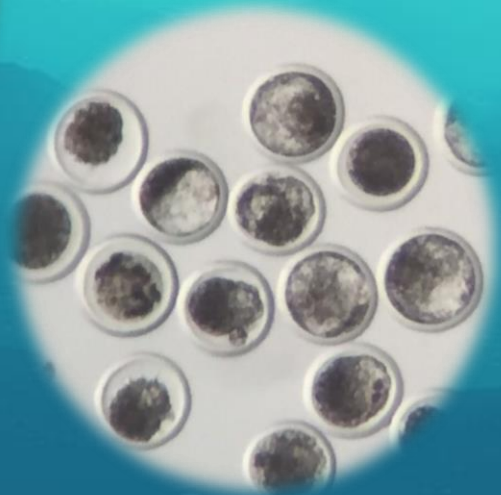




คู่มือปฏิบัติงาน

กระบวนการการผลิตและย้ายฝากเอ็มบริโอ โค – กระบือ

Clinical Practice Guidelines (CPG)



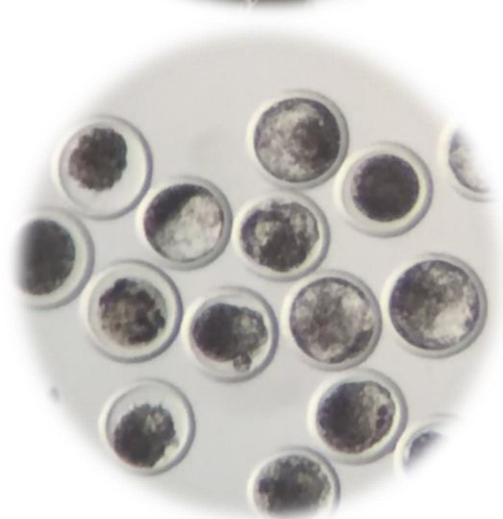
สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
Bureau of Biotechnology in Livestock Production
Department of Livestock Development



คู่มือปฏิบัติงาน

กระบวนการการผลิตและย้ายฟากเอ็มบริโอ โค กระบือ

Clinical Practice Guidelines (CPG)



สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
Bureau of Biotechnology in Livestock Production
Department of Livestock Development

คำนำ

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ได้ดำเนินการศึกษา ค้นคว้าและวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพด้านการผลิตปศุสัตว์ เพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง ใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์และผลิตสัตว์พันธุ์ดี และการกระจายของสัตว์พันธุ์ดีออกไปอย่างรวดเร็วและกว้างขวาง การย้ายฝากเอ็มบริโอ (embryo transfer) เป็นเทคโนโลยีชีวภาพด้านการผลิตปศุสัตว์อย่างหนึ่งที่มีความสำคัญในการพัฒนาปศุสัตว์พันธุ์ดีให้กระจายออกไปได้อย่างกว้างขวาง ในเวลาอันรวดเร็ว เพราะลดระยะเวลาในการพิสูจน์พ่อพันธุ์เพิ่มความแม่นยำในการทดสอบพันธุ์ของพ่อพันธุ์ นอกจากนี้ยังเป็นการสร้างสัตว์พันธุ์ดี โดยดึงเอาพันธุ์ดีจากสายของแม่ เข้ามามีบทบาทในการสร้างพันธุ์ดีอีกด้วย ความสำคัญตรงจุดนี้ทำให้พันธุ์ดีทางสายของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ได้ถูกกระจายออกไปพร้อม ๆ กัน สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ได้ใช้เทคโนโลยีฯ ดังกล่าว มาพัฒนางานตามภารกิจของสำนักฯ โดยมีเป้าหมายให้เทคโนโลยีดังกล่าวกระจายสู่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพต่าง ๆ ได้ช่วยกันศึกษา ค้นคว้าเพื่อให้นำเทคโนโลยีไปประยุกต์ใช้ได้ง่ายและสะดวกขึ้น สำนักฯ จึงมั่นใจว่างานตามภารกิจ จะบรรลุเป้าประสงค์ตามต้องการได้เป็นอย่างดี

ดังนั้น การขยายงานย้ายฝากเอ็มบริโอออกไปยังศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพต่าง ๆ เป็นหนทางหนึ่งที่จะขยายฐานของปศุสัตว์พันธุ์ดีให้กระจายถึงเกษตรกรได้กว้างขวาง บุคลากรของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ที่อยู่ในศูนย์วิจัยการผสมเทียมฯ ต่าง ๆ จะต้องมีความรู้และได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีการย้ายฝากเอ็มบริโอ นำไปประยุกต์ใช้กับงานในภารกิจที่ปฏิบัติอยู่ของศูนย์วิจัยการผสมเทียมฯ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนจึงได้จัดทำ “คู่มือปฏิบัติงาน กระบวนการผลิตและย้ายฝากเอ็มบริโอโค – กระบือ” เพื่อให้บุคลากรของสำนักฯ ได้มีการปฏิบัติงานเป็นมาตรฐานเดียวกัน โดยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า การนำเทคโนโลยีการย้ายฝากเอ็มบริโอไปใช้อย่างกว้างขวาง จะทำให้การพัฒนาพันธุ์โคของประเทศไทยมีความก้าวหน้า รวดเร็ว และก้าวไกล เป็นผู้นำการผลิตปศุสัตว์ในระดับภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ต่อไป

(นายสัตวแพทย์กิติกรณ เจนไพบูลย์)

ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

ตุลาคม 2566

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนำ	
สารบัญ	
สารบัญภาพ	
1. บทนำ.....	1
2. วัตถุประสงค์	2
3. ขอบเขต	2
4. คำนิยาม.....	3
5. กระบวนการ (Work Flow)	4
5.1 การผลิตเอ็มบริโอภายในร่างกาย (<i>In vivo</i> embryo production)	4
5.2 การผลิตเอ็มบริโอแบบนอกร่างกาย (<i>in vitro</i> embryo production)	5
5.3 การย้ายฝากเอ็มบริโอให้แม่โคตัวรับ	6
6. การคัดเลือกแม่ตัวให้	7
6.1 การคัดเลือกแม่โค – กระบือ ตัวให้.....	7
7. กระบวนการผลิตเอ็มบริโอ.....	8
7.1 การผลิตเอ็มบริโอภายในร่างกาย (<i>In vivo</i> embryo production)	8
7.1.1 การเก็บเอ็มบริโอจากแม่โค – กระบือตัวให้ (Donor)	8
7.1.2 การชะล้างเก็บเอ็มบริโอจากแม่โคตัวให้ มีขั้นตอนดังนี้.....	9
7.1.3 การจัดโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นเพิ่มการตกไข่หลายใบในกระบือ.....	15
7.1.4 การค้นหาและจัดการเอ็มบริโอ.....	15
7.2 การผลิตเอ็มบริโอแบบนอกร่างกาย (<i>in vitro</i> embryo production : IVP).....	16
7.2.1 การเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยเทคนิค Ovum Pick Up (OPU).....	16
7.2.2 การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (<i>in vitro</i> maturation : IVM).....	19
7.2.3 การเตรียมน้ำเชื้อและการปฏิสนธิกับโอโอไซต์ (semen preparation and <i>in vitro</i> fertilization: IVF).....	20
7.2.4 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (<i>in vitro</i> embryo culture: IVC).....	21

8.การประเมินคุณภาพ.....	22
และการแช่แข็งเอ็มบริโอ.....	22
8.1 การประเมินคุณภาพเอ็มบริโอ (embryo evaluation).....	22
8.2 การเก็บรักษาเอ็มบริโอโดยวิธีการแช่แข็ง (embryo cryopreservation).....	24
8.2.1 การเตรียมเอ็มบริโอก่อนการแช่แข็ง.....	24
8.2.2 ขั้นตอนการล้างเอ็มบริโอด้วยเอ็นไซม์.....	24
8.2.3 ขั้นตอนการแช่แข็งเอ็มบริโอโค.....	25
8.2.4 การจัดเก็บเอ็มบริโอเข้าธนาคารเอ็มบริโอ.....	28
9.การคัดเลือกแม่ตัวรับและการย้ายฝากเอ็มบริโอ.....	29
9.1 การคัดเลือกแม่โค - กระจกตัวรับ.....	29
9.2 การจัดโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัด.....	29
9.3 การล้วงตรวจตัวรับก่อนการย้ายฝากเอ็มบริโอ.....	29
9.4 การเตรียมเอ็มบริโอเพื่อย้ายฝากให้กับแม่โค - กระจกตัวรับ.....	31
9.5 การย้ายฝากเอ็มบริโอในโค - กระจกตัวรับ.....	33
10.การจัดการหลังการย้ายฝากเอ็มบริโอ.....	35
10.1 การจัดการแม่โค - กระจก ตัวให้ หลังการทำ MOET.....	35
10.2 การจัดการแม่โค - กระจก ตัวให้ หลังการทำ OPU.....	35
10.3 การติดตามตรวจการตั้งท้อง.....	35
10.4 การติดตามลูกเกิดและจัดทำทะเบียนประวัติ.....	36
10.5 ลูกสัตว์พันธุ์ดี.....	37
บรรณานุกรม.....	38
ภาคผนวก.....	40
ภาคผนวก 1.....	41
ตัวอย่างโปรแกรมการเตรียมแม่โค ตัวให้.....	41
ภาคผนวก 2.....	43
ตัวอย่างโปรแกรมการเตรียมแม่กระจก ตัวให้.....	43
ภาคผนวก 3.....	45
แบบบันทึกการเก็บเอ็มบริโอจากแม่โค - กระจก ตัวให้.....	45
ภาคผนวก 4.....	48

แบบบันทึกการจัดเก็บเอ็มบริโอเข้าธนาคารเอ็มบริโอ	48
ภาคผนวก 5.....	50
แบบบันทึกการบริการดูแลแม่โค - กระบือ ตัวให้หลังการเก็บเอ็มบริโอ.....	50
ภาคผนวก 6.....	52
ตัวอย่างโปรแกรมการเตรียมแม่โค - กระบือ ตัวรับ.....	52
ภาคผนวก 7.....	54
แบบบันทึกการฝากเอ็มบริโอในแม่โค - กระบือ ตัวรับ	54
ภาคผนวก 8.....	57
ปริมาณ Follicular Stimulating Hormone ที่ใช้ฉีดกระตุ้นในโคแต่ละสายพันธุ์	57
ภาคผนวก 9.....	59
การพิมพ์สลากแสดงข้อมูลของเอ็มบริโอ	59
ภาคผนวก 10.....	63
เวชภัณฑ์และน้ำยาที่ใช้ในงานผลิตเอ็มบริโอ	63
ภาคผนวก 11.....	65
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานผลิตเอ็มบริโอ	65
คณะผู้จัดทำ	68

สารบัญภาพ

เรื่อง

หน้า

รูปที่ 1 แมโคตัวให้พันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไตน์.....	7
รูปที่ 2 แมโคตัวให้พันธุ์อเมริกันบราห์มัน	7
รูปที่ 3 พ่อพันธุ์กระบือปลักไทย	7
รูปที่ 4 โปรแกรมการเตรียมแมโคตัวให้สำหรับการผลิตเอ็มบริโอ	8
รูปที่ 5 แมโคแสดงอาการเป็นสตัยนิ่ง (standing heat).....	9
รูปที่ 6 รั้งไข่แมโคที่ผ่านการเหนียวน้ำด้วยฮอร์โมนสำหรับ Superovulation.....	10
รูปที่ 7 อุปกรณ์ที่ใช้ในการชะล้างเก็บเอ็มบริโอจากแมโค - กระบือ ตัวให้ (Embryo flushing set)	11
รูปที่ 8 การวางยาชาที่โคนหาง (local epidural nerve block).....	11
รูปที่ 9 ตำแหน่งการวางยาชาที่โคนหาง (local epidural nerve block).....	12
รูปที่ 10 การใช้แท่งเหล็ก Cervical expander สำหรับสอดใส่ผ่านคอมดลูก.....	12
รูปที่ 11 การสอดสายชะล้างเอ็มบริโอ และการเป่าลมเข้ากระเปาะลมที่สายชะล้างเอ็มบริโอ	13
รูปที่ 12 ตำแหน่งกระเปาะลมของสาย Foley ในการชะล้างเอ็มบริโอ.....	13
รูปที่ 13 การปิดเปิดวาล์วปล่อยน้ำเข้าและออก	14
รูปที่ 14 การวางตำแหน่งของถ้วยกรองเอ็มบริโอแบบสำเร็จรูป	14
รูปที่ 15 การค้นหาเอ็มบริโอ	15
รูปที่ 16 การใช้ Mount piece เพื่อควบคุมการเคลื่อนที่ของเอ็มบริโอ	16
รูปที่ 17 วัสดุอุปกรณ์สำหรับตรวจหาและเคลื่อนย้ายเอ็มบริโอ	16
รูปที่ 18 สอดหัวตรวจอัลตราซาวด์ ชนิด transvaginal ultrasound-guided probe	17
รูปที่ 19 ชุดอุปกรณ์สำหรับการเจาะเก็บโอโอไซด์ด้วยวิธี OPU จากซ้ายไปขวา: เครื่องปั๊มสุญญากาศ, หัวตรวจอัลตราซาวด์ ชนิด transvaginal ultrasound-guided probe, เจลหล่อลื่น, เครื่องอัลตราซาวด์.....	18
รูปที่ 20 หัวตรวจอัลตราซาวด์ ชนิด transvaginal ultrasound-guided probe และเข็มสำหรับเจาะฟอลลิเคิล.....	18
รูปที่ 21 การแบ่งเกรดโอโอไซด์.....	19
รูปที่ 22 จานเพาะเลี้ยงแบบ 4 หลุม (4-well dishes for IVF).....	20
รูปที่ 23 ประเมิน motility ตรวจนับอสุจิด้วย hemocytometer	20
รูปที่ 24 เอ็มบริโอระยะมากกว่า 8 เซลล์	21
รูปที่ 25 เอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์	21
รูปที่ 26 ระยะการพัฒนากการของเอ็มบริโอหลังปฏิสนธิ	22
รูปที่ 27 เอ็มบริโอที่มีคุณภาพสามารถนำไปย้ายฝากได้ เกรด 1, 2, 3 เส้นประแสดงส่วนของเซลล์ที่ใช้คัดเกรดเอ็มบริโอ (inverted micro scope, 100x)	23
รูปที่ 28 การให้เกรดคุณภาพและระยะต่าง ๆ ของเอ็มบริโอโค AB : A blastocyst, AEB : A early blastocyst, BB : B blastocyst, BEB B early blastocyst, BCM : B compact morula, UFO : unfertilized ovum, Deg : degenerated embryo (stereomicroscope, 80x)	24
รูปที่ 29 การพิมพ์ข้อมูลประจำเอ็มบริโอบนฉลากที่ติดกับหลอดแช่แข็งเอ็มบริโอ	25
รูปที่ 30 ชุดอุปกรณ์แช่แข็งเอ็มบริโอแบบอัตโนมัติ.....	26

รูปที่ 31 การบรรจุเอ็มบริโอในหลอดแช่แข็ง	26
รูปที่ 32 การ seeding ในกระบวนการแช่แข็งเอ็มบริโอ	27
รูปที่ 33 การนำหลอดเอ็มบริโอแช่ในไนโตรเจนเหลว	27
รูปที่ 34 การเก็บเอ็มบริโอใส่ในกระบอกเก็บเอ็มบริโอ	28
รูปที่ 35 ภาพอัลตราซาวด์รังไข่โคตัวรับหลังการเป็นสัด 7 วัน	30
รูปที่ 36 ตัวอย่างภาพอัลตราซาวด์ในการให้เกรดรังไข่เกรด A, B, C (จากซ้ายไปขวา)	30
รูปที่ 37 อุปกรณ์สำหรับการย้ายฝากเอ็มบริโอ	31
รูปที่ 38 การเตรียมเอ็มบริโอสำหรับย้ายฝากเอ็มบริโอในโค - กระป๋องตัวรับด้วยวิธี direct transfer	32
รูปที่ 39 การวางยาชาที่โคนหาง (local epidural nerve block)	33
รูปที่ 40 การย้ายฝากเอ็มบริโอในโค - กระป๋องตัวรับ	33
รูปที่ 41 ตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับปล่อยเอ็มบริโอในมดลูกโค - กระป๋อง	34
รูปที่ 42 การตรวจท้องโค - กระป๋องโดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์	36
รูปที่ 43 ภาพแสดงการตรวจท้องโค - กระป๋องโดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์	36
รูปที่ 44 ลูกที่เกิดจากการย้ายฝากเอ็มบริโอ	37
รูปที่ 45 ลูกที่เกิดจากการย้ายฝากเอ็มบริโอ	37



คู่มือปฏิบัติงาน

กระบวนการการผลิตและย้ายฝากเอ็มบริโอ - กระบือ

1. บทนำ

เทคโนโลยีชีวภาพด้านการสืบพันธุ์ ปัจจุบันมีความก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว และนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ของพ่อและแม่พันธุ์ซึ่งเป็นพันธุ์ดี ให้สามารถสืบพันธุ์หรือผลิตลูกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเทคโนโลยีชีวภาพทางการสืบพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตปศุสัตว์ ได้แก่ การผสมเทียม การย้ายฝากเอ็มบริโอ การผลิตเอ็มบริโอนอกร่างกาย การคัดเลือกเพศของเอ็มบริโอและสเปิร์ม การโคลนนิ่ง และการดัดแปลงพันธุกรรมของสัตว์ เป็นต้น โดยเฉพาะเทคโนโลยีการย้ายฝากเอ็มบริโอ เป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้เพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของสัตว์เพศเมียที่มีพันธุกรรมชั้นเลิศ ให้มีโอกาสขยายพันธุ์เพิ่มขึ้น

เทคโนโลยีการย้ายฝากเอ็มบริโอ (embryo transfer technology) เป็นเทคโนโลยีขั้นสูงที่ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ได้เป็นอย่างดีและรวดเร็วขึ้น และยังช่วยป้องกันโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ เทคโนโลยีการย้ายฝากเอ็มบริโอ คือ การนำเอ็มบริโอ (embryo) ที่ผลิตจากพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีพันธุกรรมดี ในระยะก่อนการฝังตัวออกมาจากมดลูกของแม่สัตว์ตัวหนึ่ง ซึ่งจะเรียกว่าแม่ตัวให้ (donor) แล้วนำไปฝากให้กับแม่ตัวอีกตัวหนึ่ง ซึ่งเป็นสัตว์ชนิดเดียวกัน เรียกว่าแม่ตัวรับ (recipient) เอ็มบริโอจะฝังตัวในมดลูกของแม่ตัวรับและเจริญเติบโตเป็นลูกสัตว์ต่อไป ลูกสัตว์ที่เกิดขึ้นนี้จะได้ลักษณะพันธุกรรมครึ่งหนึ่งจากพ่อพันธุ์และอีกครึ่งหนึ่งจากแม่ตัวให้ เราสามารถย้ายฝากเอ็มบริโอนี้ได้ในสัตว์หลายชนิด เช่น โค กระบือ แพะ แกะ เป็นต้น เทคโนโลยีการย้ายฝากเอ็มบริโอในโคนมถูกทดลองเป็นผลสำเร็จครั้งแรกในปี ค.ศ. 1951 โดย Willet และคณะนักวิจัยจากมหาวิทยาลัย Cornell สหรัฐอเมริกา และเทคโนโลยีนี้ได้รับการปรับปรุงและเริ่มมีการใช้อย่างกว้างขวางตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 เป็นต้นมา สำหรับประเทศไทย ได้มีการศึกษาวิจัยเทคโนโลยีการย้ายฝากเอ็มบริโอ มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1984 แต่ส่วนใหญ่จะเป็นการวิจัยของหน่วยงานราชการ ทั้งในส่วนของการปศุสัตว์ และมหาวิทยาลัยต่าง ๆ และมีการนำไปถ่ายทอดใช้ในฟาร์มขนาดใหญ่บางแห่งเท่านั้น

ปัจจุบัน เทคโนโลยีการย้ายฝากเอ็มบริโอได้มีการพัฒนาและปรับปรุงให้สะดวกและง่ายในทางปฏิบัติ เช่น มีการพัฒนาฮอร์โมนที่ใช้เร่งให้มีการตกไข่ที่ละมาก ๆ ฮอร์โมนเหนี่ยวนำการเป็นสัดมีคุณภาพดีขึ้นสามารถกำหนดวันแสดงอาการเป็นสัดและให้ผลในการผลิตเอ็มบริโอที่มีคุณภาพดีขึ้น การเจาะเก็บโอโอไซด์ด้วยเทคนิค ovum pick up (OPU) ทำให้สามารถผลิตเอ็มบริโอจากสัตว์พันธุ์ดีจำนวนมากขึ้นในการผลิตเอ็มบริโอแบบนอกร่างกาย การพัฒนาเทคนิคการย้ายฝากเอ็มบริโอที่สะดวกรวดเร็วเหมาะสมที่จะใช้ในภาคสนาม ตลอดจนการย้ายฝากเอ็มบริโอให้กับตัวรับ ทำได้โดยไม่ต้องผ่าตัด รวมทั้งการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งเอ็มบริโอ ทำให้สามารถเก็บเอ็มบริโอได้เป็นระยะเวลานานหรือสามารถเคลื่อนย้ายเอ็มบริโอเพื่อกระจายพันธุ์ในที่ต่าง ๆ ได้สะดวก รวดเร็วขึ้น ซึ่งการพัฒนาเทคนิคเหล่านี้ทำให้การย้ายฝากเอ็มบริโอเป็นที่ยอมรับและปฏิบัติกันอย่างแพร่หลาย

