่างนมในวันที่ 42 หลังการผสมมีอัตราการผสมติดสูงกว่ามาก ทั้งนี้อาจมีปัจจัยเกี่ยวข้องของหลายประการดังต่อไปนี้ได้แก่ 1.การแท้งลูกที่โค 2 ถึง 4.7 เปอร์เซ็นต์ แท้งลูก โดยอาจมีสาเหตุจากโรคแท้งติดต่อ (Infectious abortion) 2.ผู้เลี้ยงดูการเป็นสัตว์ปลดไป ซึ่งโดยทั่วไปมีโอกาสเกิดขึ้นได้ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ (Pennington *et al.*, 1977 และ Elmore, 1986) 3.การขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ในฤดูแล้ง มีผลซึ่งการทำงานของระบบการสืบพันธุ์ได้ ดังหลักฐานสนับสนุนจากงานของ Meredith *et al.* (1986) ที่พบว่า ความเครียด (stress) จากการขาดอาหาร ทำให้อัตราฮอร์โมน Luteinizing Hormone (LH) ในหนูตัวโต (rat) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<.05$) ในทำนองเดียวกันกับงานของ Echternkamp (1984) พบว่าความเครียดอันเกิดจากการกักขังทำให้การหลั่ง LH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<.025$) และ 4.ปัจจัยที่น่าจะเป็นเหตุผลหลัก คือ การตายของคัพภะในระยะแรก (Early embryonic mortality) ทำให้สัตว์นั้นตั้งท้องไม่สำเร็จในการผสมครั้งแรก (Pope *et al.*, 1976., Pennington *et al.*, 1977 และ Elmore, 1986).

ในช่วงเวลาหลังการผสมพันธุ์ 22 วัน การทำนายว่าโคไม่ตั้งครรภ์มีความแม่นยำ 91 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแม่นยำกว่าการทำนายว่าตั้งครรภ์ที่มีค่า 83 เปอร์เซ็นต์นั้น มีเหตุผลที่พอจะอธิบายได้หลายประการดังนี้ 1. เกษตรกรอาจเก็บตัวอย่างน้ำนมให้ไม่ตรงตามเวลาที่กำหนด 2. เกษตรกรดูการเป็นสัตว์ปลดไป โดยทั่วไปผู้เลี้ยงดูการเป็นสัตว์ปลดไป 20-30 เปอร์เซ็นต์ (Pennington *et al.*, 1977 และ Elmore, 1986) 3. รอบการเป็นสัตว์ของโคปกติที่อยู่ในช่วง 18 ถึง 24 วันนั้น อาจมีโคบางตัวที่มีรอบการเป็นสัตว์สั้น หรือยาวกว่าช่วงปกติ (Elmore, 1986) 4. เกิดการตายของคัพภะในระยะแรก ทำให้โคกลับมาเป็นสัตว์อีกครั้ง 5. เกิดมดลูกอักเสบ (Endometritis) ในโค หรือในมดลูกมีหนองอยู่ (Pyometra) ทำให้มดลูกไม่สามารถควบคุมการสลาย Corpus luteum (Elmore, 1986) ทำให้ผลวิเคราะห์โปรเจสเตอโรนสูงทั้งๆที่ไม่เกิดการตั้งครรภ์ และ 6. อาจเกิด Cyst จาก Corpus luteum ทำให้มีการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนอย่างต่อเนื่อง.

สรุปผลการทดลอง

สามารถใช้เทคนิคเรดิโออิมมูโนแอสเซซ สำหรับเพิ่มประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของโคนมได้ โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมในวันที่ 22 หลังวันผสมพันธุ์มาวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และใช้ทำนายสภาพการตั้งครรภ์ได้ จากผลการวิเคราะห์น้ำนมในวันที่ 22 หลังผสมพบว่า มีโคอยู่ในสภาพตั้งครรภ์และไม่ตั้งครรภ์ 67 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความแม่นยำในการ