ประโยชน์ของเทคโนโลยีการย้ายฝากเอ็มบริโอ

1. เพื่อปรับปรุงและขยายพันธุ์สัตว์ได้จำนวนมากและรวดเร็วขึ้น
2. เพื่อช่วยร่นระยะเวลาและลดค่าใช้จ่ายในการปรับปรุงและขยายพันธุ์สัตว์
3. เพื่อช่วยป้องกันโรคเข้ามาในประเทศ และออกจากประเทศ
4. เพื่อช่วยในการอนุรักษ์พันธุ์กรรมสัตว์หายากหรือใกล้สูญพันธุ์
5. เพื่อช่วยแก้ไขปัญหาคอ – กระบือ ที่มีปัญหาการผสมติดยาก ที่มาจากความล้มเหลวในการปฏิสนธิ
6. เพื่อเป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับเทคโนโลยีชีวภาพอื่น ๆ เช่น การโคลนนิ่ง การคัดเลือกเพศ การปฏิสนธินอกร่างกาย
7. เพื่อใช้ในงานวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพ งานวิจัยทางสัตวแพทย์ ทางเภสัชกรรมและทางการแพทย์

ในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์ วิธีและระบบการผสมพันธุ์เป็นสิ่งสำคัญ การใช้เทคโนโลยีการย้ายฝากเอ็มบริโอ จะช่วยให้การขยายพันธุ์ของสัตว์พันธุ์ดีได้จำนวนมากขึ้น และอัตราการขยายพันธุ์ของสัตว์พันธุ์ดีทางสายแม่พันธุ์เพิ่มขึ้น โดยมีจำนวนสัตว์พันธุ์ดีเพิ่มขึ้นทำให้คัดเลือกได้มากขึ้น ส่งผลให้ความเข้มข้นในการคัดเลือก (selection intensity) เพิ่มขึ้น ด้วย และร่นระยะเวลาช่วงชั่วรุ่น (generation interval) ลง เพราะผลผลิตสัตว์ได้เพิ่มขึ้น จากการที่แม่สัตว์พันธุ์ดีให้ลูกพันธุ์ดี ปีละตัวก็สามารถให้ลูกสัตว์พันธุ์ดีได้ปีละหลายตัวต่อแม่ ทำให้สามารถคัดเลือกแม่พันธุ์ที่มีอายุมากออกจากฝูงได้เร็วขึ้น นอกจากนี้การที่แม่พันธุ์ตัวหนึ่งให้ลูกได้ปีละหลายตัวทำให้มีข้อมูลมากขึ้นและสามารถเปรียบเทียบสัตว์ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ใกล้เคียงกัน ส่งผลให้ความแม่นยำในการประมาณค่าการผสมพันธุ์ (EBV) เพิ่มขึ้น ดังนั้น การใช้เทคโนโลยีการย้ายฝากเอ็มบริโอ จึงเป็นวิธีการขยายพันธุ์สำหรับการทดสอบพันธุ์ในแผนการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ นั้นจะส่งผลให้มีความก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุ์เพิ่มมากขึ้นด้วย

กรมปศุสัตว์ โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ มีหน้าที่ดำเนินการศึกษาวิจัย พัฒนาเทคนิค การผลิตและย้ายฝากเอ็มบริโอโค – กระบือ ของเกษตรกรที่สนใจ เพื่อช่วยในการพัฒนาปรับปรุงและขยายพันธุ์โค – กระบือ ของเกษตรกรให้มีคุณภาพดีขึ้นกว่าเดิมในระยะเวลาที่รวดเร็วขึ้น

2. วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงานย้ายฝากเอ็มบริโอโค – กระบือ ให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน

3. ขอบเขต

คู่มือนี้ครอบคลุมกระบวนการงานย้ายฝากเอ็มบริโอโค – กระบือ ทั้งกระบวนการ ตั้งแต่การคัดเลือกแม่ตัวให้ และแม่ตัวรับ การจัดโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่หลายใบในแม่ตัวให้ การเก็บเอ็มบริโอจากแม่ตัวให้ การค้นหาและการจัดการเอ็มบริโอ การเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยเทคนิค OPU การผลิตเอ็มบริโอแบบนอกร่างกาย การตรวจการเป็นสัดและการผสมเทียมแม่ตัวให้ การประเมินคุณภาพเอ็มบริโอ การแช่แข็งเอ็มบริโอ การเก็บเอ็มบริโอเข้าธนาคารเอ็มบริโอ การจัดโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแม่ตัวรับ การลี้ยงตรวจแม่ตัวรับ การเตรียม

เอ็มบริโอเพื่อการย้ายฝาก การย้ายฝากเอ็มบริโอในแม่ตัวรับ การติดตามตรวจการตั้งครรภ์ การติดตามลูกเกิดและจัดทำทะเบียนประวัติ

4. คำนิยาม

4.1 การย้ายฝากเอ็มบริโอในโค - กระบือ คือ การนำเอ็มบริโอ (embryo) ในระยะก่อนการฝังตัวออกมาจากมดลูกของแม่ตัวให้ (donor) แล้วนำไปย้ายฝากให้กับแม่ตัวรับ (recipient) ซึ่งเอ็มบริโอจะฝังตัวในมดลูกของแม่ตัวรับ และเจริญเติบโตเป็นลูกสัตว์พันธุ์ดีต่อไป และลูกที่เกิดขึ้นนี้จะได้ลักษณะพันธุกรรมครึ่งหนึ่งจากพ่อพันธุ์ชั้นเลิศและอีกครึ่งหนึ่งจากแม่ตัวให้

4.2 แม่ตัวให้ (Donor) คือ แม่พันธุ์โค - กระบือ ที่มีพันธุกรรมดีเลิศ ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าเป็นแม่พันธุ์ที่มีลักษณะดีเยี่ยมและให้ผลผลิตดีเลิศ

4.3 พ่อพันธุ์ชั้นเลิศ คือ พ่อพันธุ์โค - กระบือ ที่มีพันธุกรรมดีเลิศ และผ่านการทดสอบแล้วว่าสามารถถ่ายทอดพันธุกรรมดี

4.4 แม่ตัวรับ (Recipient) คือ แม่โค - กระบือ ที่ใช้สำหรับรับฝากเอ็มบริโอ ตั้งท้องและคลอดลูกแทนหรือที่เรียกว่า “แม่อุ้มบุญ”

4.5 Superovulation คือ การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ด้วย exogenous gonadotrophic hormone เป็นวิธีการที่ใช้เพื่อเพิ่มจำนวนไข่ (oocyte) ให้ไข่ตกจากรังไข่ในแต่ละรอบการเป็นสัด มากกว่าจำนวนปกติที่ตกในรอบการเป็นสัดปกติ

4.6 Estrus synchronization คือ การเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมน เพื่อให้แม่พันธุ์เป็นสัดในระยะเวลาพร้อมกันหรือใกล้เคียงกัน

4.7 เอ็มบริโอ (Embryo) คือ เอ็มบริโอในระยะก่อนการฝังตัว ซึ่งเก็บออกมาจากปีกมดลูกของแม่ตัวให้ หรือผลิตจากห้องปฏิบัติการ เพื่อนำไปย้ายฝากให้กับแม่ตัวรับ

4.8 การผลิตเอ็มบริโอแบบนอกร่างกาย (in vitro embryo production: IVP) คือ การผลิตเอ็มบริโอที่ผลิตแบบนอกร่างกาย เริ่มจากการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์จนเจริญพร้อมปฏิสนธิ (in vitro maturation: IVF) การปฏิสนธินอกร่างกาย (in vitro fertilization: IVF) และการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (in vitro culture: IVC)

5. กระบวนการ (Work Flow)

5.1 การผลิตเอ็มบริโอภายในร่างกาย (In vivo embryo production)

ลำดับ	ผังกระบวนการ	รายละเอียด	ผู้รับผิดชอบ	ระยะเวลา	แบบฟอร์ม
5.1.1		- ต้องปลอดจากโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ โรคแท้งติดต่อ (Brucellosis) โรควัณโรค (Tuberculosis) และโรคท้องเสียเรื้อรัง (Paratuberculosis) - มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ไม่ป่วย ไม่เครียด ตรวจระบบสืบพันธุ์โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ก่อนเข้าโปรแกรมการเหนี่ยวนำ - สภาพมดลูกปกติ ไม่มีการอักเสบหรือมีหนอง คอมมลูกขนาดไม่เล็กจนเกินไปหรือคดมดลูกไม่ยาวจนเกินไปเพราะจะทำให้ชะล้างเก็บเอ็มบริโอได้ลำบาก - รังไข่สมบูรณ์ทั้งสองข้าง ไม่สับหรือแบน	เจ้าหน้าที่งานผลิตเอ็มบริโอ	ตรวจโรค 21 วัน ตรวจระบบสืบพันธุ์ 1 วัน	แบบฟอร์ม ล้างตรวจ ระบบสืบพันธุ์
5.1.2		- โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นเพิ่มการตกไข่หลายใบใช้เวลา 23 วัน วันที่ 0 ตรวจรังไข่ ถ้าพบ follicle ขนาดใหญ่ต้องเจาะทำลายทิ้ง สอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (CIDR-B®) ทางช่องคลอด วันที่ 9 ฉีด PGF_{2α} ช่วงเช้า วันที่ 10 ถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนออกจากช่องคลอดช่วงเช้า โคจะเป็นสัดประมาณ วันที่ 12 วันที่ 19 ล้างตรวจรังไข่ เพื่อตรวจหา CL วันที่ 21 - 24 ฉีด FSH เข้า-เย็น (06.00 และ 18.00 น.) ต่อเนื่อง และฉีด PGF_{2α} ใน วันที่ 23 เข้า-เย็น (06.00 และ 18.00 น.) ฮอร์โมนที่ฉีดทุกตัวต้องฉีดเข้ากล้ามเนื้อเท่านั้น โดยปริมาณ FSH ที่ใช้ขึ้นอยู่กับพันธุ์และน้ำหนักของโค	เจ้าหน้าที่งานผลิตเอ็มบริโอ	23 วัน	โปรแกรมการเตรียมแม่โคตัวให้
5.1.5		วันที่ 24-26 ตรวจเช็คอาการเป็นสัด เมื่อพบเป็นสัดยืนยันให้ผสมเทียมครั้งที่ 1 หลังเป็นสัดยืนยัน 6-10 ชั่วโมง พร้อมทั้งฉีด GnRH ผสมเทียมครั้งที่ 2 และ 3 เว้นระยะห่างกันประมาณ 12 ชม. นำเชื้อที่ใช้ผสมเทียมต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีและผ่านการคัดเลือกแล้ว	เจ้าหน้าที่งานผลิตเอ็มบริโอ	3 วัน	โปรแกรมการเตรียมแม่โคตัวให้
5.1.6		วันที่ 32 ชะล้างเก็บเอ็มบริโอจากแม่โคตัวให้ มีขั้นตอนดังนี้คือ - นำแม่โคตัวให้เข้าของบ่งคับ และตรวจระบบสืบพันธุ์โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์นับจำนวน CL บนรังไข่แต่ละข้าง - ฉีดยาชาที่โคนหางเพื่อทำ local epidural nerve block - สอดอุปกรณ์และชะล้างเก็บเอ็มบริโอที่ปีกมดลูกแต่ละข้าง	เจ้าหน้าที่งานผลิตเอ็มบริโอ	1 ชั่วโมง	แบบบันทึกการเก็บเอ็มบริโอจากแม่โคตัวให้
5.1.7		- ตรวจหาเอ็มบริโอ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ - ดำเนินการรวบรวมเอ็มบริโอแม่โคตัวเดียวกันไว้ด้วยกัน โดยเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเอ็มบริโอ	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ	1 ชั่วโมง	แบบบันทึกการเก็บเอ็มบริโอจากแม่โคตัวให้
5.1.8		- ประเมินคุณภาพเอ็มบริโอ โดยดูจากลักษณะการแบ่งตัวของเซลล์ การยึดเกาะตัวสีและรูปร่างของเอ็มบริโอ ซึ่งจะแบ่งเอ็มบริโอได้เป็นระยะต่างๆ คือ morula, compact morula, early blastocyst, blastocyst, expand blastocyst และแบ่งเกรดเอ็มบริโอเป็น 1, 2, 3, 4 - เอ็มบริโอเกรด 1, 2 และ 3 คุณภาพย้ายฝากได้ ส่วนเกรด 1 และ 2 คุณภาพแช่แข็งได้ (บทที่ 8 การประเมินคุณภาพและการแช่แข็งเอ็มบริโอ)	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ	30 นาที	แบบบันทึกการเก็บเอ็มบริโอจากแม่โคตัวให้
5.1.9		- เอ็มบริโอเกรด 1 และ 2 ที่จะแช่แข็งจะนำไปล้างในน้ำยา trypsin ตามข้อบังคับของ IETS - บรรจุเอ็มบริโอในหลอด mini-straw โดยให้เอ็มบริโออยู่ในน้ำยาแช่แข็ง ติดฉลากข้อมูลเอ็มบริโอที่ปลั๊กหลอดบรรจุเอ็มบริโอ - แช่แข็งเอ็มบริโอโดยใช้เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติตามโปรแกรม โดย seeding ที่ -6°C	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ	2 ชั่วโมง	คู่มือการแช่แข็งเอ็มบริโอ
5.1.10		- นำหลอดบรรจุเอ็มบริโอแช่ในไนโตรเจนเหลว -196°C - ทำสต็อกข้อมูลธนาคารเอ็มบริโอที่เก็บในถัง	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ	20 นาที	แบบบันทึก embryo inventory
5.1.11		- หลังจากเก็บเอ็มบริโอจากแม่โคตัวให้แล้ว จะต้องฉีด PGF_{2α} เพื่อสลาย CL - เมื่อแม่โคตัวให้เป็นสัดรอบที่สองหลังการชะล้างเก็บเอ็มบริโอ สามารถทำการผสมเทียมได้ หรือถ้าไม่แสดงอาการเป็นสัดให้เจ้าหน้าที่เข้าไปด้วยการแก้ไขปัญห	เจ้าหน้าที่งานย้ายฝากเอ็มบริโอ / เจ้าหน้าที่ผสมเทียมของศูนย์ฯ	1 เดือน	แบบบันทึกการติดตามดูแลแม่โคตัวให้

5.2 การผลิตเอ็มบริโอแบบนอกร่างกาย (*in vitro embryo production*)

ลำดับ	ผังกระบวนการ	รายละเอียด	ผู้รับ ผิดชอบ	ระยะ เวลา	แบบ ฟอรัม
5.2.1		- ต้องปลอดจากโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ โรคแท้งติดต่อ (Brucellosis) โรควัณโรค (Tuberculosis) และโรคท้องเสียเรื้อรัง (Paratuberculosis) - มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ไม่ป่วย ไม่เครียด ตรวจระบบสืบพันธุ์โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ก่อนเก็บโอโอไซต์	เจ้าหน้าที่งานผลิตเอ็มบริโอ	ตรวจโรค 21 วัน ตรวจระบบสืบพันธุ์ก่อนเริ่มการผลิต 3 วัน	แบบฟอร์ม ล้างตรวจ ระบบสืบพันธุ์
5.2.2		- ฉีดยาเข้าช่องคลอดหลัง บริเวณโคนหางโค - เจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยเทคนิค Ovum Pick Up (OPU) ด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ ใช้หัวตรวจอัลตราซาวด์ ชนิด transvaginal ultrasound-guided probe ที่เชื่อมต่อกับชุดอุปกรณ์สำหรับการเจาะเก็บโอโอไซต์ - ประกอบ เครื่องปั๊มสุญญากาศ (50 - 70 มิลลิเมตรปรอท) และ heating block ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37°C เจาะฟอลลิเคิลที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถมองเห็นได้จอภาพของเครื่องอัลตราซาวด์ สังเกตเริ่มต้นดูดเก็บโอโอไซต์ได้จากฟอลลิเคิลที่มีลักษณะสีดำบนจอภาพจนกระทั่งฟอลลิเคิลสีดำบนหน้าจอหายไป - ใช้สารละลาย DPBS เสริมด้วย bovine serum และ penicillin-streptomycin ในหลอด centrifuge tube 50 มิลลิลิตร เป็นสารละลายเก็บโอโอไซต์ ไว้ที่ 37°C ใน heating block หลังจากเก็บโอโอไซต์เสร็จเรียบร้อยแล้ว - นำหลอด centrifuge tube 50 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย PBS และของเหลวในฟอลลิเคิลเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สแตไดออสโคป บันทึกจำนวนและคุณภาพของโอโอไซต์	เจ้าหน้าที่งานผลิตเอ็มบริโอ	1 วัน	โปรแกรมการเตรียมแม่โคตัวให้
5.2.3		- อุ่นน้ำยาเพาะเลี้ยงสำเร็จรูป maturation medium ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5°C นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง หรือตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ - กรองของเหลวที่เจาะได้ด้วยกรวยกรองเอ็มบริโอขนาด 75 ไมครอน จากนั้นตรวจหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สแตไดออสโคปกำลังขยายตั้งแต่ 40 เท่าขึ้นไป - นำโอโอไซต์มาล้าง 3 ครั้ง ในน้ำยา TCM-199 ที่เสริมด้วย fetal bovine serum และ penicillin-streptomycin - คัดเลือกโอโอไซต์ Class A ที่มีควมสุสเซลล์อัดแน่นอยู่ล้อมรอบโอโอไซต์เป็นลักษณะชั้น (cumulus layer) อย่างน้อย 1 ชั้นและเนื้อไซโตพลาสซึมมีความสม่ำเสมอเพาะเลี้ยง - เลี้ยงในน้ำยา maturation medium ที่เททับด้วย mineral oil ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และอุณหภูมิ 38.5°C นาน 22 - 24 ชั่วโมง - บันทึกข้อมูลการลงในแบบฟอร์มการผลิตเอ็มบริโอ	เจ้าหน้าที่งานผลิตเอ็มบริโอ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ	1 วัน	แบบบันทึกการผลิตเอ็มบริโอ
5.2.4		- อุ่นน้ำยาเพาะเลี้ยงสำเร็จรูป fertilization medium ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม หลุมละ 400 ไมโครลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5°C นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมงหรือตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ - เตรียมน้ำเชื้อโดยการปั่นล้าง ในน้ำยา semen preparation medium จำนวน 2 ครั้ง ให้เหลือน้ำยาที่มีตะกอนตัวอสุจิ และประเมิน motility ตรวจนับอสุจิด้วย hemocytometer - นำโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยงจนครบเวลาการเจริญพร้อมปฏิสนธิแล้ว มาล้าง 1 ครั้ง ด้วยน้ำยา fertilization medium และย้ายลงใน fertilization medium - คำนวณปริมาณน้ำเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นของตัวอสุจิ 1 ล้านตัว/mL เติมนลงในจานเพาะเลี้ยงที่มีโอโอไซต์อยู่ - เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และอุณหภูมิ 38.5°C นาน 18 - 19 ชั่วโมง	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ	1 วัน	แบบบันทึกการผลิตเอ็มบริโอ
5.2.5		- อุ่นน้ำยาเพาะเลี้ยงสำเร็จรูป culture medium ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ออกซิเจน 5% และอุณหภูมิ 38.5°C นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง - เมื่อสิ้นสุดเวลาการปฏิสนธิ ล้างเอ็มบริโอ 3 ครั้ง ในน้ำยา TCM-199 ที่เสริมด้วย fetal bovine serum และ penicillin-streptomycin และนำควมสุสเซลล์ออกโดยใช้เครื่อง vortex mixer หรือใช้แปดดูดเอ็มบริโอเข้าออกหลายๆ ครั้ง - ล้างเอ็มบริโอ 1 ครั้ง และเลี้ยงในน้ำยา culture medium ที่เททับด้วย mineral oil ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ออกซิเจน 5% และอุณหภูมิ 38.5°C นาน 7 - 8 วัน - ตรวจสอบและบันทึกข้อมูลการแบ่งตัวของเอ็มบริโอในวันที่ 4 และการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์ในวันที่ 7 หลังการปฏิสนธิ	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ	7 - 8 วัน	แบบบันทึกการผลิตเอ็มบริโอ
5.2.6		- เอ็มบริโอเกรด 1 และ 2 ที่จะแช่แข็งจะนำไปล้างในน้ำยา trypsin ตามข้อบังคับของ IETS - บรรจุเอ็มบริโอในหลอด mini-straw โดยให้เอ็มบริโออยู่ในน้ำยาแช่แข็ง ติดฉลากข้อมูลเอ็มบริโอที่ปลั๊กอุดหลอดบรรจุเอ็มบริโอ - แช่แข็งเอ็มบริโอโดยใช้เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติตามโปรแกรม โดย seeding ที่ -6°C	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ	2 ชั่วโมง	แบบบันทึกการผลิตเอ็มบริโอ
5.2.7		- นำหลอดบรรจุเอ็มบริโอแช่ในไนโตรเจนเหลว -196°C - ทำสต็อกข้อมูลธนาคารเอ็มบริโอที่เก็บในถัง	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ	20 นาที	แบบบันทึก embryo inventory

5.3 การย้ายฝากเอ็มบริโอให้แม่โคตัวรับ

ลำดับ	ผังกระบวนการ	รายละเอียด	ผู้รับ ผิดชอบ	ระยะ เวลา	แบบฟอร์ม
5.3.1		- กรณีตัวรับเป็นโคนมแนะนำให้ใช้โคสาว ไม่เคยมีลูกมาก่อน - กรณีตัวรับเป็นโคนเนื้อ สามารถใช้โคสาว หรือแม่โคก็ได้ - ไม่จำเป็นต้องเป็นสายพันธุ์เดียวกับตัวอ่อน โคที่แข็งแรงและจับบั้งคังจะเพิ่มอัตราความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อน - ตัวรับจะต้องมีสุขภาพสมบูรณ์ คณะแนวร่างกายอยู่ระหว่าง 3.0 - 3.5 - ต้องปลอดจากโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ - สภาพมดลูกไม่มีการอักเสบหรือมีหนอง	เจ้าหน้าที่งานย้ายฝากเอ็มบริโอ / เจ้าหน้าที่ผสมเทียมของศูนย์ฯ	2 ชั่วโมง	แบบฟอร์ม ฝากเอ็มบริโอ ระบบสืบพันธุ์
5.3.2		- โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัดและย้ายฝากเอ็มบริโอใช้เวลา 20 วัน - วันที่ 0 ล้างตรวจรังไข่ ถ้าพบ follicle ขนาดใหญ่ต้องเจาะทำลายทิ้ง ใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด หรือชนิดฝังใต้ผิวหนังบริเวณใบหู - วันที่ 10 ฉีด PGF_{2α} ช่วงเช้า - วันที่ 11 ถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนออกช่วงเช้า โคจะเป็นสัดประมาณวันที่ 13 ให้ตรวจเช็คอาการสัดยืนยัน - วันที่ 20 ล้างตรวจรังไข่ เพื่อตรวจหา CL และฝากเอ็มบริโอในปีกมดลูกข้างที่พบ CL	เจ้าหน้าที่งานย้ายฝากเอ็มบริโอ / เจ้าหน้าที่ผสมเทียมของศูนย์ฯ	19 วัน	โปรแกรมการเตรียมแม่โคตัวรับ
5.3.3		- ล้างตรวจทางทวารหนักหรือใช้เครื่องอัลตราซาวด์ตรวจดูรังไข่ทั้ง 2 ข้างเพื่อดูคุณภาพของ CL ว่าเหมาะสมที่จะย้ายฝากเอ็มบริโอได้หรือไม่ และอยู่ด้านใด - การประเมินคุณภาพของ CL ดูจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ CL และความสมบูรณ์ของรูปร่างของ CL เป็นเกณฑ์ในการให้คะแนน - A= CLขนาดใหญ่เกินครึ่งของเนื้อรังไข่ B= CLประมาณครึ่งหนึ่งของเนื้อรังไข่ C= CLขนาดเล็กกว่าครึ่งของเนื้อรังไข่	เจ้าหน้าที่งานย้ายฝากเอ็มบริโอ / เจ้าหน้าที่ผสมเทียมของศูนย์ฯ	5 นาที	แบบบันทึกการย้ายฝากเอ็มบริโอในโคตัวรับ
5.3.4		- กรณีเป็นเอ็มบริโอสด บรรจุเอ็มบริโอในหลอด mini-straw ในน้ำยาเลี้ยงเอ็มบริโอ แล้วนำไปใส่ใน ET gun, ET blue sheath และ sanitary sheath พร้อมฝาก - กรณีเป็นเอ็มบริโอแช่แข็งต้องละลายเอ็มบริโอก่อน (direct transfer) โดยนำเอ็มบริโอออกมาจากถังเก็บ นำออกมาอยู่ในอากาศ 10 วินาที แล้วละลายในน้ำอุ่น 35-37°C นาน 30 วินาที ผสมน้ำยาในหลอดเอ็มบริโอให้เข้ากันโดยการเขย่าหรือเคาะเบา ๆ แล้วตัดปลายหลอดที่เป็นปลั๊กอุด นำมาบรรจุใน ET gun, ET blue sheath และ sanitary sheath	เจ้าหน้าที่งานย้ายฝากเอ็มบริโอ / เจ้าหน้าที่ผสมเทียมของศูนย์ฯ / เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ	5 นาที	แบบบันทึกการย้ายฝากเอ็มบริโอในโคตัวรับ
5.3.5		- สอด ET Gun เข้าไปในปากช่องคลอด เมื่อถึงหน้าปากมดลูก (cervix) ให้ดึง sanitary ให้ขาด แล้วดัน ET gun เข้าในปากมดลูก ค่อยๆสอดให้ผ่านเข้าในมดลูก - เมื่อเข้าถึงมดลูกแล้วให้เบี่ยงปลาย ET gun ไปในปีกมดลูกข้างที่พบ CL ที่รังไข่ ค่อย ๆ นำปีกมดลูกสวมเข้ามาที่ ET gun พยายามไปให้ได้มากที่สุด อย่างต่ำต้องเกินครึ่งหนึ่งของปีกมดลูก เมื่อได้ตำแหน่งที่ดีแล้ว ให้ดันก้านปล่อยเอ็มบริโออย่างรวดเร็ว เพื่อให้เอ็มบริโอหลุดเข้าไปในมดลูก แล้วนำ ET gun ออกมา	เจ้าหน้าที่งานย้ายฝากเอ็มบริโอ / เจ้าหน้าที่ผสมเทียมของศูนย์ฯ	20 นาที	แบบบันทึกการย้ายฝากเอ็มบริโอในโคตัวรับ
5.3.6		- ตรวจการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากเอ็มบริโอแล้วประมาณ 30 วัน โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ - หรือสังเกตด้วยมือผ่านทางทวารหนักเมื่อตั้งท้องได้ประมาณ 60 วัน	เจ้าหน้าที่งานย้ายฝากเอ็มบริโอ / เจ้าหน้าที่ผสมเทียมของศูนย์ฯ	20 นาที	แบบรายงานการตรวจท้อง
5.3.7		- เมื่อครบกำหนดคลอด ให้ติดตามลูกเกิดและจัดทำทะเบียนประวัติ	เจ้าหน้าที่งานย้ายฝากเอ็มบริโอ / เจ้าหน้าที่ผสมเทียมของศูนย์ฯ	30 นาที	แบบ ผท.1
5.3.8		- ได้ลูกสัตว์พันธุ์ดีตามพันธุกรรมของแม่โคตัวให้และพ่อโคพันธุ์ที่ดี			

6. การคัดเลือกแม่ตัวให้

6.1 การคัดเลือกแม่โค - กระบือ ตัวให้

คัดเลือกแม่โค กระบือตัวให้จากแม่โค - กระบือที่มีประวัติและพันธุกรรมที่ดีตรงตามเป้าหมายความต้องการของทั้งเกษตรกรและทางราชการ เพื่อให้งานย้ายฝากเอ็มบริโอประสบผลสำเร็จด้วยดี เราต้องมีการคัดเลือกตัวให้ดังนี้

1. ต้องปลอดจากโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ โรคแท้งติดต่อ (Brucellosis) โรควัณโรค (Tuberculosis) และโรคท้องเสียเรื้อรัง (Paratuberculosis)
2. มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ไม่ป่วย ไม่เครียด คะแนนร่างกายอยู่ระหว่าง 3.0 – 3.5
3. แม่โค - กระบือ ไม่อยู่ในช่วงของการให้นมลูก หากเป็นโคนมไม่ควรอยู่ในช่วงพีคของการให้นม หากเป็นโคเนื้อ/กระบือ ควรอยู่ในช่วงที่ย่านมลูกแล้วอย่างน้อย 1 เดือน
4. ตรวจระบบสืบพันธุ์โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ก่อนเข้าโปรแกรม
5. สภาพมดลูกปกติ ไม่อักเสบหรือมีหนอง คอมนดลูกขนาดไม่เล็กจนเกินไปหรือคด มดลูกไม่ยาวจนเกินไปเพราะจะทำให้ชะล้างเก็บเอ็มบริโอได้ลำบาก
6. รังไข่สมบูรณ์ทั้งสองข้างไม่ลีบหรือแบน ควรมีขนาดไม่ต่ำกว่า $1.5 \times 1.5 \times 2.0$ cm. และแม่โคจะต้องมีวงรอบการเป็นสัดตามปกติ ไม่มีถุงน้ำที่รังไข่



รูปที่ 1 แม่โคตัวให้พันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์



รูปที่ 2 แม่โคตัวให้พันธุ์อเมริกันบราห์มัน



รูปที่ 3 พ่อพันธุ์กระบือปลักไทย

7.กระบวนการผลิตเอ็มบริโอ

การผลิตเอ็มบริโอในโค - กระบือ ประกอบด้วย การผลิตเอ็มบริโอภายในร่างกาย และการผลิตเอ็มบริโอภายในห้องปฏิบัติการ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

7. กระบวนการผลิตเอ็มบริโอ

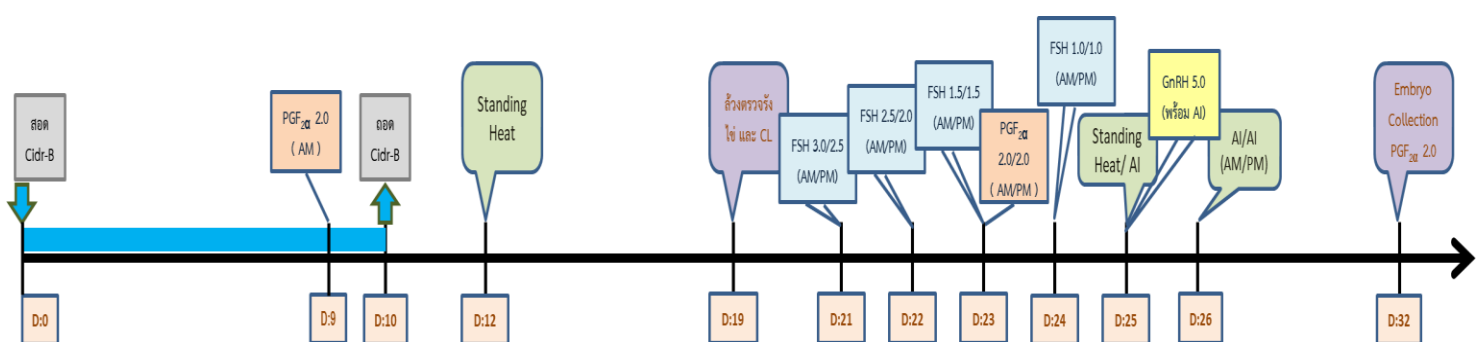
7.1 การผลิตเอ็มบริโอภายในร่างกาย (*In vivo* embryo production)

การผลิตเอ็มบริโอภายในร่างกาย หรือเรียกว่า การผลิตและย้ายฝากเอ็มบริโอด้วยการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ และการย้ายฝากเอ็มบริโอ (multiple ovulation and embryo transfer: MOET) ซึ่งมีขั้นตอนตั้งแต่การกระตุ้นรังไข่ของแม่พันธุ์ชั้นเยี่ยมให้สร้างฟอลลิเคิลจำนวนมากและผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ชั้นเลิศ ปฏิสนธิได้เอ็มบริโอที่มีพันธุกรรมสูงตามเป้าหมายเป็นจำนวนมาก พร้อมทั้งนำไปถ่ายฝากยังสัตว์ตัวรับ โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ได้ดำเนินการผลิตและย้ายฝากเอ็มบริโอที่ปฏิสนธิภายในร่างกาย ให้กับเกษตรกรเป็นระยะเวลามากกว่า 20 ปี จากข้อมูลศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ รายงานค่าเฉลี่ยเอ็มบริโอคุณภาพดีที่ผลิตด้วยวิธี MOET ประมาณ 6 เอ็มบริโอต่อแม่ตัวให้ต่อครั้ง และสามารถผลิตได้สูงสุด 3 - 4 ครั้งต่อแม่ตัวให้ต่อปี โดยมีรายละเอียดดังนี้

7.1.1 การเก็บเอ็มบริโอจากแม่โค - กระบือตัวให้ (Donor)

การจัดโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นเพิ่มการตกไข่หลายใบในแม่โคตัวให้

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบเป็นระยะเวลา 24 วัน โดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด และใช้ฮอร์โมน follicular stimulating hormone (FSH) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาณ 200 - 400 มิลลิกรัมต่อแม่โคตัวให้ แล้วแต่สายพันธุ์และขนาดโค ด้วยวิธีการบริหารยาลดปริมาณการฉีด (decreasing dose) ร่วมกับฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในปริมาณ 2 ml ต่อแม่โคตัวให้ รายละเอียดดังนี้



รูปที่ 4 โปรแกรมการเตรียมแม่โคตัวให้สำหรับการผลิตเอ็มบริโอ

- วันที่ 0 ล้างตรจรงไข่ ถ้าพบ follicle ขนาดใหญ่ต้องเจาะทำลายทิ้ง แล้วสอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ชนิดสอดช่องคลอด
- วันที่ 9 ฉีด $PGF_{2\alpha}$ 2.0 ml. ช่วงเช้า (09.00 น.)
- วันที่ 10 สอด ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ออกช่วงเช้า (09.00 น.) โคจะเป็นสัดวันที่ 12 บันทึกรวัน เวลาที่เป็นสัด

- วันที่ 19** ล้วงตรวจรังไข่ เพื่อตรวจหา CL ถ้าไม่พบ CL ให้พิจารณาว่าควรจะดำเนินการตามโปรแกรมต่อไปหรือไม่ ซึ่งมักจะเสี่ยงต่อการไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมน FSH ที่ฉีด (ควรยกเลิกโปรแกรม) และถ้าพบ follicle ขนาดใหญ่ให้ใช้อุปกรณ์เข็มเจาะทำลาย follicle เพื่อไม่ให้ขัดขวางต่อการพัฒนาของ follicle ขนาดเล็กใบอื่นๆ
- วันที่ 21 - 24** ฉีด FSH เข้า/เย็น (06.00 / 18.00 น. คลาดเคลื่อนไม่เกิน ± 1 ชม) ทุกวัน ขนาด 300 mg. (ปริมาณ 15 ml. ในโคนมแบ่งฉีดเข้า/เย็น 4 วัน วันที่ 1: 3.0/2.5 วันที่ 2: 2.5/2.0 วันที่ 3: 1.5/1.5 ml.) วันที่ 4: 1.0/1.0 ml.) และฉีด PGF_{2α} ในวันที่ 23 เข้า/เย็น (2.0/2.0 ml.) ฮอร์โมนที่ฉีดทุกตัวต้องฉีดเข้ากล้ามเนื้อเท่านั้น บริเวณที่ฉีดจะเป็นที่แผลหรือสวกก็ไม่ได้แต่ต้องไม่ฉีดซ้ำ ๆ บริเวณที่เดิม ให้ฉีดกระจายตำแหน่งการฉีดออกไปหลาย ๆ จุด
- วันที่ 24-26** ตรวจเช็คอาการเป็นสตัยนิ่ง โดยทั่วไปจะเป็นสตัยนิ่งในวันที่ 25 แต่ก็มีโค - กระบือ บางตัวที่เป็นสตัยเร็วหรือช้ากว่ากำหนด ทำการผสมเทียมครั้งที่ 1 หลังแมโค - กระบือ เป็นสตัยนิ่ง 6-10 ชั่วโมง พร้อมทั้งฉีด GnRH ปริมาณ 5.0 ml. ผสมเทียมครั้งที่ 2 และ 3 ห่างกันแต่ละครั้งประมาณ 12 ชม. เพื่อให้ น้ำเชื้อได้ผสมกับไข่ที่ตกได้อย่างทั่วถึง น้ำเชื้อที่ใช้ผสมเทียมต้องเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีคุณภาพดีจากพ่อพันธุ์เดียวกัน
- วันที่ 32** ชะล้างเก็บเอ็มบริโอจากแมโค - กระบือ ตัวให้ ซึ่งเท่ากับ 7 วันหลังจากแสดงอาการเป็นสตัย



รูปที่ 5 แมโคแสดงอาการเป็นสตัยนิ่ง (standing heat)

7.1.2 การชะล้างเก็บเอ็มบริโอจากแมโคตัวให้ มีขั้นตอนดังนี้

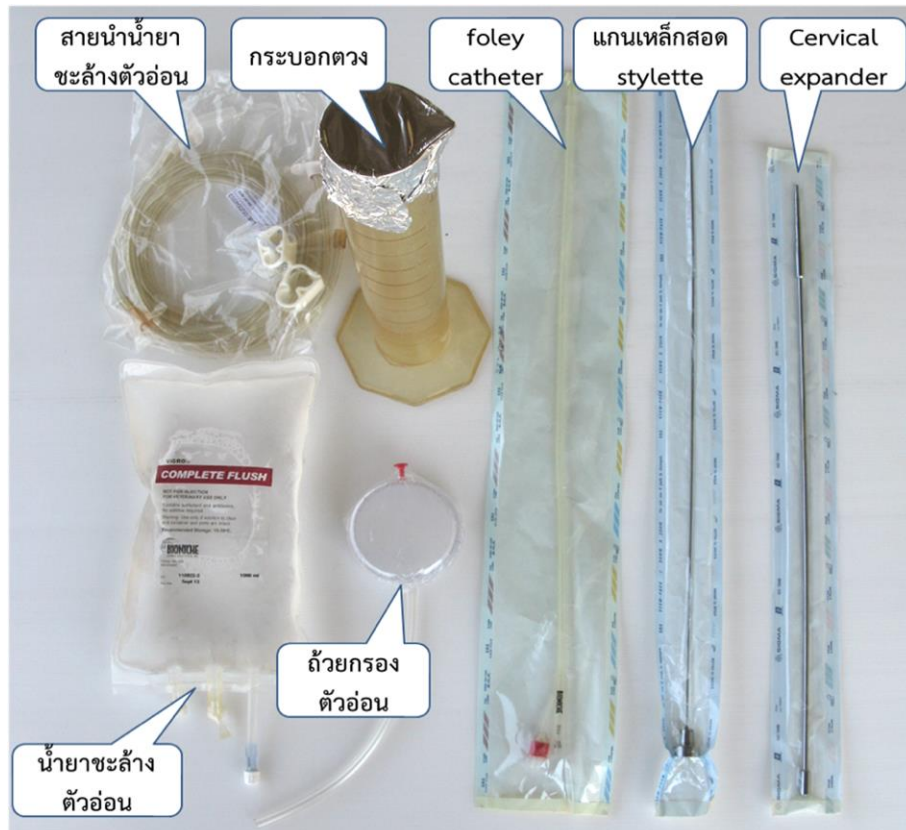
- 1) นำแมโคตัวให้มาเข้าซองบังคับ เพื่อล้วงตรวจรังไข่ทางทวารหนักโดยใช้มือคลำหรือใช้อัลตราซาวด์ นับจำนวน CL บนรังไข่แต่ละข้าง เพื่อประเมินจำนวนเอ็มบริโอที่คาดว่าจะเก็บได้จากแมโค - กระบือ ตัวให้ หากบางครั้งจะพบ CL 1 หรือ 2 ใบให้พิจารณาว่าควรชะล้างเก็บเอ็มบริโอหรือปล่อยให้แมโคตั้งท้อง



รูปที่ 6 รังไข่แมโครที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนสำหรับ Superovulation

2) เตรียมอุปกรณ์และน้ำยาสำหรับชะล้างเอ็มบริโอให้พร้อมสำหรับการปฏิบัติงาน ดังนี้

- น้ำยาชะล้างเอ็มบริโอขนาด 1 ลิตร (flushing media) ต้องอุ่นให้ได้อุณหภูมิ 37°C และใช้ ไชริงจ์ขนาด 50 ml. บรรจุน้ำยาไว้ใช้สำหรับการหล่อลื่นอุปกรณ์ และล้างเยื่อกรองเอ็มบริโอ
- ประกอบถ้วยกรองเอ็มบริโอให้เข้ากันให้แน่นและติดเข้ากับกระบอกตวงน้ำ ตั้งให้ตรง โดยให้ด้านที่เป็นจุดสีแดงอยู่ด้านบน ยึดให้แน่นด้วยกระดาษขาว (รูปที่ 13)
- ต่อสายสำหรับชะล้างเอ็มบริโอ (3-way flushing tube set) เข้ากับน้ำยาชะล้างเอ็มบริโอที่แขวนอยู่สูงกว่าระดับมดลูกโคประมาณ 1 เมตร และปลายอีกด้านต่อเข้ากับถ้วยกรองเอ็มบริโอ แล้วเปิดวาล์วควบคุมน้ำเข้า (ด้านบน) ให้น้ำยาชะล้างเอ็มบริโอไล่อากาศออกจากสายส่วนบนออกให้หมด แล้วปิดวาล์วทั้งหมดให้เรียบร้อย
- เตรียมอุปกรณ์สอดมดลูก (foley catheter เบอร์ 16 หรือ 18) โดยใช้ไชริงจ์ขนาด 20 ml. ดันอากาศเข้าที่วาล์วเติมอากาศเพื่อทดสอบการพองตัวของกระเปาะลมที่ปลายสาย foley ปรับการพองตัวของกระเปาะลมให้สมดุล ไม่พองด้านใดด้านหนึ่ง แล้วปล่อยลมออกจากกระเปาะลมให้หมด ใช้น้ำยาชะล้างเอ็มบริโอที่ดูดใส่ไชริงจ์ขนาด 50 ml. ไว้แล้ว ใส่ในท่อ foley เพื่อหล่อลื่นอุปกรณ์ แล้วใช้แกนเหล็ก stylette สอดเข้าไปในท่อ foley เพื่อให้สอดเข้ามดลูกได้ง่าย

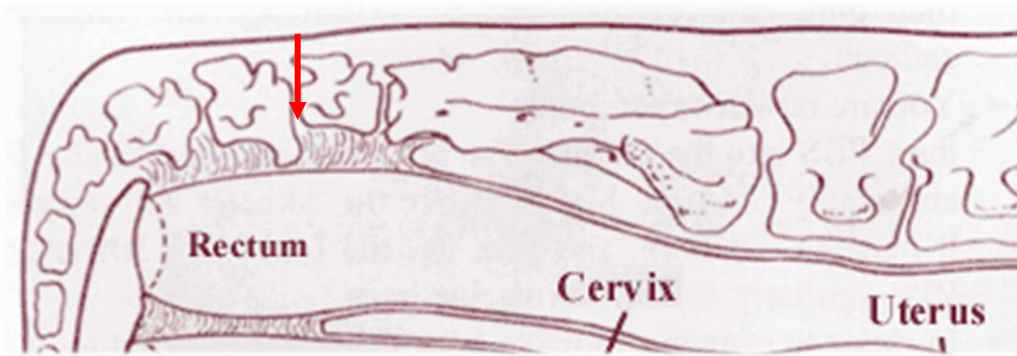


รูปที่ 7 อุปกรณ์ที่ใช้ในการชะล้างเก็บเอ็มบริโอจากแม่โค - กระบือ ตัวให้ (Embryo flushing set)