ทำนายการตั้งครรภ์ และไม่ตั้งครรภ์มีค่า 83 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ข้อเสนอแนะสำหรับการประยุกต์ใช้วิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ และการผลิตน้ำนมของโคนมมีดังนี้ 1. ตรวจสอบการเป็นสัดของโคแต่ละตัว เพื่อจำแนกกลุ่มรอบการเป็นสัดเป็นชนิด สั้น, ปกติ และยาวกว่าปกติ เพื่อเป็นพื้นฐานให้เกษตรกรตรวจสอบการเป็นสัดได้แม่นยำยิ่งขึ้น 2. ควรวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมใน วันผสมพันธุ์เพื่อช่วยตรวจสอบการเป็นสัด 3. ในโคที่มีปัญหาตรวจสอบการตั้งครรภ์ไม่ชัด อาจประยุกต์งานของ Shemesh *et al.* (1983) โดยใช้ฟองน้ำชุบสารโปรเจสติน (Medroxy progesterone, MAP) ในรูป พีไอวีเอส (Progestin-impregnated vaginal sponges, PIVS) สอดเข้าช่องคลอด จะช่วยทำให้การทำนายการตั้งครรภ์แม่นยำขึ้น 4. ควรมีการตรวจโรคแท้งติดต่อกันเพื่อขจัดให้หมดไป 5. วัดโปรเจสเตอโรนในน้ำนมทุกสัปดาห์ เพื่อตรวจดูว่าโคเป็นสัดเงียบ (Silent heat) หรือไม่ (Foulkes and Heap, 1987) 6. หลังจากโคเป็นสัดได้ 16 วัน ทำการวัดโปรเจสเตอโรนในนมทุก 3 วัน เพื่อตรวจโคที่มีรอบการเป็นสัดสั้นกว่าปกติ (Foulkes and Heap, 1987) 7. พัฒนาวิธีวัดโปรเจสเตอโรนที่เร็วกว่านี้ เช่น วิธี Amplified enzyme-linked immunoassay (AELIA) จากรายงานของ Standley *et al.* (1986) ซึ่งใช้เวลาในการ วิเคราะห์เพียง 35 นาทีเท่านั้น และ 8. เพิ่มโปรแกรมการใช้ Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) เมื่อตรวจพบว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในวันที่ 22 หลังการผสมพันธุ์มีค่าต่ำ โดยทำการฉีด $PGF_{2\alpha}$ ในระยะเวลา 7 วันถัดมาและหลังจากนั้นจึงทำการผสมเทียมในวันที่ 3 และ 4 (Elmore, 1986) โดยวิธีนี้จะได้ลูกโคเร็วขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการ “การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอาหาร และการเกษตรโดยนิวเคลียร์เทคโนโลยี” รหัส THA/85/004 เป็นความร่วมมือระหว่าง รัฐบาลไทย, United Nations Development Programme (UNDP) และ International Atomic Energy Agency., IAEA ผู้ทดลองขอขอบคุณ ศาสตราจารย์มณีวรรณ กมลพัฒนะ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและแนะนำเทคนิคต่างๆ เกี่ยวกับวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเซ คุณนำพล กันทิยะ ที่ช่วยงานเก็บตัวอย่างและงานห้องปฏิบัติการ คุณดิงทอง รัตนธนาชาติ และ คุณบริบูรณ์ อุดมศรี ที่ช่วยเหลืองานด้านบริการสำนักงาน รศ.ศุภศักดิ์ ลิ้มปิติ ที่ช่วยแนะนำการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ คุณรัชชัย อินทรตุล คุณสมคิด พรหมมา สพ.ญ. อัมพวัน ตฤณารมย์ ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการพบปะกับเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

- กมลพัฒนะ, มณีวรรณ; ศรีศักดิ์พัฒนะ, กิตติยา และ สรรเพชญ, โสภณ. (2531). การตรวจ
ห้อยโคนม ระบบบริการ และผลงาน. ใน บทบาทการตรวจห้อยโคนมจากน้ำนม. หน้า
73-126. โรงพิมพ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- Bulman, C. (1976). Progesterone in milk: a potential aid to dairy management. *Span* 19 (3) : 102-105.
- Bulman, D.C. (1979). The measurement of progesterone in milk. *Br. Vet. J.* 135 : 460-461.
- Booth, J.M., Davies, J. and Holdsworth, R.J. (1979). Use of the milk progesterone test for pregnancy determination. *Br. Vet. J.* 135: 478 - 488.
- Booth, J.M. and Holdsworth, R.J. (1976). The establishment and operation of a central laboratory for pregnancy testing in cows. *Br. Vet. J.* 132 : 518-528.
- Cavestany, D. and Foote, R.H. (1985). The use of milk progesterone and electronic vaginal probes as aids in large dairy herd reproductive management. *Cornell Vet.* 75 : 441-453.
- Dobson, H. (1983). *A Radioimmunoassay Laboratory Handbook*. Liverpool University Press, Liverpool.
- Donaldson, L.E., Bassett, J.M. and Thorburn, G.D. (1970). Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty, oestrous cycles, pregnancy and lactation, and the effects of undernutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration. *J. Endocr.* 48 : 599-614.
- Dobson, H. and Fitzpatrick, R.J. (1976). Clinical application of the progesterone-in-milk test. *Br. Vet. J.* 132 : 538-542.
- Darling, J.A.B., Laing, A.H. and Harkness, R.A. (1974). A survey of the steroids in cow's milk. *J. Endocr.* 62 : 291-297.
- Eastman, S.A.K. (1979). Methods of improving the accuracy of positive results from milk progesterone pregnancy tests. *Br. Vet. J.* 135: 489 -491.
- Echternkamp, S.E. (1984). Relationship between LH and cortisol in acutely stressed beef cows. *Theriogenology* 22 : 305-311.
- Elmore, R.G. (1986). Using rapid progesterone assay kits to detect open cows. *Vet. Med.* 81(10) : 969-970, 972.
- Foulkes, J.A. and Heap, R.B. (1987). Managing fertility in dairy cattle. *Span* 30(1) : 42-44.
- Gadsby, J.E., Heap, R.B., Henville, A. and Laing, A.R.C. (1974). A semiautomated technique for the estimation of progesterone in cow's milk and its application to pregnancy diagnosis. *Proc. Physiol. Soc., J. Physiol.* 242 : 3p-5p.
- Glencross, R.G., Munro, I.B., Senior, B.E. and Pope, G.S. (1973). Concentrations of oestradiol-17 B, oestrone and progesterone in jugular venous plasma of cows during the oestrous cycle and in early pregnancy. *Acta Endocrinologica* 73 : 374-384.