- 3) ทำ Local epidural nerve block โดยฉีดยาชา (Lidocaine HCl) ปริมาณ 2-3 ml. เข้าที่โพรงไขสันหลังส่วนหาง โดยใช้เข็มเบอร์ 21 ยาว 1.5 นิ้ว เพื่อลดการบีบรัดในส่วนท้ายของแม่โคจากนั้นผูกหางให้เรียบร้อย



รูปที่ 8 การวางยาชาที่โคนหาง (local epidural nerve block)



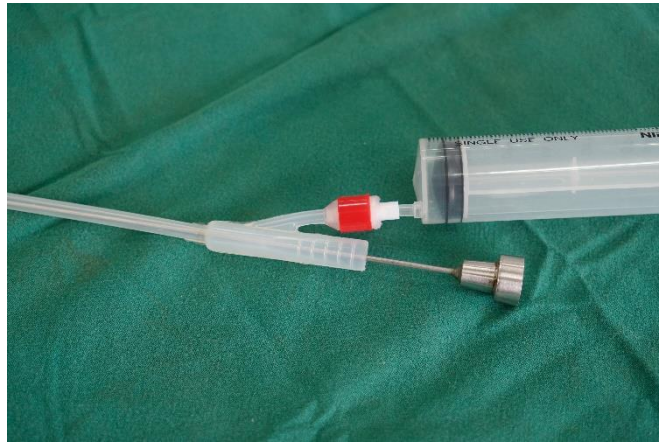
รูปที่ 9 ตำแหน่งการวางยาชาที่โคนหาง (local epidural nerve block)

- 4) ล้างทำความสะอาดบริเวณกันและอวัยวะเพศเมียด้วยน้ำสะอาด เช็ดให้แห้งและเช็ดด้วยแอลกอฮอล์
- 5) ใช้แท่งเหล็ก cervical expander ทาด้วยเจลหล่อลื่น สอดเข้าไปในช่องคลอด โดยสอดให้ผ่านคอมดลูก(cervix) จนถึงรูเปิดภายในมดลูก (internal os) เพื่อกำจัดเมือกที่ค้างอยู่ในคอมดลูก และเพื่อให้เรารู้ถึงทิศทางของท่อคอมดลูกที่คิดว่าเลี้ยวไปทางไหนบ้าง



รูปที่ 10 การใช้แท่งเหล็ก Cervical expander สำหรับสอดใส่ผ่านคอมดลูก

- 6) สอดอุปกรณ์สาย foley ที่เตรียมไว้ โดยสอดให้ผ่าน cervix เข้าที่ส่วน body ของมดลูก หลังจากนั้นเปียงปลาย foley ให้เข้าไปในปีกมดลูกด้านใดด้านหนึ่ง สอดให้เข้าถึงบริเวณ bifurcation แล้วให้ผู้ช่วยถอยแกนเหล็ก stylette ออกเล็กน้อยประมาณ 3 - 4 นิ้ว เพื่อให้ปลาย foley โค้งไปตามปีกมดลูกได้ แล้วดันปลาย foley เข้าไปอีกจนได้ตำแหน่งที่เหมาะสมคือ ให้ลูกโป่งอยู่ที่ตำแหน่งเลย bifurcation เล็กน้อย จากนั้นให้ผู้ช่วยใช้ไซริงค์ขนาด 20 ml. ดันอากาศเข้าที่วาล์วภายนอกของ foley ตามที่ผู้ปฏิบัติงานบอก ขนาดของลมที่อัดเข้าไปในแปรผันตามขนาดของปีกมดลูกและตำแหน่งของลูกโป่งที่พองตัว ซึ่งผู้ปฏิบัติงานจะต้องใช้มือสัมผัสความตึงตัวของลูกโป่งภายในตลอดเวลา ซึ่งโดยทั่วไปจะต้องอัดลมเข้าไปประมาณ 8 - 12 ml.



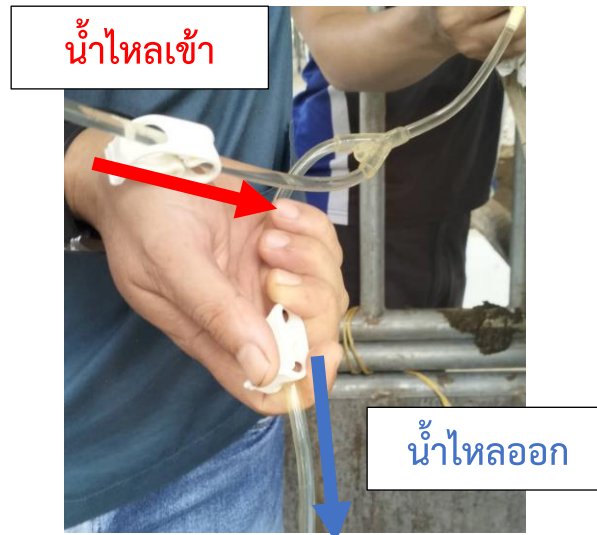
รูปที่ 11 การสอดสายชะล้างเอ็มบริโอ และการเป่าลมเข้ากระเปาะลมที่สายชะล้างเอ็มบริโอ



รูปที่ 12 ตำแหน่งกระเปาะลมของสาย Foley ในการชะล้างเอ็มบริโอ

- 7) ถอดแกนเหล็กออกแล้วนำสายนำน้ำยาชะล้างเอ็มบริโอสวมแทนที่ปลายด้านนอกของ foley
- 8) เริ่มการชะล้างเอ็มบริโอ โดยเปิดวาล์วน้ำเข้า (วาล์วบน) ให้น้ำยาชะล้างเอ็มบริโอไหลเข้าไปในปีกมดลูกประมาณครึ่งหนึ่งของขนาดปลายปีกมดลูกที่ถูกกั้นด้วยกระเปาะลม แล้วปิดวาล์วบน เปิดวาล์วน้ำออก (วาล์วล่าง) ให้น้ำไหลออกดูว่าน้ำยาไหลได้ปกติหรือไม่ ถ้าน้ำยาไหลได้ปกติก็ทำงานได้ต่อไป แต่ถ้าน้ำยาไหลไม่สะดวกหรือติดขัดก็ให้รีบหาสาเหตุแล้วแก้ไข หรือเริ่มทำขั้นตอนการสอดอุปกรณ์ใหม่ จากนั้นทำการชะล้างเก็บเอ็มบริโอโดยปล่อยน้ำยาชะล้างเอ็มบริโอเข้าปีกมดลูกจนเต็ม ซึ่งตรวจสอบได้โดยการใช้มือคลำที่ปลายปีกมดลูกด้านที่ล้างเก็บเอ็มบริโอ ว่าน้ำยาเข้าถึงจนมีการฟองเต่งหรือไม่ แล้วปิดวาล์วน้ำเข้า-เปิดวาล์วน้ำออกให้น้ำยาไหลออกจากปีกมดลูกให้หมด พร้อมทั้งใช้มือยกปลายปีกมดลูกพร้อมกับนิ้วบดเบา ๆ เพื่อกระตุ้นให้เอ็มบริโอหลุดและไหลออกมา

กับน้ำยาที่ชะล้าง น้ำยาชะล้างเอมบริโอจะพาเอมบริโอออกมาภายนอกตามสายชะล้าง และโดนกักเก็บไว้ที่ถ้วยกรองเอมบริโอ น้ำส่วนเกินจะไหลทิ้งออกไปในกระบอกตวง ซึ่งจะต้องตรวจสอบความสัมพันธ์กันของน้ำยาที่เข้าไปกับน้ำยาที่ไหลออกมาด้วยว่าควรจะใกล้เคียงกัน ถ้าน้ำยาที่ออกมาน้อยกว่าน้ำยาที่ใส่เข้าไปมีปริมาณที่ต่างกันมากให้หาสาเหตุแล้วรีบแก้ไขทันที



รูปที่ 13 การปิดเปิดวาล์วปล่อยน้ำเข้าและออก



รูปที่ 14 การวางตำแหน่งของถ้วยกรองเอมบริโอแบบสำเร็จรูป

- 9) ปฏิบัติตามขั้นตอนการชะล้างเก็บเอมบริโอซ้ำกันหลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้เอมบริโอออกมาให้มากที่สุด โดยทั่วไปจะใช้น้ำยาชะล้างเอมบริโอประมาณ 400 - 500 ml. ต่อหลอดแต่ละข้าง
- 10) เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้วให้ผู้ช่วยปล่อยลมในกระเปาะลมออก และไล่น้ำยาออกจากหลอดให้หมดพร้อมกับดึงสาย foley ออก
- 11) เตรียมสาย foley อันใหม่ เพื่อสอดและชะล้างเก็บเอมบริโอจากปีกมดลูกอีกข้างหนึ่ง ปฏิบัติเหมือนข้างแรก
- 12) เมื่อชะล้างเก็บเอมบริโอทั้งสองข้างเรียบร้อยแล้ว ถอดสายนำน้ำยาชะล้างออกจากถ้วยกรองเอมบริโอและปิดรูด้านบนด้วยจุกสีแดง เขียนชื่อแม่โคแล้วนำเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อค้นหาเอมบริโอ

7.1.3 การจัดโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นเพิ่มการตกไข่หลายใบในกระปือ

โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบในกระปือ มีขั้นตอนและกระบวนการเหมือนกับในโค ต่างกันที่จำนวนวันและปริมาณการใช้ฮอร์โมนกระตุ้นเพิ่มการตกไข่หลายใบ

วันที่ 0 ล้างตรวจรังไข่ แล้วสอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ชนิดสอดช่องคลอด

วันที่ 1 ฉีดฮอร์โมน estradiol 2.5 – 2.7 mg. /ตัว

วันที่ 5 - 9 ฉีด FSH เข้า/เย็น (06.00/18.00 น. คลาดเคลื่อนไม่เกิน 30 นาที) ทุกวัน ขนาด 400 mg. ปริมาณ 20 ml. ในกระปือแบ่งฉีดเข้า/เย็น 5 วัน วันที่ 1: 3.0/3.0 ml. วันที่ 2: 2.5/2.5 ml. วันที่ 3: 2.0/2.0 ml. วันที่ 4: 1.5/1.5 ml. วันที่ 5: 1.0/1.0 ml. ถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ชนิดสอดช่องคลอดออก ในเช้าวันที่ 8 ร่วมกับฉีด PGF_{2α} ในวันที่ 8 เข้า/เย็น (2.0/2.0 ml.) ฮอร์โมนที่ฉีดทุกตัวต้องฉีดเข้ากล้ามเนื้อเท่านั้น บริเวณที่ฉีดจะเป็นที่แดงคอไม่ฉีดซ้ำๆบริเวณที่เดิม ให้ฉีดกระจายตำแหน่งการฉีดออกไปหลายๆ จุด

วันที่ 10 - 11 เริ่มผสมเทียมในวันที่ 10 ช่วงเย็น ร่วมกับฉีดฮอร์โมน GnRH ปริมาณ 10 ml. และผสมเทียมซ้ำในวันที่ 11 เช้า และเย็น (ผสมเทียมทั้งหมดจำนวน 3 ครั้ง)

วันที่ 17 เก็บเอ็มบริโอ ขั้นตอนเหมือนกับการชะล้างและเก็บเอ็มบริโอในโค

7.1.4 การค้นหาและจัดการเอ็มบริโอ

- 1) เตรียมจานพลาสติกปลอดเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 - 100 mm. เพื่อเป็นจานตรวจหาเอ็มบริโอที่ชะล้างจากมดลูกโค ใช้ปลายเข็มหรือของแหลมขีดเบาๆพอให้เห็นรอยเฉพาะที่ด้านนอกของส่วนฐานของจานเป็นเส้นแนวนอนและแนวตั้งเป็นตารางขนาดประมาณ 1x1 cm. เพื่อให้ตรวจหาเอ็มบริโอได้สะดวกขึ้น ให้เตรียมจานทดลองที่ขีดเส้นตารางไว้แล้ว 3 ชุดต่อการชะล้างเอ็มบริโอ 1 เอ็มบริโอ
- 2) เตรียมน้ำยาเลี้ยงเอ็มบริโอแบบชั่วคราว (holding medium) ในน้ำยานี้ประกอบด้วยสารอาหารสำหรับเลี้ยงเอ็มบริโอในระยะสั้นๆ ระหว่างการตรวจหา หลังจากหาเอ็มบริโอพบแล้ว ระหว่างรอกำหนดนำเอ็มบริโอไปย้ายฝากตลอดจนการแช่แข็ง สามารถเตรียมได้เองโดยใช้น้ำยา phosphate buffered saline (PBS) เติมด้วย 10% calf serum และยาปฏิชีวนะ หรือจะใช้น้ำยาสำเร็จรูปก็ได้ ให้อุ่นน้ำยาที่อุณหภูมิ 37°C ก่อนนำมาสัมผัสเอ็มบริโอ
- 3) นำถ้วยกรองเอ็มบริโอ (รูปที่ 15) ไปห้องปฏิบัติการ แยกฝาและถ้วยกรองออกจากกัน โดยให้ด้านที่มีเอ็มบริโออยู่ด้านล่าง (ด้านที่มีจุดสีแดง) แล้วนำไปวางบน warm plate ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37°C ล้างหน้าแล้ว เพื่อรักษาอุณหภูมิเอ็มบริโอ ส่วนเมือกที่ติดที่เยื่อกรองเอ็มบริโอให้ใช้ไซริงจ์ขนาด 50 ml. บรรจุน้ำยาชะล้างเอ็มบริโอแล้วต่อกับเข็มเบอร์ 21 ฉีดล้างเมือกออกโดยใช้จานทดลองที่ขีดเส้นตารางไว้แล้วอันใหม่รองรับ ให้ฉีดล้างจนเห็นว่าเมือกหลุดออกจากเยื่อกรองหมดแล้ว
- 4) ค้นหาเอ็มบริโอโดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereomicroscope) ขนาดกำลังขยายประมาณ 10 - 15 เท่า (10x - 15x) โดยการหาเวียนไปมาตามแนวที่ขีดเส้นไว้เพื่อช่วยให้สามารถหาได้ทั่วทุกพื้นที่ ถ้ามีเศษเซลล์หรือเมือกบ้างก็ให้ใช้ปิเปตต์ที่ปลายปิดเฉียงเพื่อช่วยในการค้นหา (รูปที่ 16)



รูปที่ 15 การค้นหาเอ็มบริโอ

เมื่อพบเอ็มบริโอ ให้เคลื่อนย้ายเอ็มบริโอจากถ้วยกรองหรือจานทดลองไปที่จานทดลองปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 cm. หรือชนิด 4 หลุม (4 - well dish) ที่มีน้ำยาเลี้ยงเอ็มบริโอแบบชั่วคราวอุ่นที่ 37 °C การเคลื่อนย้ายเอ็มบริโอใช้ปิเปตต์แก้ว หรือ capillary tube ที่เตรียมไว้ล่วงหน้าแล้ว ที่ยึดให้ปลายมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 200 ไมครอน ต่อกับสายยางโดยปลายอีก ด้านหนึ่งต่อกับปิเปตต์ทิป (pipette tip) เพื่อใช้ควบคุมการเคลื่อนที่ของเอ็มบริโอด้วยปากของผู้ปฏิบัติงาน (mount piece)



รูปที่ 16 การใช้ Mount piece เพื่อควบคุมการเคลื่อนที่ของเอ็มบริโอ



รูปที่ 17 วัสดุอุปกรณ์สำหรับตรวจหาและเคลื่อนย้ายเอ็มบริโอ

- 5) นำเอ็มบริโอจากแม่โคตัวเดียวกันใส่ในจานหรือหลุมเดียวกัน บันทึกชื่อหรือหมายเลขแม่โคบนฝาจานทดลองพร้อม เครื่องหมายหรือจุดแสดงจำนวนเอ็มบริโอที่นำลงไปในการทดลอง เมื่อตรวจหาเอ็มบริโอจนครบหมดแล้ว ประเมิน คุณภาพเอ็มบริโอภายใต้กล้องจุลทรรศน์
- 6) จัดบันทึกข้อมูลลงในแบบฟอร์มการผลิตเอ็มบริโอ

7.2 การผลิตเอ็มบริโอแบบนอกร่างกาย (*in vitro* embryo production : IVP)

7.2.1 การเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยเทคนิค Ovum Pick Up (OPU)

- 1) ตรวจความพร้อมของแม่โคก่อนทำการเจาะเก็บโอโอไซต์โดยวิธี OPU ไม่น้อยกว่า 3 วัน เพื่อเจาะสลายฟอลลิเคิล ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 มิลลิเมตร บนรังไข่ของแม่โคตัวให้ ทั้ง 2 ข้าง ด้วยวิธี OPU โดยเป็นการลด ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเพื่อไม่ให้ไปขัดขวางการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลขนาดเล็กที่จะเติบโตให้ที่ขนาด เหมาะสมแก่การเจาะเก็บโอโอไซต์ ในวันที่กำหนด โดยทำการเจาะเก็บ จำนวน 12 ครั้ง ทุก 21 วันติดต่อกัน

- 2) ในวันที่ทำการเจาะเก็บโอโอไซด์ ทำการฉีดยาชาเข้าช่องไขสันหลัง บริเวณโคนหางโค ด้วย lidocaine 2% ปริมาณ 3 - 5 มิลลิลิตร เพื่อลดความรู้สึกบริเวณส่วนท้ายของลำตัวและหาง ล้างมูลโคออกจากทวารหนัก จากนั้นทำความสะอาดอวัยวะเพศภายนอกด้วยผ้าชุบน้ำบิดหมาด และสอดหัวตรวจอัลตราซาวด์ ชนิด transvaginal ultrasound-guided probe ที่เชื่อมต่อกับชุดอุปกรณ์สำหรับการเจาะเก็บโอโอไซด์ด้วยวิธี OPU ประกอบด้วย เครื่องปั๊มสุญญากาศ (50 - 70 มิลลิเมตรปรอท) และ heating block ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37°C เจาะฟอลลิเคิลที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถมองเห็นได้จากจอภาพของเครื่องอัลตราซาวด์ เริ่มต้นดูดเก็บโอโอไซด์จากฟอลลิเคิลที่มีลักษณะสีดำบนจอภาพจนกระทั่งฟอลลิเคิลสีดำบนหน้าจอหายไป



รูปที่ 18 สอดหัวตรวจอัลตราซาวด์ ชนิด transvaginal ultrasound-guided probe



รูปที่ 19 ชุดอุปกรณ์สำหรับการเจาะเก็บโอโอไซด์ด้วยวิธี OPU จากซ้ายไปขวา: เครื่องปั๊มสุญญากาศ, หัวตรวจอัลตราซาวด์ ชนิด transvaginal ultrasound-guided probe, เจลหล่อลื่น, เครื่องอัลตราซาวด์



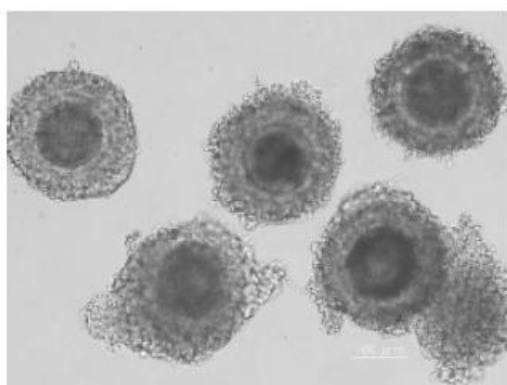
รูปที่ 20 หัวตรวจอัลตราซาวด์ ชนิด transvaginal ultrasound-guided probe และเข็มสำหรับเจาะฟอลลิเคิล

- 3) ใช้สารละลาย DPBS with calcium and magnesium เสริมด้วย เสริมด้วย 10% (v/v) bovine serum และ 100 U/mL penicillin-streptomycin ในหลอด centrifuge tube 50 มิลลิลิตร เป็นสารละลายเก็บโอโอไซด์ ซึ่งต้องคงอุณหภูมิสารละลาย DPBS นี้ไว้ที่ 37°C ใน heating block หลังจากเก็บโอโอไซด์เสร็จเรียบร้อยแล้ว

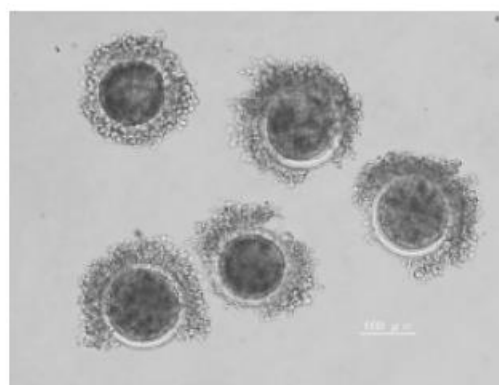
- 4) นำหลอด centrifuge tube 50 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย PBS และของเหลวในฟอลลิเคิลเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ บันทึกจำนวนและคุณภาพของโอโอไซต์

7.2.2 การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (*in vitro* maturation : IVM)

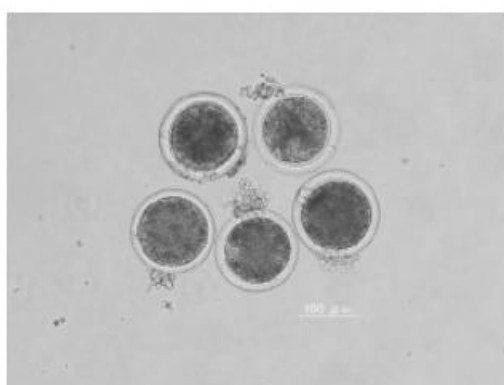
- 1) อุ่นน้ำยาเพาะเลี้ยงสำเร็จรูป maturation medium ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5°C นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง หรือตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์
- 2) กรองของเหลวที่เจาะได้ด้วยถ้วยกรองเอ็มบริโอขนาด 75 ไมครอน จากนั้นตรวจหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอกำลังขยายตั้งแต่ 40 เท่าขึ้นไป
- 3) นำโอโอไซต์มาล้าง 3 ครั้ง ในน้ำยา TCM-199 with Earle's salts, L-glutamine, NaHCO₃, and HEPES ที่เสริมด้วย 1% (v/v) fetal bovine serum และ 100 U/mL penicillin-streptomycin
- 4) คัดเลือกโอโอไซต์ Class A ที่มีคิวมูลัสเซลล์อัดแน่นอยู่ล้อมรอบโอโอไซต์เป็นลักษณะชั้น (cumulus layer) อย่างน้อย 1 ชั้นและเนื้อไซโทพลาสซึมมีความสม่ำเสมอ เพาะเลี้ยง (รูปที่ 19)
- 5) เลี้ยงในน้ำยา maturation medium ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/20 โอโอไซต์ ที่เททับด้วย mineral oil ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และอุณหภูมิ 38.5°C นาน 22 – 24 ชั่วโมง
- 6) บันทึกข้อมูลการลงในแบบฟอร์มการผลิตเอ็มบริโอ



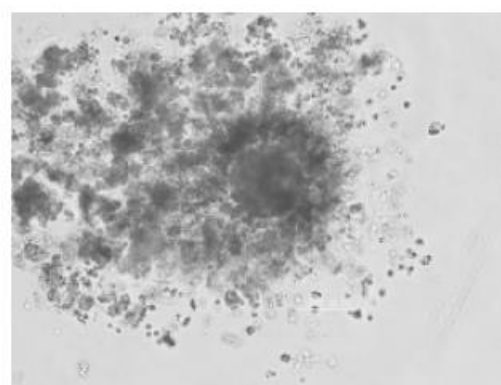
Class A



Class B



Class C



Class D

รูปที่ 21 การแบ่งเกรดโอโอไซต์

- 7) นำโอโอไซต์มาล้าง 1 ครั้ง และเลี้ยงในน้ำยา maturation medium ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 4 หลุม (4-well dishes for IVF)

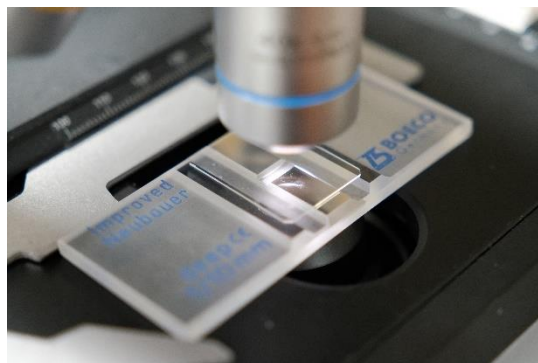


รูปที่ 22 จานเพาะเลี้ยงแบบ 4 หลุม (4-well dishes for IVF)

- 8) เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และอุณหภูมิ 38.5°C นาน 21 - 23 ชั่วโมง
- 9) บันทึกข้อมูลลงในแบบฟอร์มการผลิตเอ็มบริโอ

7.2.3 การเตรียมน้ำเชื้อและการปฏิสนธิกับโอโอไซต์ (semen preparation and in vitro fertilization: IVF)

- 1) อุ่นน้ำยาเพาะเลี้ยงสำเร็จรูป fertilization medium ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม หลุมละ 400 ไมโครลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5°C นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง หรือตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์
- 1) เตรียมน้ำเชื้อโดยการปั่นล้าง ที่ 300g นาน 5 นาที ในน้ำยา semen preparation medium ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ให้เหลือน้ำยาที่มีตะกอนตัวอสุจิประมาณ 200 ไมโครลิตร และประเมิน motility ตรวจนับอสุจิด้วย hemocytometer



รูปที่ 23 ประเมิน motility ตรวจนับอสุจิด้วย hemocytometer

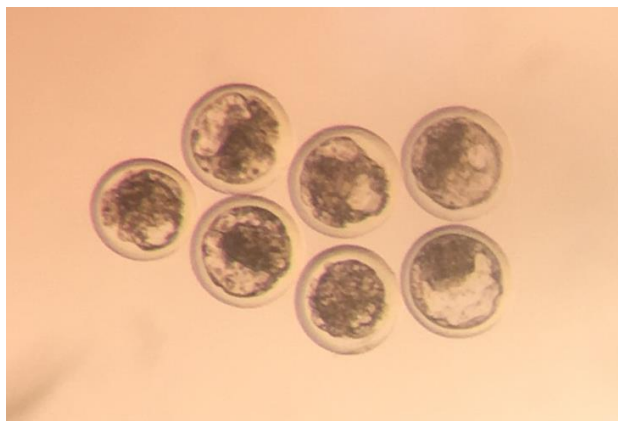
- 2) ระหว่างที่รอการปั่นน้ำเชื้อ นำโอโอไซด์ที่เพาะเลี้ยงจนครบเวลาการเจริญพร้อมปฏิสนธิแล้ว มาล้าง 1 ครั้ง ด้วยน้ำยา fertilization medium และย้ายลงใน fertilization medium 400 ไมโครลิตร
- 3) คำนวณปริมาณน้ำเชื้อที่จะเติมในงานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม ที่มีน้ำยา fertilization medium 400 ไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้นของตัวอสุจิ 1 ล้านตัว/mL เพื่อเติมลงในงานเพาะเลี้ยงที่มีโอโอไซด์อยู่
- 4) เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และอุณหภูมิ 38.5°C นาน 18 - 19 ชั่วโมง
- 5) บันทึกข้อมูลลงในแบบฟอร์มการผลิตเอ็มบริโอ

7.2.4 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (*in vitro* embryo culture: IVC)

- 1) อุ่นน้ำยาเพาะเลี้ยงสำเร็จรูป culture medium ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ออกซิเจน 5% และอุณหภูมิ 38.5°C นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง หรือตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์
- 2) เมื่อสิ้นสุดเวลาการปฏิสนธิ ล้างเอ็มบริโอ 3 ครั้ง ในน้ำยา TCM-199 with Earle's salts, L-glutamine, NaHCO₃, and HEPES ที่เสริมด้วย 1% (v/v) fetal bovine serum และ 100 U/mL penicillin-streptomycin และนำควมูลัสเซลล์ออกโดยใช้เครื่อง vortex mixer หรือปิเปตต์ดูดเอ็มบริโอเข้าออกหลายๆ ครั้ง
- 3) ล้างเอ็มบริโอ 1 ครั้ง และเลี้ยงในน้ำยา culture medium ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่เททับด้วย mineral oil ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ออกซิเจน 5% และอุณหภูมิ 38.5°C นาน 7 - 8 วัน
- 4) ตรวจสอบและบันทึกข้อมูลการแบ่งตัวของเอ็มบริโอในวันที่ 4 (รูปที่ 23) และการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์ในวันที่ 7 หลังการปฏิสนธิ (รูปที่ 24)
- 5) บันทึกข้อมูลลงในแบบฟอร์มการผลิตเอ็มบริโอ



รูปที่ 24 เอ็มบริโอระยะมากกว่า 8 เซลล์

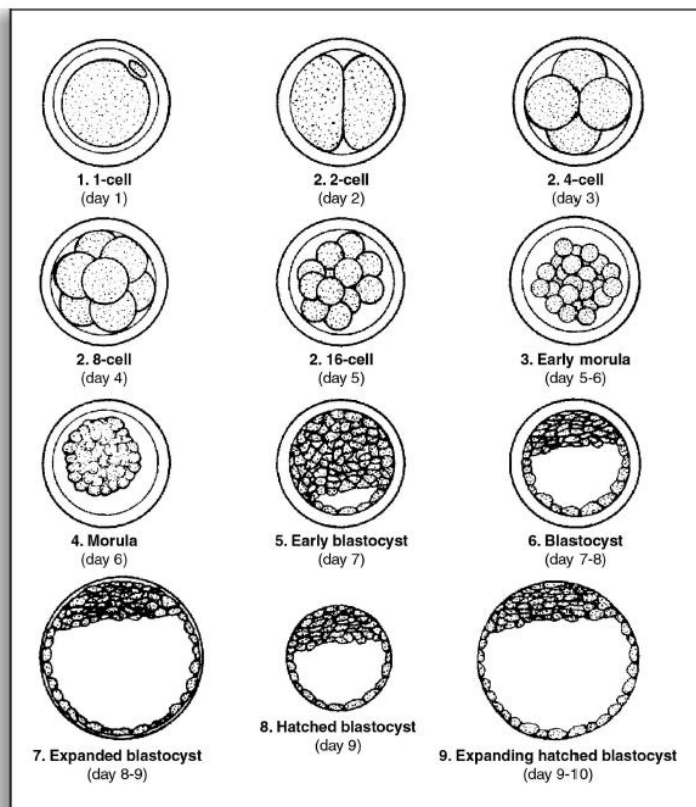


รูปที่ 25 เอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์

8.การประเมินคุณภาพและการแช่แข็งเอ็มบริโอ

8.1 การประเมินคุณภาพเอ็มบริโอ (embryo evaluation)

- 1) ประเมินคุณภาพเอ็มบริโอภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอขนาดกำลังขยายตั้งแต่ 40 เท่าขึ้นไปหรือกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) ขนาดกำลังขยาย 40 - 100 เท่า



รูปที่ 26 ระยะการพัฒนารูปร่างของเอ็มบริโอหลังปฏิสนธิ

- 2) การประเมินคุณภาพของเอ็มบริโอ ดูจากลักษณะการแบ่งตัวของเซลล์เอ็มบริโอ การยึดเกาะของเซลล์ สีและรูปร่างของเอ็มบริโอ โดยในขั้นแรกต้องทราบถึงพัฒนาการ การเจริญเติบโตของเอ็มบริโอในระยะต่างๆ หลังจากปฏิสนธิจนถึงวันที่ถูกชะล้างจากปีกมดลูก ก่อนที่จะให้คะแนน (เกรด) การเจริญของเอ็มบริโอโคแสดงดังรูปที่ 25
- 3) การแบ่งระยะเอ็มบริโอใช้ระบบ ตามมาตรฐานสากลของสมาคมย้ายฝากเอ็มบริโอระหว่างประเทศ (International Embryo Transfer Society: IETS) กำหนดไว้ (รูปที่ 20) ดังนี้

ระยะ 1 คือ เอ็มบริโอระยะ 1 เซลล์ (1 cell) หรือเอ็มบริโอที่ไม่ถูกปฏิสนธิ (unfertilized embryo)

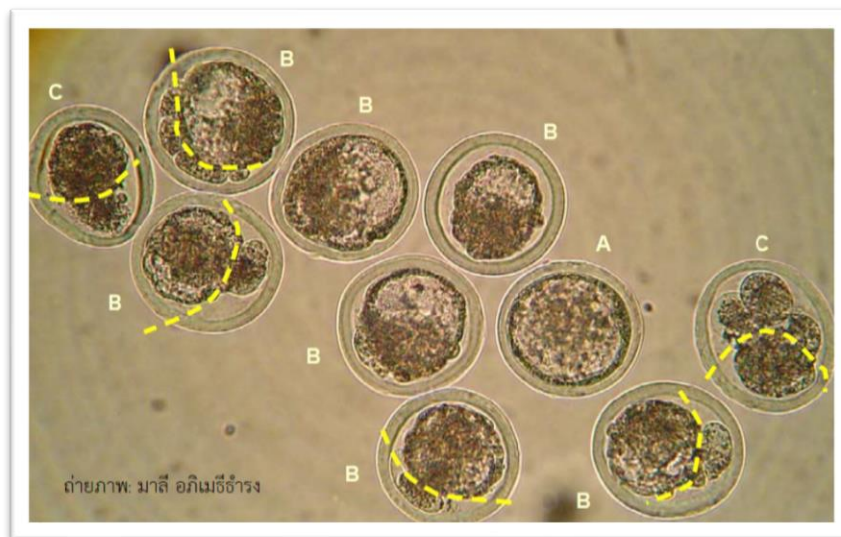
ระยะ 2 คือ เอ็มบริโอระยะ 2 - 12 เซลล์ (2 - 12 cells)

ระยะ 3 คือ เอ็มบริโอระยะมากกว่า 16 เซลล์ (early morula)

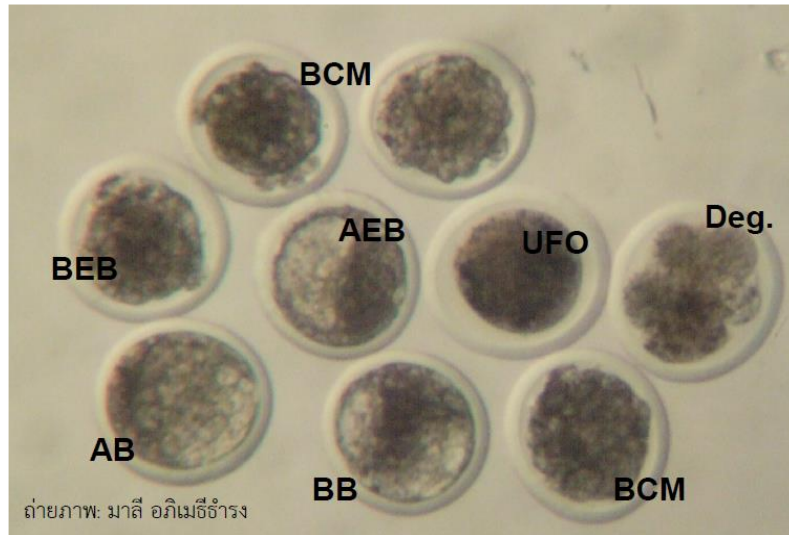
ระยะ 4 คือ เอ็มบริโอระยะ Morula ถึง ระยะ Compaction Morula

ระยะ 5 คือ เอ็มบริโอระยะ Early Blastocyst

- ระยะ 6 คือ เอ็มบริโอระยะ Blastocyst
 ระยะ 7 คือ เอ็มบริโอระยะ Expanded Blastocyst
 ระยะ 8 คือ เอ็มบริโอระยะ Hatched Blastocyst
 ระยะ 9 คือ เอ็มบริโอระยะ Expanded Hatched Blastocyst
- 4) ณ วันที่เอ็มบริโอถูกชะล้างออกจากปีกมดลูก คือวันที่ 7 หลังผสมครั้งแรก ควรจะพบเอ็มบริโอตั้งแต่ระยะมอรูลา (morula), Compaction Morula ระยะ Early Blastocyst, Blastocyst, Expanded Blastocyst, Hatched Blastocyst จึงถือว่าเป็นเอ็มบริโอที่มีพัฒนาการแบบปกติ ถ้าเอ็มบริโอมีเซลล์น้อยกว่า 16 เซลล์ ถือเป็นเอ็มบริโอที่ตายแล้ว (degenerated embryo) ไข่ที่ไม่ได้รับการผสม (unfertilized ova/ovum) ก็ถือว่าตายแล้วและถูกชะล้างมาพร้อมกับเอ็มบริโอ
- 5) การให้คะแนนคุณภาพเอ็มบริโอ ใช้ระบบเกรด (grading) 1, 2, 3, 4 ตามระบบของ IETS ดังนี้ คือ
- เกรด 1 (excellent/good) เอ็มบริโอคุณภาพดีมาก มีพัฒนาการปกติ ทรง หรือเกาะกันแน่น ไม่มีเซลล์แตก สีของเซลล์เอ็มบริโอสม่ำเสมอกลมกลืนกัน
 - เกรด 2 (fair) เอ็มบริโอคุณภาพดี มีพัฒนาการปกติ ทรงกลมหรือบิดเบี้ยวเล็กน้อยแต่เกาะกันแน่น มีเซลล์แยกออกจากกลุ่ม 10 - 20% สีของเซลล์เอ็มบริโอ กลมกลืน
 - เกรด 3 (poor) เอ็มบริโอคุณภาพพอใช้ มีพัฒนาการปกติ อาจไม่เป็นทรงกลมแต่เกาะกันแน่น มีเซลล์แยกออกจากกลุ่ม 30 - 40% สีของเซลล์เอ็มบริโอส่วนที่เกาะกลุ่มสม่ำเสมอ
 - เกรด 4 (dead/degenerated) เอ็มบริโอคุณภาพไม่ดี มีเซลล์เสื่อมสลายมาก มีเซลล์เกาะกันแน่นน้อยกว่า 40% มีการพัฒนาการช้า หยุดเจริญ หรือโอโอไซต์ที่ไม่ได้รับการผสม (UFO)
 - เอ็มบริโอ เกรด 1, 2, 3 เป็นเอ็มบริโอที่มีคุณภาพสามารถนำไปย้ายฝากได้ (transferable embryo, รูปที่ 21) แบบฝากเอ็มบริโอสด (fresh embryo) ในวันเดียวกับที่เก็บเอ็มบริโอ และเอ็มบริโอสด เกรด 1 และ 2 เท่านั้นที่นำไปแช่แข็ง



รูปที่ 27 เอ็มบริโอที่มีคุณภาพสามารถนำไปย้ายฝากได้ เกรด 1, 2, 3 เส้นประแสดงส่วนของเซลล์ที่ใช้คัดเกรดเอ็มบริโอ (inverted micro scope, 100x)



รูปที่ 28 การให้เกรดคุณภาพและระยะต่าง ๆ ของเอ็มบริโอ AB : A blastocyst, AEB : A early blastocyst, BB : B blastocyst, BEB : B early blastocyst, BCM : B compact morula, UFO : unfertilized ovum, Deg : degenerated embryo (stereomicroscope, 80x)

8.2 การเก็บรักษาเอ็มบริโอโดยวิธีการแช่แข็ง (embryo cryopreservation)

8.2.1 การเตรียมเอ็มบริโอก่อนการแช่แข็ง

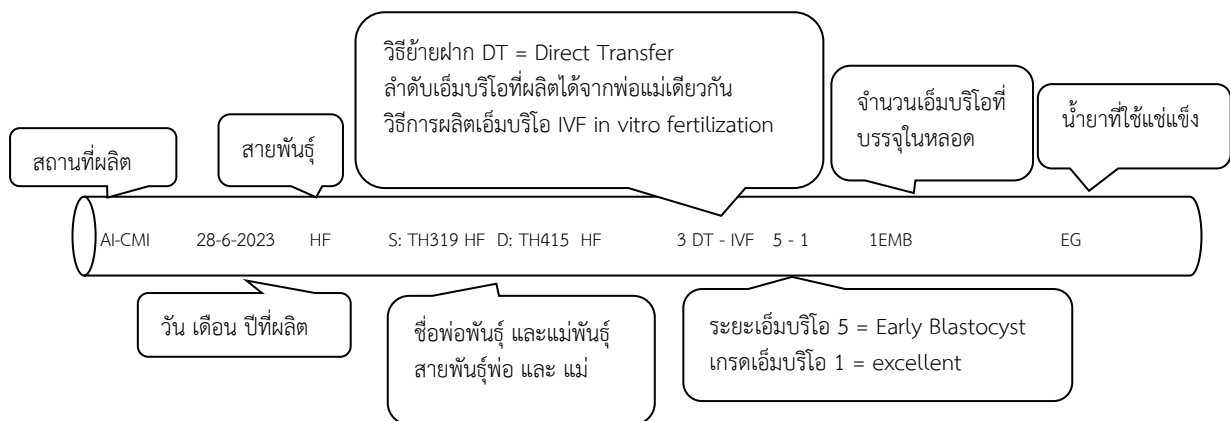
- 1) คัดเลือกเอ็มบริโอสด (เอ็มบริโอที่เก็บจากแม่โค ณ วันที่ดำเนินงาน) เกรด 1 และ 2 ที่จะแช่แข็ง นำไปไว้ที่งานทดลองปลอดเชื้อที่มีน้ำยาเลี้ยงเอ็มบริโอชั่วคราว
- 2) เอ็มบริโอที่บรรจุในหลอด หรือ ภาชนะเดียวกันจะต้องเป็นเอ็มบริโอที่ผลิตจากพ่อแม่ เดียวกันเท่านั้น
- 3) ในกรณีที่จะมีการนำเอ็มบริโอไปย้ายฝากภายนอกฟาร์มที่เก็บเอ็มบริโอ ทั้งที่ฝากเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็ง ต้องดำเนินการล้างเอ็มบริโอด้วยเอนไซม์ (trypsinization) เสียก่อน ตามที่ IETS กำหนดไว้ เอนไซม์ trypsin จะช่วยกำจัดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสหลายชนิดที่เกาะติดกับเปลือกเอ็มบริโอ (zona pellucida) เป็นการป้องกันการแพร่เชื้อโรค (ถ้ามี) ผ่านทางเอ็มบริโอ แต่หากเอ็มบริโอนั้นไม่มีเปลือกหรือเปลือกมีรอยแตก จะไม่สามารถล้างด้วยเอนไซม์ได้
- 4) การล้างเอ็มบริโอด้วยเอนไซม์ น้ำยาที่ใช้ ได้แก่ 0.25% trypsin, น้ำยา PBS ที่ไม่มีส่วนผสมของ Ca^{2+} , Mg^{2+} , น้ำยา 0.4% BSA (bovine serum albumin) ใน PBS (ไม่มี Ca^{2+} , Mg^{2+}) + antibiotics, holding medium, น้ำยา 2% calf serum ใน PBS (มี Ca^{2+} , Mg^{2+}) + antibiotics ให้ล้างเอ็มบริโอที่อุณหภูมิห้อง