: 374-384.

- Ginther, O.J., Nuti, L.C., Garcia, M.C., Wentworth, B.C. and Tyler, W.J. (1976). Factors affecting progesterone concentration in cow's milk and dairy products. *J. Anim. Sci.* 42 : 155-159.
- Holdsworth, R.J., Booth, J.M., Sharman, G.A.M. and Rattray, E.A.S. (1979). Radioimmunoassay of progesterone in milk : Development of techniques for large-scale use as a test of pregnancy. *Br. Vet. J.* 135:470-477.
- Hoffmann, B., Gunzler, O., Hamburger, R. and Schmitt, W. (1976). Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle; methodological approaches and present status of application in Germany. *Br. Vet. J.* 13 : 469-476.
- Heap, R.B., Holdsworth, R.J., Gadsby, J.E., Laing, J.A. and Walters, D.E. (1976). Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration. *Br. Vet. J.* 132 : 445-464.
- Hendricks, D.M., Lamond, D.R., Hill, J.R. and Dickey, J.F. (1971). Plasma progesterone concentrations before mating and in early pregnancy in the beef heifer. *J. Anim. Sci.* 33 : 450-454.
- Laitinen, J., Remes, E., Tenhunen, M., Hanninen, O. and Alanko, M. (1985). Milk progesterone in finish dairy cows : A field study on the control of artificial insemination and early pregnancy. *Br. Vet. J.* 141: 297 -307.
- Macfarlane, J.S., Booth, J.M., Deas, D.W. and Lowman, B.G. (1977). Pregnancy test and evaluation of embryonic and fetal mortality based on progesterone concentration in fore-milk. *Vet. Rec.* 100 : 565-566.
- Meredith, S., Kirkpatrick-keller, D. and Butcher, R. (1986). The effects of food restriction and hypophysectomy on numbers of primordial follicles and concentrations of hormones in rats. *Biol. Reprod.* 35 : 68-73.
- Nebel, R.L., Whittier, W.D., Cassell, B.G. and Britt, J.M. (1987). Comparison of on-farm and laboratory milk progesterone assays for identifying errors in detection of estrus and diagnosis of pregnancy. *J. Dairy Sci.* 70 : 1471-1476.
- Pope, G.S., Majzlik, I., Ball, P.J.H. and Leaver, J.D. (1976). Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *Br. Vet. J.* 132 : 497-506.
- Pennington, J.A., Spahr, S.L. and Lodge, J.R. (1976). Factors affecting progesterone in milk for pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Br. Vet. J.* 132 : 487-496.
- Robbertson, H.A. and Sarda, I.R. (1971). A very early pregnancy test for mammals : Its application to the cow, ewe and sow. *J. Endocr.* 49 : 407-419.
- Shemesh, M., Ayalon, N. and Lindner, H.R. (1973). Early pregnancy diagnosis based upon plasma progesterone levels in the cow and ewe. *J. Anim. Sci.* 36 : 726-729.
- Shemesh, M., Ayalon, N., Lavi, S., Mileguir, F., Shore, L.S. and Toby, D. (1983). A new approach to the use of progesterone levels for pregnancy determination. *Br. Vet. J.* 139 : 41-48.
- Schiavo, J.J., Matuszczak, R.L., Oltenacu, D.B. and Foote, R.H. (1975). Milk progesterone in postpartum and pregnant cows as a monitor of reproductive status.

- J. Dairy Sci. 58 : 1713-1716.
- Stabenfeldt, G.H., Osburn, B.I. and Ewing, L.L. (1970). Peripheral plasma progesterone levels in the cow. *Am. J. Physiol.* 218 : 571-575.
- Stanley, C.J., Paris, F., Webb, A.E., Heap, R.B., Ellis, S.T., Hamon, M., Worsfold, A. and Booth, J.M. (1986). Use of a new and rapid milk progesterone assay to monitor reproductive activity in the cow. *Vet. Rec.* 118 : 664-667.
- Walters, D.E. (1976). A note on the statistical aspects of pregnancy diagnosis. *Br. Vet. J.* 132 : 465-468.
- Worsfold, A.i., Booth, J.M., Weles, P.W., Huddart, A.C. and Stanley, C.J. (1987). The evaluation of a new rapid milk progesterone test as an aid to improving dairy herd fertility. *Br. Vet. J.* 143 : 83-87.
- Wimpy, T.H., Chang, C.F., Estergreen, V.L. and Hillers, J.K. (1986). Milk progesterone enzyme immunoassay : Modifications and a field trial for pregnancy detection in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69 : 1115-1121.
-