8.2.2 ขั้นตอนการล้างเอ็มบริโอด้วยเอนไซม์ Trypsin

- 1) ล้างเอ็มบริโอในน้ำยา PBS ที่ไม่มีส่วนผสมของ Ca^{2+} , Mg^{2+} 5 ครั้ง โดยนำเอ็มบริโอไปผ่านน้ำยาซึ่งทำหยดเล็กๆ (micro drops) ขนาดหยดละ 80 ไมโครลิตรในงานทดลองพลาสติกปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปล้างใน 0.25% trypsin 2 ครั้ง โดยทำ micro drops ขนาดหยดละ 80 ไมโครลิตร รวมเวลาที่เอ็มบริโออยู่ในเอนไซม์ 60 - 90 วินาที
- 2) หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ trypsin โดยล้างเอ็มบริโอในน้ำยา 0.4% BSA ใน PBS จำนวน 5 ครั้ง ทำ micro drops ขนาดหยดละ 80 ไมโครลิตร เหมือนข้อ 1.
- 3) ล้างเอ็มบริโออีกครั้ง ใน holding medium ใหม่ จากนั้นเก็บเอ็มบริโอในน้ำยา holding medium ที่ 37°C นาน 30 นาที จึงนำเอ็มบริโอไปย้ายฝากหรือแช่แข็ง
- 4) สามารถล้างเอ็มบริโอได้คราวละ 3 - 5 เอ็มบริโอ เปลี่ยนน้ำยาและเอนไซม์ทุกครั้งที่ล้างรอบใหม่
- 5) บันทึกข้อมูลประจำเอ็มบริโอที่จะแช่แข็งในแต่ละหลอด ดังนี้

1) หลอดหรือภาชนะบรรจุเอ็มบริโอต้องระบุ ข้อความดังนี้

- ชื่อศูนย์ผลิตเอ็มบริโอ (practitioner code) หรือ สถานที่ดำเนินการเก็บเอ็มบริโอ
- ชนิด พันธุ์ ชื่อหรือหมายเลขพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์
- วัน เดือน ปี ที่ผลิต
- เกรด และระยะ เอ็มบริโอ
- จำนวนเอ็มบริโอที่บรรจุในหลอด
- ลำดับเอ็มบริโอที่ผลิตจากพ่อแม่เดียวกัน
- วิธีการผลิตเอ็มบริโอ
- วิธีการแช่แข็ง และชนิดน้ำยาที่ใช้ในการแช่แข็ง
- วิธีการนำไปใช้ในการย้ายฝาก ตามหลักของ IETS



รูปที่ 29 การพิมพ์ข้อมูลประจำเอ็มบริโอบนฉลากที่ติดกับหลอดแช่แข็งเอ็มบริโอ

เอ็มบริโอที่บรรจุในหลอด หรือ ภาชนะเดียวกันจะต้องเป็นเอ็มบริโอที่ผลิตจากพ่อแม่ เดียวกันเท่านั้น การพิมพ์ฉลากติดใช้อักษรภาษาอังกฤษทั้งหมด (รูปที่ 28) โดยพิมพ์บนฉลากที่จะติดกับแท่งพลาสติกที่อุดปลายหลอด mini-straw ขนาด 0.25 ml. เมื่อทำฉลากครบทุกเอ็มบริโอแล้ว นำไปติดกับแท่งพลาสติกทันที

8.2.3 ขั้นตอนการแช่แข็งเอ็มบริโอโค

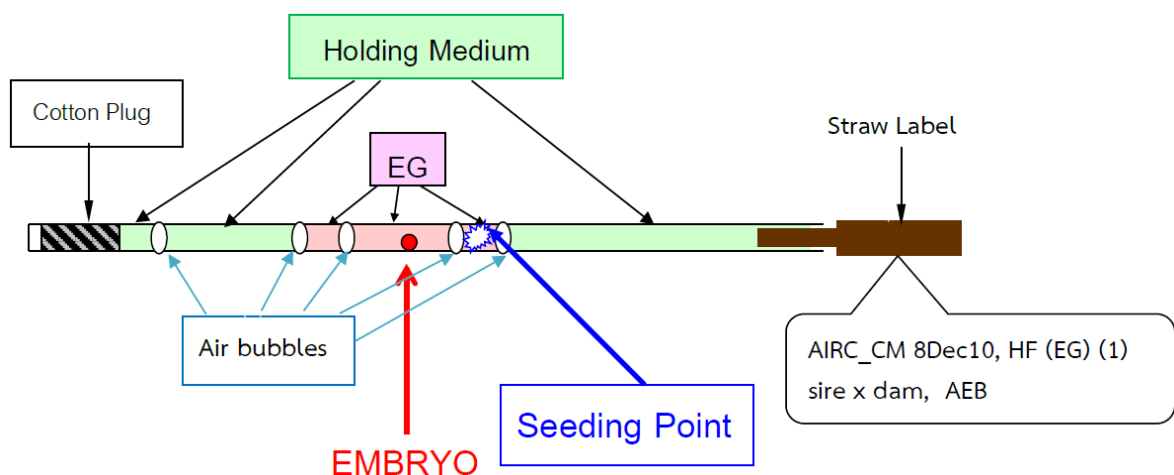
การแช่แข็งใช้วิธี แช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ เรียกว่า conventional method ใช้เครื่องแช่แข็งแบบมีโปรแกรมแช่แข็งอัตโนมัติตั้งไว้ล่วงหน้า โปรแกรมการแช่แข็งสำหรับเอ็มบริโอโค มีดังนี้ เริ่มที่ - 6°C นาน 8-10 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงด้วยอัตรา -0.5°C ต่อนาทีจนกระทั่งถึงอุณหภูมิ -35.0°C เวลาที่ใช้แช่แข็งประมาณ 70 นาที ใช้น้ำยาแช่แข็ง ที่มีสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง เอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol: EG) 1.5 M ชนิดสำเร็จรูป ขั้นตอนการแช่แข็งเอ็มบริโอดังนี้

- 1) เตรียมเครื่องแช่แข็ง กรณีใช้เครื่อง Cryologic® รุ่น CL-863 (รูปที่ 20) ให้เลือกที่ program 0 กำหนดเครื่องไปที่ normal และ hold นำไนโตรเจนเหลวใส่ในลงใน ถังแช่แข็ง (cryobath) ที่ระดับเกินครึ่งถึงเล็กน้อยจากนั้นนำส่วนที่เป็นช่องบรรจุหลอดเอ็มบริโอ (cryochamber) ลงในถัง กด reset ที่ส่วนควบคุมโปรแกรม เมื่อเครื่องแสดงอุณหภูมิเริ่มต้นของโปรแกรมที่เลือก คือ -6 °C จึงนำหลอดเอ็มบริโอลงในเครื่อง



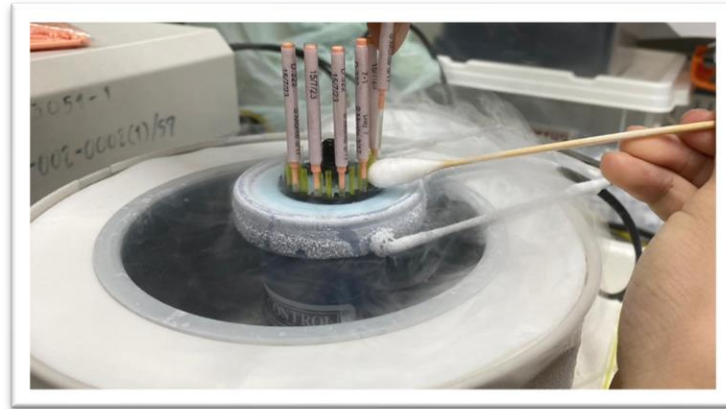
รูปที่ 30 ชุดอุปกรณ์แช่แข็งเอ็มบริโอแบบอัตโนมัติ

- 2) นำเอ็มบริโอที่คัดเลือกแล้วไปแช่ในน้ำยาแช่แข็งเอ็มบริโอนาน 5 นาทีและไม่เกิน 10 นาที โดยเตรียมน้ำยาแช่แข็ง EG ใส่ในจานทดลองปลอดเชื้อขนาด 3.5 cm. 2 ชุด บรรจุเอ็มบริโอในหลอด mini-straw ชนิดใสไม่มีสี ขนาด 0.25 ml ปลอดเชื้อสำหรับแช่แข็งเอ็มบริโอ รวมระยะเวลาที่เอ็มบริโอสัมผัสกับน้ำยาแช่แข็งที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 10 นาที
- 3) การบรรจุเอ็มบริโอ ใช้ไซริงจ์ขนาด 1 ml. ต่อกับ mini-straw ที่ปลายด้าน cotton จุ่มปลายด้านเปิดในน้ำยา holding medium ดูดน้ำยาเข้าในหลอดประมาณ 3 cm. ยกปลายหลอดขึ้นจากน้ำยา จากนั้นดูดอากาศเข้าหลอดประมาณ 0.5 cm. จุ่มปลายหลอดลงในน้ำยาแช่แข็งเอ็มบริโอ แล้วดูดน้ำยาเข้าหลอด 0.5 cm. ยกปลายหลอดขึ้นจากน้ำยาดูดอากาศเข้าหลอดประมาณ 0.5 cm. จุ่มปลายหลอดลงในน้ำยาแช่แข็งที่มีเอ็มบริโออยู่ ให้ดูดเอ็มบริโอ 1 เอ็มบริโอเข้าหลอดพร้อมน้ำยา 1-2 cm. โดยให้เอ็มบริโออยู่ช่วงกลางน้ำยาแช่แข็ง จากนั้นยกปลายหลอดขึ้นจากน้ำยา ดูดอากาศเข้าหลอด 0.5 cm. จุ่มปลายหลอดลงในน้ำยาแช่แข็งเอ็มบริโอ แล้วดูดน้ำยาเข้าหลอด 0.5 cm. ยกปลายหลอดขึ้นจากน้ำยาดูดอากาศเข้าหลอดประมาณ 0.5 cm. จุ่มปลายหลอดลงในน้ำยา holding medium ดูดน้ำยาเข้าในหลอดจนด้านปลายที่มีน้ำยาที่ดูดเข้าช่วงแรกไปถึงส่วนที่เป็น cotton plug จนไม่สามารถดูดน้ำยาเข้าหลอดได้อีก ปิดปลายหลอดด้านเปิดให้แน่นด้วยแท่งพลาสติกที่มาพร้อมชุดหลอดบรรจุเอ็มบริโอ ซึ่งได้ติดตามข้อมูลเอ็มบริโอนั้นๆไว้แล้ว การบรรจุเอ็มบริโอวิธีนี้สามารถนำไปฝากเอ็มบริโอแบบ direct transfer ได้



รูปที่ 31 การบรรจุเอ็มบริโอในหลอดแช่แข็ง

- 4) นำหลอดที่บรรจุเอ็มบริโอลงใน cryochamber ช่องละ 2 หลอด โดยปลายแท่งพลาสติกอยู่ด้านบน ทำการ seeding (การชักนำให้ของเหลวเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งพร้อมกันอย่างรวดเร็ว) หลังจากให้เอ็มบริโออยู่ในเครื่องนาน 3 - 5 นาที ก่อน seeding ยกหลอดบรรจุเอ็มบริโอขึ้นจาก cryochamber เล็กน้อย โดยให้เห็นเฉพาะบริเวณที่จะ seeding ใช้ปากคีบ (forceps) พันด้วยสำลี จุ่มไนโตรเจนเหลว นำไปแตะบริเวณน้ำยาแช่แข็งเอ็มบริโอ 0.5 cm. (รูปที่ 24) ซึ่งเป็นน้ำยาแช่แข็งที่อยู่เหนือเอ็มบริโอ หมุนหลอดเอ็มบริโอเล็กน้อย สังเกตดูว่าน้ำยาบริเวณที่ถูกแตะเป็นฝ้าขาวแสดงว่า seeding สมบูรณ์ จากนั้นหย่อนหลอดบรรจุเอ็มบริโอกลับลงใน cryochamber ตามเดิม



รูปที่ 32 การ seeding ในกระบวนการแช่แข็งเอ็มบริโอ

- 5) หลังจาก seeding ครบทุกหลอดแล้ว กด run ที่เครื่องควบคุม เติมนิโตรเจนเหลวระหว่างการแช่แข็ง หากระดับไนโตรเจนเหลวไม่ถึงหนึ่งในสี่ของถัง
- 6) เมื่อจบโปรแกรมแช่แข็ง (อุณหภูมิ -35.0°C) ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 70 นาที จุ่มหลอดแช่แข็งเอ็มบริโอลงในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิอยู่ที่ -196°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาเอ็มบริโอ ให้ไนโตรเจนเหลวท่วมหลอด



รูปที่ 33 การนำหลอดเอ็มบริโอแช่ในไนโตรเจนเหลว

8.2.4 การจัดเก็บเอ็มบริโอเข้าธนาคารเอ็มบริโอ

- 1) นำเอ็มบริโอเก็บในกระบอกเก็บเอ็มบริโอ (goblet) ที่อยู่ติดกับ cane ซึ่งจะเก็บแยกกันระหว่างเอ็มบริโอแต่ละแม่ โดยจะเขียนวันที่และเบอร์ของแม่โค- กระบือ ตัวให้ไว้ที่ปลายด้านบนของ cane เพื่อสะดวกในการมองเห็น เมื่อเก็บเอ็มบริโอในถึงเก็บ cane ที่ใช้มี 2 ขนาด คือ ขนาดเก็บได้ 5 และ 10 straw



รูปที่ 34 การเก็บเอ็มบริโอใส่ในกระบอกเก็บเอ็มบริโอ

- 2) นำ cane ไปเก็บใน canister ของถังเก็บเอ็มบริโอ และจัดทำบัญชีควบคุมเอ็มบริโอ (embryo inventory) ที่เก็บในถังแต่ละใบ
- 3) ได้เอ็มบริโอแช่แข็งโค – กระบือพันธุ์ดี ที่สามารถนำไปย้ายฝากกับโค – กระบือ ตัวรับที่ใดและเมื่อใดก็ได้ที่มีแม่โคตัวรับที่พร้อม

9.การคัดเลือกแม่ตัวรับและการย้ายฝากเอ็มบริโอ

9.1 การคัดเลือกแม่โค - กระบือตัวรับ

- 1) กรณีตัวรับเป็นโคนมแนะนำให้ใช้โคสาว ไม่เคยมีลูกมาก่อน
- 2) กรณีตัวรับเป็นโคเนื้อ สามารถใช้โคสาว หรือแม่โคก็ได้ โดยในแม่โคแนะนำให้เคยมีลูกไม่เกิน 1 ตัว
- 3) ไม่จำเป็นต้องเป็นสายพันธุ์เดียวกับตัวอ่อน โคที่เชื่องและจับบังคับง่ายจะเพิ่มอัตราความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อน
- 4) ตัวรับจะต้องมีสุขภาพสมบูรณ์ ไม่ป่วย ไม่เครียด คะแนนร่างกายอยู่ระหว่าง 3.0 - 3.5
- 5) ต้องปลอดจากโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ โรคแท้งติดต่อ (Brucellosis) โรควัณโรค (Tuberculosis) และโรคท่อน้ำเลี้ยงอักเสบ (Paratuberculosis)
- 6) สภาพมดลูกไม่อักเสบหรือมีหนอง คอมดลูกไม่เล็กหรือคดจนเกินไป รังไข่สมบูรณ์ข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้าง และมีวงรอบการเป็นสัดตามปกติไม่มีถุงน้ำที่รังไข่

9.2 การจัดโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัด

โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและย้ายฝากเอ็มบริโอใช้เวลา 20 วัน

วันที่ 0 ล้วงตรวจรังไข่ ถ้าพบ follicle ขนาดใหญ่ต้องเจาะทำลายทิ้ง แล้วใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดทางช่องคลอด

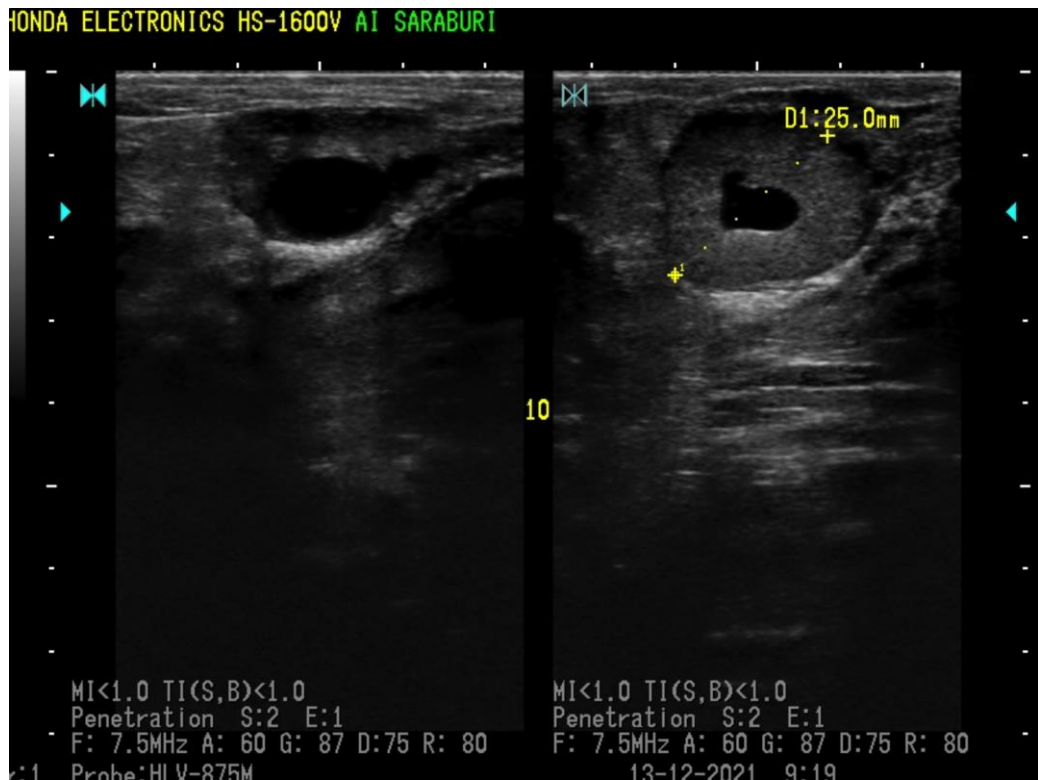
วันที่ 10 ฉีด PGF_{2α} 2.0 ml. ช่วงเช้า (09.00 น.)

วันที่ 11 ถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนออกช่วงเช้า (09.00 น.) โคจะเป็นสัด**วันที่ 13** ให้ตรวจเช็คอาการสัดและจดบันทึกการเป็นสัด

วันที่ 20 ล้วงตรวจรังไข่ เพื่อตรวจหา CL และฝากเอ็มบริโอในปีกมดลูกข้างที่พบ CL

9.3 การล้วงตรวจตัวรับก่อนการย้ายฝากเอ็มบริโอ

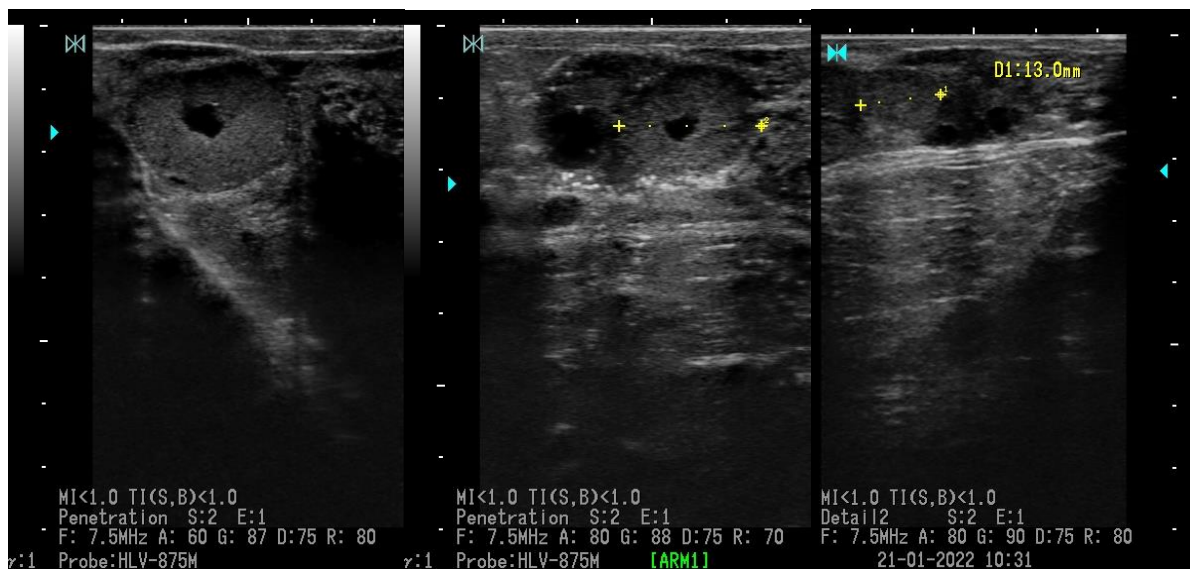
- 1) โค - กระบือที่จะนำมาย้ายฝากเอ็มบริโอได้นั้น ต้องแสดงอาการเป็นสัดมาแล้วอยู่ระหว่าง 7-8 วัน หากไม่ทราบวันที่แสดงอาการเป็นสัดแน่ชัด ไม่ควรนำมาย้ายฝากเอ็มบริโอ
- 2) โค - กระบือที่แสดงอาการเป็นสัดตามธรรมชาติก็สามารถนำมาย้ายฝากเอ็มบริโอได้เช่นกัน
- 3) ล้วงตรวจทางทวารหนักหรือใช้เครื่องอัลตราซาวด์ตรวจดูรังไข่ทั้ง 2 ข้างเพื่อดูคุณภาพของ CL ว่าเหมาะสมที่จะย้ายฝากเอ็มบริโอได้หรือไม่ และอยู่ด้านใด โดยปกติจะพบ CL 1 ใบ บนรังไข่ข้างใดข้างหนึ่งเท่านั้น
- 4) การประเมินคุณภาพของ CL ดูจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ CL และความสมบูรณ์ของรูปร่างของ CL เป็นเกณฑ์ในการให้คะแนน ปกติทั่วไปลักษณะของ CL จะมีหัว (crown) และมีเนื้อแน่นฝังอยู่ในเนื้อรังไข่



รูปที่ 35 ภาพอัลตราซาวด์รังไข่โคตัวรับหลังการเป็นสัด 7 วัน

5) การให้เกรดของ CL

- เกรด A = CL ขนาดใหญ่เกินครึ่งของเนื้อรังไข่
- เกรด B = CL ประมาณครึ่งหนึ่งของเนื้อรังไข่
- เกรด C = CL ขนาดน้อยกว่าครึ่งของเนื้อรังไข่



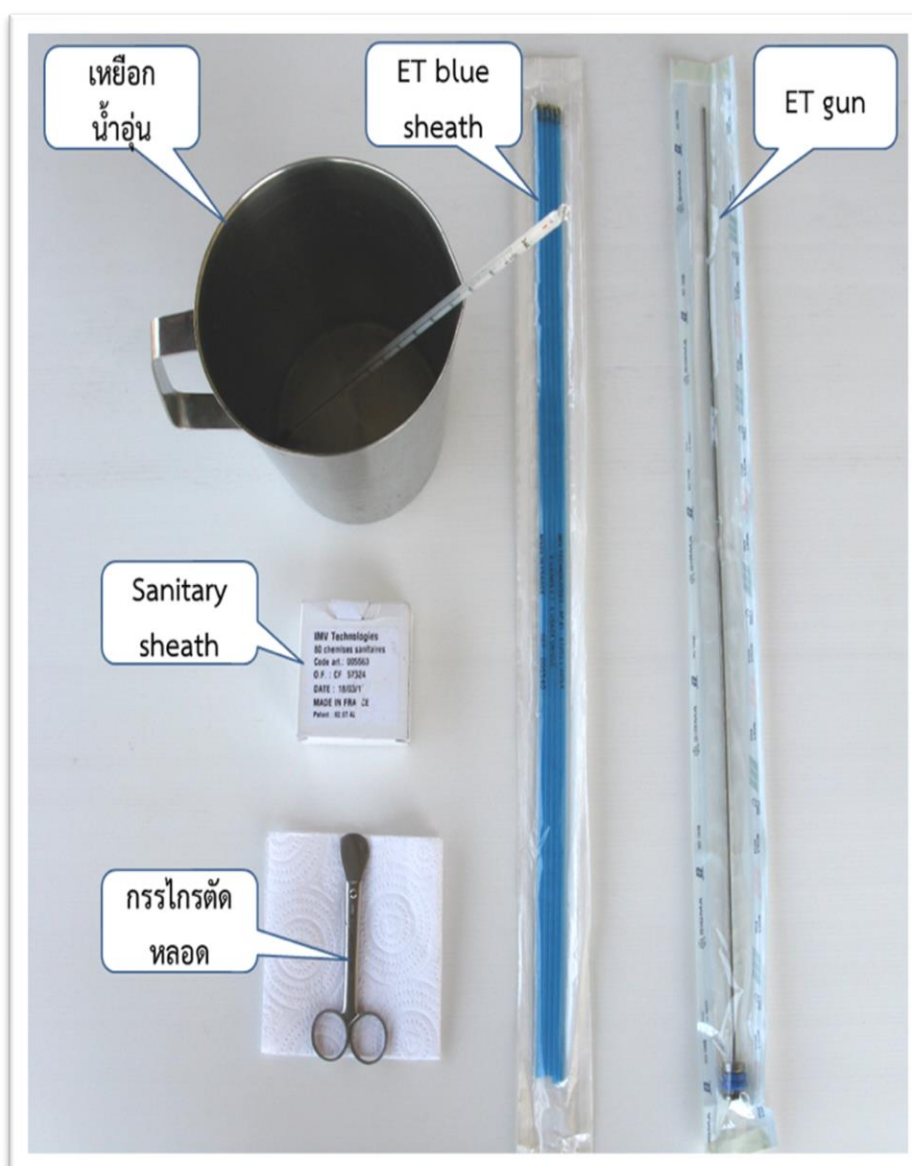
รูปที่ 36 ตัวอย่างภาพอัลตราซาวด์ในการให้เกรดรังไข่เกรด A, B, C (จากซ้ายไปขวา)

- ใช้สปีชีส์เครื่องหมายเพื่อบอกถึงเกรดของ CL โดยเขียนเป็นเกรดของ CL (A, B, C) ที่สะโพกแมมโม - กระป๋องตัวรับ ด้านที่พบ CL ที่รังไข่ เพื่อช่วยจำในการย้ายฝากเอ็มบริโอให้ถูกด้าน

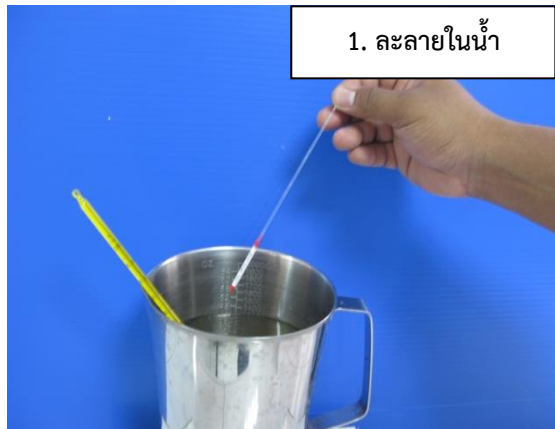
- 7) ให้ประเมินสภาพของมดลูกด้วยว่าเหมาะสมสำหรับการฝากเอ็มบริโอหรือไม่ ซึ่งมดลูกโค - กระบือที่เหมาะสมสำหรับการฝากเอ็มบริโอนั้นจะต้องอ่อนนุ่มไม่มีโทน ซึ่งจะทำให้สอดป็นฝากเอ็มบริโอได้ง่ายและสอดได้ลึกและไม่ทำให้ผนังมดลูกบาดเจ็บ

9.4 การเตรียมเอ็มบริโอเพื่อย้ายฝากให้กับแม่โค - กระบือตัวรับ

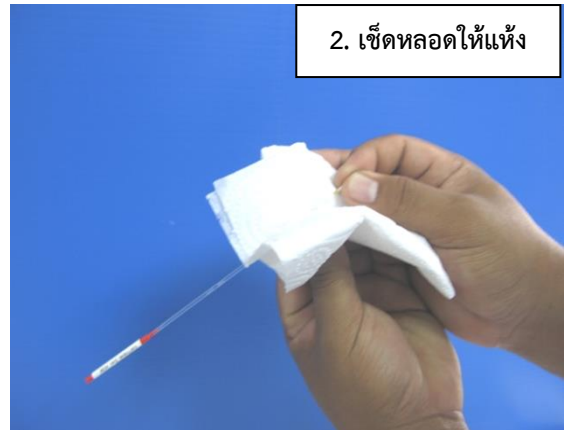
- 1) **ถ้าเป็นเอ็มบริโอสด** ดูดเอ็มบริโอใส่ mini-straw ในน้ำยาเลี้ยงเอ็มบริโอ แล้วนำไปใส่ใน ET gun, ET blue sheath และ sanitary sheath พร้อมฝาก
- 2) **ถ้าเป็นเอ็มบริโอแช่แข็ง** ต้องละลาย (Thaw) เอ็มบริโอก่อน เรียกว่าวิธี direct transfer โดยนำเอ็มบริโอออกมาจากถังเก็บ ใช้มือจับปลายหลอดเอ็มบริโอด้านที่เป็นสำลี นำออกมาอยู่ในอากาศ 10 วินาที แล้วจุ่มลงในน้ำ โดยอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ละลายยึดตามแหล่งผลิตเอ็มบริโอระบุ เช่น 25 - 30°C นาน 20 วินาที เป็นต้น เช็ดหลอดให้แห้งด้วยกระดาษเยื่อ ผสมน้ำยาในหลอดเอ็มบริโอให้เข้ากันโดยการเขย่าหรือเคาะเบาๆ สลับหัวสลับท้ายหลอดในแนวตั้งหลายๆรอบ เพื่อให้ฟองอากาศแตกเป็นขนาดเล็ก ซึ่งจะทำให้น้ำยาในหลอดเอ็มบริโอผสมเข้ากันได้ดี แล้วใช้กรรไกรตัดปลายหลอดที่เป็นแท่งพลาสติกอุดประมาณ 8 มม. นำมาใส่ใน ET gun, ET blue sheath และ sanitary sheath พร้อมฝาก



รูปที่ 37 อุปกรณ์สำหรับการย้ายฝากเอ็มบริโอ



1. ละลายในน้ำ



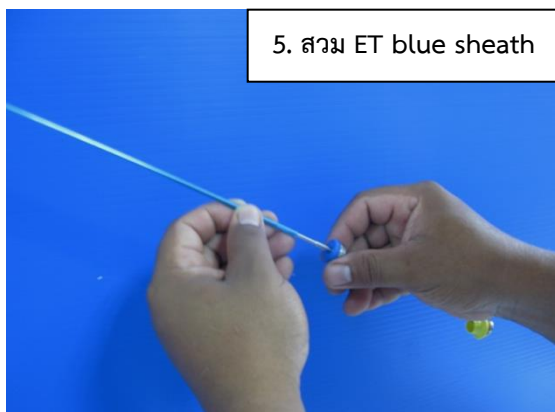
2. เช็ดหลอดให้แห้ง



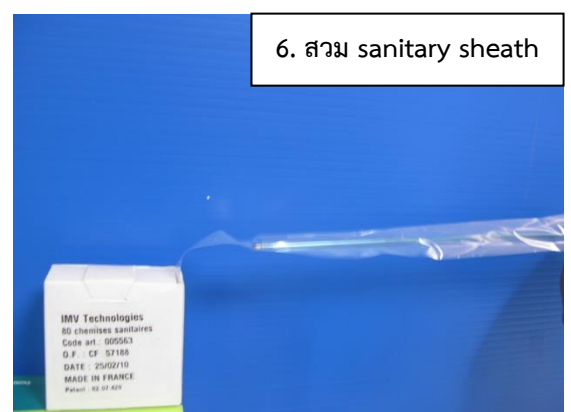
3. ตัดหลอดตัวอ่อน



4. นำหลอดใส่ ET gun



5. สวม ET blue sheath



6. สวม sanitary sheath



8. พร้อมที่จะนำไปย้ายฝาก

รูปที่ 38 การเตรียมเอ็มบริโอสำหรับย้ายฝากเอ็มบริโอในโค - กระป๋องตัวรับด้วยวิธี direct transfer

9.5 การย้ายฝากเอ็มบริโอในโค - กระบือตัวรับ

- 1) ฉีดยาชา (lidocaine HCl) ปริมาณ 2-3 ml. เข้าที่โพรงไขสันหลังส่วนหางเพื่อทำ local epidural nerve block โดยใช้เข็มเบอร์ 21 ยาว 1.5 นิ้ว จากนั้นผูกหางให้เรียบร้อย



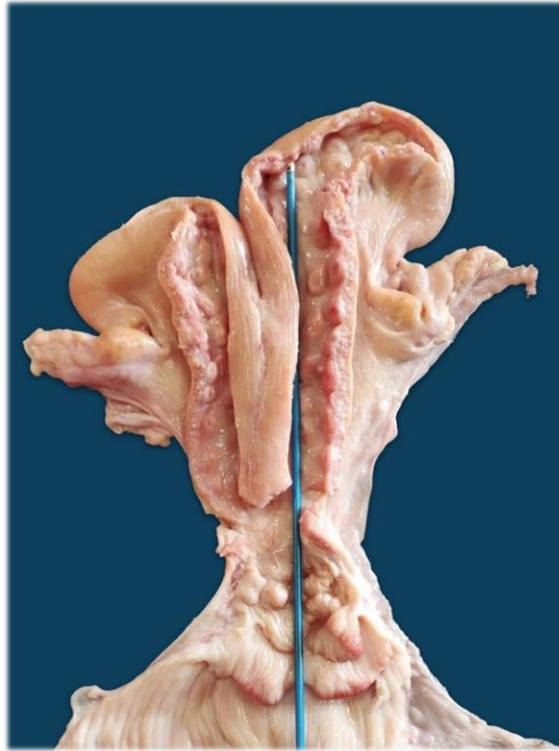
รูปที่ 39 การวางยาชาที่โคนหาง (local epidural nerve block)

- 2) ทำความสะอาดบริเวณก้นและอวัยวะเพศโค - กระบือตัวรับ
- 3) สอด ET gun ที่เตรียมพร้อมไว้แล้วเข้าไปในปากช่องคลอด เมื่อถึงหน้าคอมดลูก (cervix) ให้ดึง sanitary ให้ขาด แล้วดัน ET gun เข้าในคอมดลูก ค่อย ๆ สอดให้ผ่านเข้าในมดลูก



รูปที่ 40 การย้ายฝากเอ็มบริโอในโค - กระบือตัวรับ

- 4) เมื่อเข้าถึงมดลูกแล้วให้เบี่ยงปลาย ET gun ไปในปีกมดลูกข้างที่พบ CL ที่รังไข่ ค่อย ๆ ดันและสาวดิ่งปีกมดลูก สวมเข้ามาที่ ET gun พยายามให้เข้าไปได้มากที่สุด อย่างต่ำต้องเกินครึ่งหนึ่งของปีกมดลูก เมื่อได้ตำแหน่งที่ดีแล้ว ให้ดันก้านปล่อยเอ็มบริโออย่างรวดเร็ว เพื่อให้เอ็มบริโอหลุดเข้าไปในมดลูก แล้วจึงนำ ET gun ออก



รูปที่ 41 ตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับปล่อยเอ็มบริโอในมดลูกโค - กระบือ

- 5) จัดบันทึกการฝากเอ็มบริโอในแบบฟอร์ม การย้ายฝาก (ภาคผนวก 7)

10.การจัดการหลังการย้ายฝาก

10.1 การจัดการแม่โค - กระบือ ตัวให้ หลังการทำ MOET

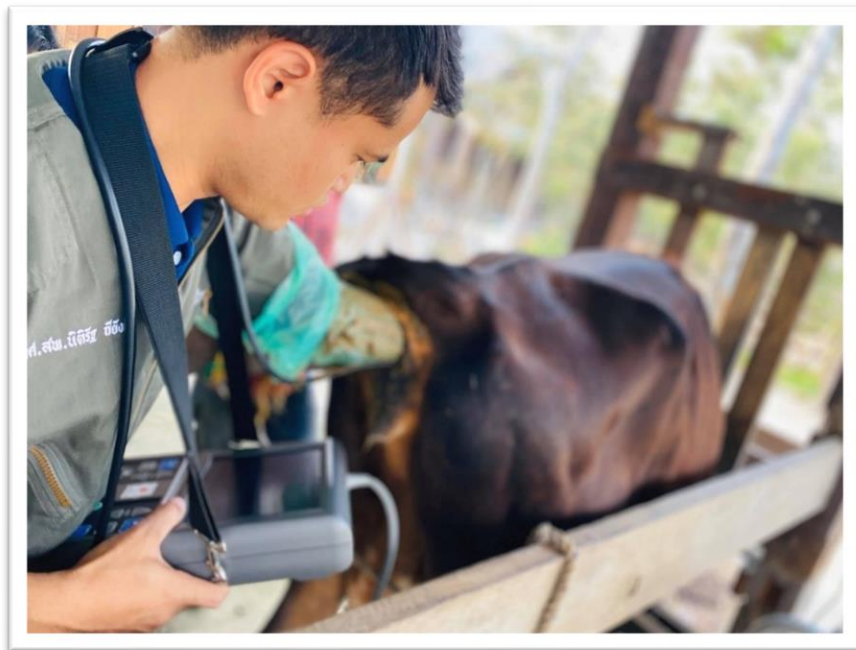
- 1) หลังจากเก็บเอ็มบริโอจากแม่โค- กระบือ ตัวให้แล้ว จะต้องฉีด PGF_{2α} 2.0 ml. เพื่อทำลาย CL ที่มีอยู่ทั้งหมด เพื่อป้องกันไม่ให้แม่โคตั้งท้อง เนื่องจากไม่ทราบแน่ชัดว่ายังมีเอ็มบริโอหลงเหลืออยู่ในมดลูกแม่โคอีกเท่าใด ซึ่งแม่โคจะกลับมาแสดงอาการเป็นสัดอีกภายใน 1 สัปดาห์
- 2) เมื่อแม่โค- กระบือ ตัวให้กลับสัดอีกรอบ สามารถจัดการผสมเทียมได้ตามปกติ หรือถ้าโคไม่แสดงอาการเป็นสัดให้เจ้าหน้าที่เข้าไปหาสาเหตุและจัดการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมให้แม่โคติดตั้งท้องตามปกติ
- 3) ในกรณีที่ต้องการเก็บเอ็มบริโอใหม่อีกครั้ง สามารถทำได้อีกเมื่อแม่โคมีความพร้อม โดยทั่วไปจะเก็บซ้ำได้ทุกๆ 3 เดือน

10.2 การจัดการแม่โค - กระบือ ตัวให้ หลังการทำ OPU

- 1) หลังจากเก็บโอโอไซต์จากแม่โค- กระบือ ตัวให้แล้ว ให้ยาลดปวด หรือยาปฏิชีวนะ ตามดุลพินิจของนายสัตวแพทย์ผู้ปฏิบัติงาน
- 2) เมื่อแม่โค - กระบือ ตัวให้กลับสัดอีกรอบ สามารถจัดการผสมเทียมได้ตามปกติ หรือถ้าโคไม่แสดงอาการเป็นสัดให้เจ้าหน้าที่เข้าไปหาสาเหตุและจัดการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมให้แม่โคติดตั้งท้องตามปกติ
- 3) ในกรณีที่ต้องการเก็บโอโอไซต์ใหม่อีกครั้ง สามารถทำได้อีกเมื่อแม่โคมีความพร้อม โดยทั่วไปจะเก็บซ้ำได้ทุก ๆ 2 -3 สัปดาห์

10.3 การติดตามตรวจการตั้งท้อง

- 1) ตรวจการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากเอ็มบริโอแล้วประมาณ 30 วันขึ้นไป โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์หรือใช้การตรวจด้วยมือเปล่าทางทวารหนักเมื่อตั้งท้องได้ประมาณ 60 วันขึ้นไป
- 2) นอกจากนี้ สามารถตรวจดูเพศของลูกโค - กระบือได้ด้วย โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ตรวจที่อายุการตั้งท้อง 2 เดือน



รูปที่ 42 การตรวจท้องโค - กระบือโดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์



รูปที่ 43 ภาพแสดงการตรวจท้องโค - กระบือโดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์

10.4 การติดตามลูกเกิดและจัดทำทะเบียนประวัติ

- เมื่อครบกำหนดคลอดประมาณ 273 วันหลังการฝากตัวอ่อน(อายุท้อง 280 วัน) ติดตามการคลอดและลูกเกิด พร้อมจัดทำทะเบียนประวัติ

10.5 ลูกสัตว์พันธุ์ดี

- ได้ลูกสัตว์พันธุ์ดีตามพันธุ์กรรมของแม่โค – กระบือตัวให้และพ่อพันธุ์ที่ดี



รูปที่ 44 ลูกที่เกิดจากการย้ายฝากเอ็มบริโอ



รูปที่ 45 ลูกที่เกิดจากการย้ายฝากเอ็มบริโอ

บรรณานุกรม

- กิริติ ธิแจ้ อนนท์ เทื่องสันเทียะ ณรงค์ เลี้ยงเจริญ มาลี อภิเมธีอารัง และจूरียร์ตัน สำเร็จประสงค. ประสิทธิภาพของวิธีการ ฝากตัวอ่อนแบบ Direct transfer. 2553. สัตวแพทยสาร. 61 (1-3): 11-22.
- จूरียร์ตัน สำเร็จประสงค มาลี อภิเมธีอารัง ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท์ เทื่องสันเทียะ และกิริติ ธิแจ้. การผลิตตัวอ่อนโค - กระบือในระดับฟาร์ม. 2549. ใน: 50 ปี งานผสมเทียมในประเทศไทย: ผสมเทียม 50 ปี สูเทคโนโลยีชีวภาพพัฒนา ปศุสัตว์ไทย. 104-110.
- ชาญยุทธ กาพล อนนท์ เทื่องสันเทียะ ณรงค์ เลี้ยงเจริญ และมาลี อภิเมธีอารัง. 2552. ผลของขนาดฮอร์โมน เอฟ เอส เอส ต่อการเพิ่มการตกไข่และจำนวนตัวอ่อนในโคพื้นเมืองภาคใต้. ประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มข. ครั้งที่ 10 ประจำปี 2552. หัวข้อเรื่อง “วิกฤตเศรษฐกิจโลก : การปรับตัวของครัวไทยสู่ครัวโลก” ระหว่างวันที่ 3-4 มิถุนายน 2552 ณ ห้องประชุมใหญ่ อาคารพิชญ์ฯ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท์ เทื่องสันเทียะ มาลี อภิเมธีอารัง กิริติ ธิแจ้ และบันลือ กล้าพูล. 2553. ผลการใช้ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช 3 ระดับต่อการเพิ่มการตกไข่และคุณภาพของตัวอ่อนในโคไทยแบล็ค. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 7. วันที่ 7-8 ธันวาคม 2553. หน้า 278-285. (CD)
- ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท์ เทื่องสันเทียะ กิริติ ธิแจ้ บันลือ กล้าพูล พิระพงษ์ สำราญทรัพย์ สุรสิทธิ์ ดวงสอนยา จूरียร์ตัน สำเร็จประสงค และมาลี อภิเมธีอารัง. 2550. ผลของการลดขนาดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ต่อการตอบสนอง การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่และตัวอ่อนที่ได้ ในโคพันธุ์บราห์มัน : กรณีศึกษา. ประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มท ม. ครั้งที่ 1 ประจำปี 2550. วันที่ 18 – 19 ตุลาคม 2550. ณ. โรงแรมรามาคาร์ดิน.
- ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท์ เทื่องสันเทียะ วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกร และมาลี อภิเมธีอารัง. ผลของขนาดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ต่อการเพิ่มการตกไข่และจำนวนตัวอ่อนในโคขาวลำพูน. 2549. การประชุมสัมมนา Enhancement of Reproductive Efficiency and Production of Livestock in Thailand ในโอกาสครบรอบ 50 ปี งานผสม เทียมในประเทศไทย, วันที่ 14-16 ธันวาคม 2549 ณ โรงแรมเชียงใหม่ฮิลล์ จ.เชียงใหม่.
- ณรงค์กร เกษมสุข อนนท์ เทื่องสันเทียะ ณรงค์ เลี้ยงเจริญ บันลือ กล้าพูล และมาลี อภิเมธีอารัง. 2555. ผลของระดับ ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ต่อการเพิ่มการตกไข่ในโคพื้นเมืองสายอีสาน. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ 7 (1): 29-36.
- มาลี อภิเมธีอารัง. 2549. การตรวจหาและประเมินคุณภาพตัวอ่อน-การแช่แข็งและการละลายตัวอ่อน. เอกสารประกอบการ บรรยาย การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการหลักสูตร”เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนโค” จัดโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สวทช. และ คณะสัตว แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันที่ 12-18 ตุลาคม 2549 ณ น่านน้ำคันทรีโฮม และศูนย์วิจัยและพัฒนา เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน จ.นครราชสีมา. 10 หน้า.
- อนนท์ เทื่องสันเทียะ วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกร ณรงค์ เลี้ยงเจริญ กิริติ ธิแจ้ บุญชู ศรีสุข จूरียร์ตัน สำเร็จประสงค. 2547. การตอบสนองของโคขาวลำพูนต่อการกระตุ้นการตกไข่. หนังสือประมวลบทความคัดย่อ การประชุมวิชาการ ทางสัตวแพทย์ และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30 ประจำปี 2547
- Apimeteetumrong, M., K.. Thijae, A. Thuangsanthia, N. Liengcharoen, and J. Sumretprasong. Pregnancy rates following direct transfer of frozen- thawed bovine embryos: a preliminary report. The RGJ Seminar Series XLVII “Reproductive Biotechnology for Improving Animal Breeding Strategies”. 20th October, 2006. Nan Province, Thailand : 13-15.

- Leibo, S.P. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*. 21: 767-790.
- Lindner, G.M. and R.W. Wright. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20: 407-416.
- Saito, N. 1994. Manual of embryo transfer and *in vitro* fertilization in cattle. National Livestock Breeding Center, MAFF, September. pp. 132.
- Souza-Fabjan et al., 2014

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

ตัวอย่างโปรแกรมการเตรียมแม่โค ตัวให้

Donor ET -- COW

ทำ ET วันที่

9 กันยายน 2560

ครั้งที่

/ 2560

Farm	ศูนย์ บ้ายฟากด้วอ๋น	3	ตัว
------	---------------------	---	-----

[illegible]

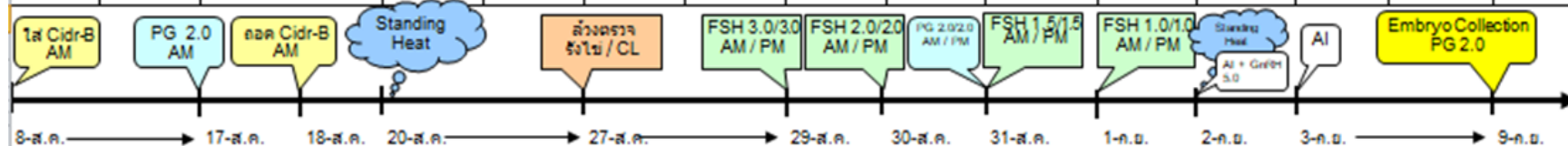
FSH = Folltropin-V 20 mg. / ml.

PG = Estrumate 250 ug / ml.

GnRH = Receptal 4.2 ug. / ml.

AM = 06.00 u.

PM = 18.00 u.

[illegible]

พิมพ์ 1 สิงหาคม 2560

ภาคผนวก 2

ตัวอย่างโปรแกรมการเตรียมแม่กระบือ ตัวให้

โปรแกรมการให้ฮอร์โมนแม่กระป๋องตัวให้

	กิจกรรม	
วันที่	เช้า	เย็น
0	สอด CIDR-B	
1	ฉีด estradiol 2.5 – 2.7 mg	
2		
3		
4		
5	FSH 3.0 mL	FSH 3.0 mL
6	FSH 2.5 mL	FSH 2.5 mL
7	FSH 2.0 mL	FSH 2.0 mL
8	FSH 1.5 mL ถอด CIDR+PG 2.0 mL	FSH 1.5 mL +PG 2.0 mL
9	FSH 1.0 mL	FSH 1.0 mL
10		AI 1 + GnRH 10 mL
11	AI 2	AI 3
12		
13		
14		
15		
17	Flush	

ภาคผนวก 3

แบบบันทึกการเก็บเอ็มบริโอจากแม่โค - กระบือ ตัวให้

Embryo Collection 56 (Donor)

Today	22 ตุลาคม 2555
-------	----------------

[illegible]

ภาคผนวก 4

แบบบันทึกการจัดเก็บเอ็มบริโอเข้าธนาคารเอ็มบริโอ

Embryo Inventory									
------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

[illegible]

ภาคผนวก 5

แบบบันทึกการบริการดูแลแม่โค - กระบือ ตัวให้หลังการเก็บเอ็มบริโอ

รายงานการติดตามสถานะภาพแม่โคตัวให้ (Donor)

[illegible]

ภาคผนวก 6

ตัวอย่างโปรแกรมการเตรียมแม่โค - กระบือ ตัวรับ

Recipient--COW														ฝากตัวอ่อน วันที่ 9 กันยายน 2560	
Farm	ศูนย์ฯ ย้ายฝากตัวอ่อน			12 ตัว		ครั้งที่ / 2560									
ชุด	เบอร์โค	ใส่ Cidr-B AM	Note	PG 2.0 cc. AM	ถอด Cidr-B AM	Standing Heat 02 ก.ย. 60	Note	เกรด CL	Horn L / R	เกรด/ระยะ Embryo	Donor	Semen	ผู้ฝาก	ตรวจห้อง	
1	1	20 ส.ค. 60		30 ส.ค. 60	31 ส.ค. 60										
	2	AM		2.0 cc.	AM										
	3			AM											
	4														
	5														
	6														
	7														
	8														
	9														
	10														
	11														
	12														

Timeline of events:

- 20-ส.ค. : ใส่ Cidr-B AM
- 30-ส.ค. : PG 2.0 AM
- 31-ส.ค. : ถอด Cidr-B
- 1-ก.ย. : Standing Heat
- 2-ก.ย. : (Blank)
- 9-ก.ย. : Embryo Transfer

พิมพ์ 2 สิงหาคม 2560

ภาคผนวก 7
แบบบันทึกการฝากเอ็มบริโอในแม่โค - กระป๋อง ตัวรับ

Today	22 ตุลาคม 2555
-------	----------------

คู่มือปฏิบัติการ กระบวนการผลิตและย้ายฟากเอ็มเบรีโอโค - กระบือ

แบบฟอร์มการย้ายฝากเอ็มบริโอ

A. CERTIFICATE OF EMBRYO RECOVERY

Page ____ of ____

Breed _____

Donor Name _____ No. _____ CC _____ Ear Tag or Tattoo _____

Owner _____ Address _____

Onset Estrus Date _____ AM
Yr. Mo. Day PM

Service Sire _____ No. _____ CC _____ Breeding Date _____ Yr. Mo. Day

ID Code _____ Freeze Date or Batch No. _____ Sexed Semen X or Y _____ Recovery Date _____ Yr. Mo. Day

Service Sire _____ No. _____ CC _____ Total Recovered _____

ID Code _____ Freeze Date or Batch No. _____ Sexed Semen X or Y _____ No. Cleaved/Degen. _____

No. Unfertilized _____

No. Transferred _____

No. Frozen _____

Signature _____ Firm _____

Practitioner or Leader of the Embryo Production Team recovering Embryos

ET Code _____

B. CERTIFICATE OF EMBRYO TRANSFER (see reverse side for coding instructions)

IF FROZEN

ACCOMMODATES DIRECT TRANSFER

Date of Embryo Transfer _____ Yr. Mo. Day Surgical _____ Non-surgical _____ Other _____

Freeze Date on straw _____

Practitioner I.D. _____

Straw No.'s _____

Days since Estrus of Donor _____

One Embryo was transferred to each of the following recipients unless it is noted that more than one was transferred.

RECIPIENT IDENTIFICATION

	Ear Tag, Registration or Tattoo No.	Breed Code	Days Since Estrus	Stage Code	Qual. Code	Embryo Manipulated N, D, F, M or U	Straw No.	Emb. Trans. Date	Comments*
1.									
2.									
3.									
4.									
5.									
6.									
7.									
8.									

Signature _____ Firm _____

Technician/Practitioner or Team Leader that transferred the Embryos

ET Code _____ Phone () _____

*Use comment column for any special notations and/or identify the location of the opposite half of a divided embryo. Pregnancy can be noted.

C. CERTIFICATE OF FREEZING (see reverse side for coding instructions)

Type of Container: Straw _____ Other _____ Each container labeled to show firm code, breed, reg. no. of donor, freeze date and straw no.

Cane No.	Straw No.	No. Embryos/ Straw	No. X Washed	Trypsin Treated	Code Stage	Code Quality	Zona Intact	Embryo Manipulated N, D, F, M or U	Comments

Time from recovery to onset of freezing _____ (hrs.) Cryoprotectant and concentration, equilibration, final molality and cooling procedure

How Frozen: Seed Temp. _____ Cooling Rate _____ Plunge Temp. _____ Other _____

Recommended method of thawing and dilution _____

Signature _____ Firm _____

Practitioner or Leader of the Embryo Production Team Freezing the Embryos

ET Code _____ Phone () _____

ภาคผนวก 8

ปริมาณ Follicular Stimulating Hormone ที่ใช้ฉีดกระตุ้นในโคแต่
ละสายพันธุ์

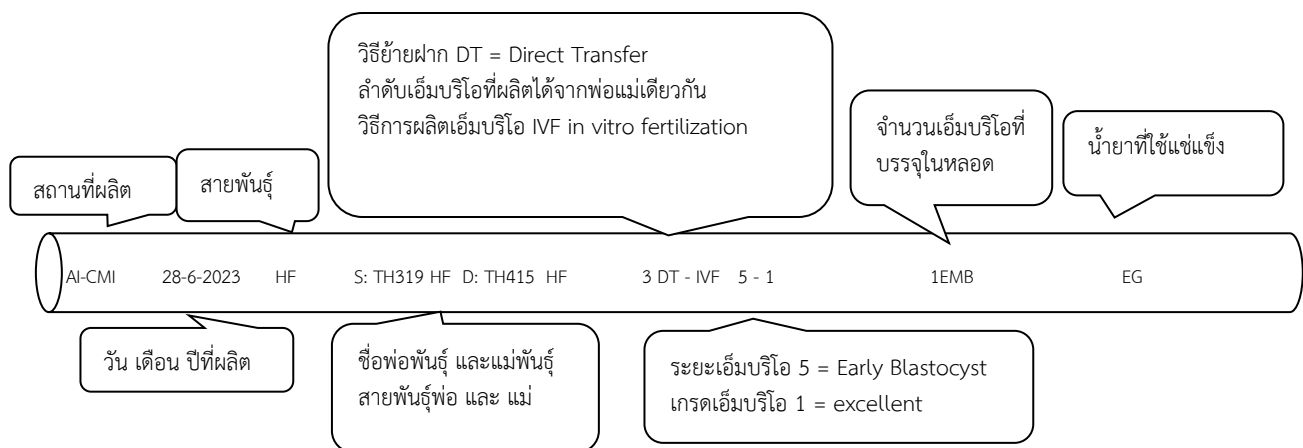
ตารางภาคผนวกที่ 1 ปริมาณ Follicular Stimulating Hormone ที่ใช้ฉีดกระตุ้นในโคแต่ละสายพันธุ์

ขนาดและปริมาณ FSH ต่อตัว	สายพันธุ์โค					
	โฮลสไตน์ ฟรีเซียน (Holstein Fresian)	ทรอปิคอล โฮลสไตน์ (Tropical Holstein)	อเมริกัน บราห์มัน (American Brahman)	ชาวลำพูน (Kao Lumpoon)	ไทย แบล็ค (Thai- Black)	พื้นเมือง ไทย (Thai Native)
ขนาด FSH (mg.)	360	300	250	200	200	160
ปริมาณ FSH รวม (ml.)	18.0	15.0	12.5	10.0	10.0	8.0
วันที่ 1 (06.00 น.) เข็มที่ 1 (ml.)	3.0	3.0	3.0	2.5	2.5	2.0
วันที่ 1 (18.00 น.) เข็มที่ 2 (ml.)	3.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.0
วันที่ 2 (06.00 น.) เข็มที่ 3 (ml.)	2.5	2.5	2.5	1.5	1.5	1.25
วันที่ 2 (18.00 น.) เข็มที่ 4 (ml.)	2.5	2.0	2.0	1.5	1.5	1.25
วันที่ 3 (06.00 น.) เข็มที่ 5 (ml.)	2.0	1.5	1.5	1.0	1.0	0.75
วันที่ 3 (18.00 น.) เข็มที่ 6 (ml.)	2.0	1.5	1.0	1.0	1.0	0.75
วันที่ 4 (06.00 น.) เข็มที่ 7 (ml.)	1.5	1.0	1.0	-	-	-
วันที่ 4 (18.00 น.) เข็มที่ 8 (ml.)	1.5	1.0	-	-	-	-

*คำนวณจาก FSH ที่บรรจุขวดละ 400 mg. (20 ml.)

ภาคผนวก 9

การพิมพ์สลากแสดงข้อมูลของเอ็มบริโอ



ตัวอย่าง การพิมพ์ผลลากติดหลอดบรรจุเอ็มบริโอ

อักษรย่อต่างๆ

1. ชื่อสถานที่ผลิต

ET-Center	= ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์
AI-sbr	= ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี
AI-cbr	= ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี
AI-nak	= ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพนครราชสีมา
AI-kkn	= ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น
AI-cmi	= ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพเชียงใหม่
AI-phs	= ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพพิษณุโลก
AI-rrri	= ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรี
AI-urt	= ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี
AI-sgk	= ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา
AI-ubt	= ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพอุบลราชธานี

2. ชื่อสายพันธุ์

HF	= โคพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน (Holstein Fresian)
TH	= โคพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ (Tropical Holstein)
THB	= โคพันธุ์ไทยแบล็ค (Thai-black)
BR	= โคพันธุ์อเมริกันบราห์มันเทา (American Brahman)
RR	= โคพันธุ์อเมริกันบราห์มันแดง (American Brahman)
AN	= โคพันธุ์แองกัส (Angus)
BM	= โคพันธุ์บีฟมาสเตอร์ (Beefmaster)
WA	= โคพันธุ์วากิว (Wagyu)

BN	= โคพันธุ์แบรงกัส (Brangus)
KLP	= โคพันธุ์ชาวลำพูน (Kao Lumpoon)
NA	= โคพันธุ์พื้นเมืองไทย (Thai Native)
SB	= กระบือปลัก (Swamp Buffalo)
XX	= ลูกผสม (Crossbreds)

3. วิธีการผลิตและย้ายฝากเอ็มบริโอ

DT	= Direct Transfer in vivo
DT-IVF	= Direct Transfer in vitro fertilization
DTX	= Direct Transfer Sexed Semen - Female
DTY	= Direct Transfer Sexed Semen – Male
DTX-IVF	= Direct Transfer Sexed Semen – Female - IVF
DTY-IVF	= Direct Transfer Sexed Semen – Male – IVF
DTF-IVF	= Direct Transfer Biopsy – Female - IVF
DTM-IVF	= Direct Transfer Biopsy – Male – IVF
DTB	= Direct Transfer Biopsy
DTY	= Direct Transfer Sexed Semen – Male
DT-VTT	= Direct Transfer Vitrified
DT-VTT-IVF	= Direct Transfer Vitrified – IVF
DT-NT	= Direct Transfer Cell Clone

4. ระยะเอ็มบริโอ

No.	Stage
1	Unfertilized
2	2- to 12 – cell
3	Early Morula
4	Morula or Compaction Morula
5	Early Blastocyst
6	Blastocyst
7	Expanded Blastocyst
8	Hatched Blastocyst
9	Expanded Hatched Blastocyst

5. คุณภาพเอ็มบริโอ

Code 1	Excellent or Good
Code 2	Fair
Code 3	Poor
Code 4	Dead or Degenerating

ภาคผนวก 10

เวชภัณฑ์และน้ำยาที่ใช้ในงานผลิตเอ็มบริโอ

ชื่อฮอร์โมน/วัสดุอุปกรณ์	ชื่อการค้า	ขนาดที่ใช้/ รุ่น	ผู้ผลิต
ฮอร์โมน FSH	Folltropin-V®	ตามภาคผนวก 8	Bioniche Animal Health Canada Inc. Belleville, Ontario, Canada
ฮอร์โมน GnRH	Receptal®	0.02 mg/ตัว	Intervet International GmbH, Unterschleißheim, Germany
ฮอร์โมน PGF _{2α}	Estrumate®	500 µg./ ตัว	Essex Animal Health Friesoythe Sedelsberger Strasse, Germany
ฮอร์โมน Progesterone ชนิดสอดช่องคลอด	Eazi-Breed CIDR®	1.9 g./ตัว	Pfizer New Zealand Limited, Mt Eden, Auckland, New Zealand
น้ำยาชะล้างเอ็มบริโอ	Vigro Complete Flush®	1000 ml./ตัว	Bioniche Animal Health USA, Inc. Pullman, WA, USA
น้ำยาเลี้ยงเอ็มบริโอ	Vigro Holding Plus®		Bioniche Animal Health USA, Inc. Pullman, WA, USA
น้ำยาแช่แข็งเอ็มบริโอ	Vigro Ethylene Glycol Freeze Plus®		Bioniche Animal Health USA, Inc. Pullman, WA, USA
สาย Foley		เบอร์ 16, 18 ยาว 22 นิ้ว	Bioniche Animal Health USA, Inc. Pullman, WA, USA
สายนำน้ำยาชะล้าง เอ็มบริโอ	Y-Tubing®,long		Agtech,Inc. USA
ถ้วยกรองเอ็มบริโอ	Miniflush®		Minitube of America, Inc. USA
เครื่องแช่แข็งเอ็มบริโอ	Freeze Control®	CL 863	Cryologic Pty. Ltd. Mount Waverley, Victoria, Australia

ภาคผนวก 11

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานผลิตเอ็มบริโอ

วัสดุ และอุปกรณ์ งานผลิตเอ็มบริโอ

ลำดับ	รายการ	โค-กระป๋อง	
		MOET	IVP
1	ชุดอุปกรณ์ดูดจ่ายของเหลว	/	/
2	เครื่องดูด-จ่ายสารละลาย (Pipette Aid)		/
3	เครื่องผลิตน้ำ deionized		/
4	ตู้ปลอดเชื้อแบบไบโอฮาซาด Class II		/
5	ตู้เพาะเลี้ยงตัวอ่อนในบรรยากาศด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์		/
6	ตู้บ่มเชื้อในบรรยากาศออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์		/
7	กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอกำลังขยายสูง	/	/
8	กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ	/	/
9	กล้องจุลทรรศน์ phase contrast		/
10	แท่นอุ่นสไลด์แบบติดกล้องสเตอริโอ	/	/
11	เครื่องแช่แข็งเอ็มบริโอ	/	/
12	เครื่องปั่นเหวี่ยง		/
13	อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ		/
14	เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง	/	/
15	ถัง 35 ลิตรปากกว้าง	/	/
16	ถังบรรจุไนโตรเจนเหลวขนาด 20 ลิตร	/	/
17	ตู้เย็นขนาด 13 คิว	/	/
18	ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส		/
19	โต๊ะ สำหรับห้องปฏิบัติการ		/
20	haemocytometer		/
21	เครื่องชั่งแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง		/
22	เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง		/
23	เครื่องล้างทำความสะอาดวัสดุด้วยคลื่นความถี่สูง ขนาดไม่น้อยกว่า 20 ลิตร		/
24	เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ขนาดไม่น้อยกว่า 79 ลิตร พร้อมอุปกรณ์		/

ลำดับ	รายการ	โค-กระป๋อง	
		MOET	IVP
25	ตู้อบความร้อน (Hot air Over) ขนาดความจุไม่น้อยกว่า 100 ลิตร		/
26	เครื่องฟอกอากาศสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการชนิดเคลื่อนย้ายได้		/
27	ตู้เก็บอุปกรณ์		/
28	เครื่องกวนผสมสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็กพร้อมให้ความร้อน		/
29	ชุดอุปกรณ์ตรวจและเจาะเก็บไข่สำหรับสัตว์		/
30	เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยแก๊ส	/	/
31	เครื่องขนส่งไอโอไซด์และเอ็มบริโอ		/

คณะผู้จัดทำ

1. นายกิตติกรณ เจนไพบูรณ์ ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
2. นายภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง ผู้เชี่ยวชาญด้านวิจัยการผสมเทียมและความสมบูรณ์พันธุ์
สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
3. นายอรุณ จันทร์กระจ่าง ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี
4. นายสินชัย วิโรจน์วุฒิกุล ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี
5. นายจักรภพ จันทร์สะอาด ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพนครราชสีมา
6. นายอนนท์ เทืองสันเทียะ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์
7. นายวรพงษ์ พงษ์ศิริ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
8. นางจรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
9. นางสาวพิงค์ลานนา กุญชร สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
10. นางสาวสุจิรา ธรรมวัง สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
11. นายชาคริต บุตรรักษ์ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรี
12. นายชินภัส มิ่งบุญ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี
13. นายอรรถพล พรประไพ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์
14. นายสุรวิทย์ จินสุข ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์
15. นางสาวกมลวรรณ มัดสิงห์ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์

