คู่มือควบคุมการเตรียมน้ำเชื้อเพื่อผสมเทียม

โดย น.สพ. อารยันต์ ยืนยาว บริษัทไลฟ์ อินโฟร์เมติคส์ จำกัด

1. **การรีดน้ำเชื้อ**

1.1 สิ่งสำคัญสูงสุดที่ต้องคำนึงถึงในการรีดเก็บน้ำเชื้อคือ ความสะอาด ดังนั้นอุปกรณ์ทุกชิ้นที่เกี่ยวข้องในการรีดเก็บน้ำเชื้อต้องสะอาด

1.2 ในการรีดน้ำเชื้อควรใส่ถุงมือ ถุงมือที่ใช้ต้องเป็นถุงมือที่สะอาด และไม่ควรใส่ถุงมือไว้รอ ต้องใส่ถุงมือเมื่อพร้อมที่จะรีดน้ำเชื้อเท่านั้น ควรใส่ถุงมือสองชั้นเมื่อจะรีดให้ถอดถุงมือที่สวมไว้ชั้นนอกทิ้งแล้วใช้ถุงมือชั้นในรีด ก่อนการรีดทุกครั้งต้องมีถุงมืออีกคู่ไว้สำรองกรณีที่ถุงมือที่รีดอยู่นั้นสกปรก (เปื้อนกับหนังหุ้มลึงค์ ปัสสาวะ สิ่งสกปรกอื่นๆ) อย่าใช้ถุงมือที่ทำจากยาง (ลาเท็กซ์) ให้ใช้ที่ทำจากไวนิล หลีกเลี่ยงการใช้ถุงมือที่มีแป้งทาไว้

น้ำเชื้อที่รีดเสร็จแล้วต้องเก็บไว้ในกระติกที่แห้ง สะอาด

รูปที่ 1 ภาพซ้ายการรีดเก็บน้ำเชื้อในสถานีพ่อพันธุ์และภาพขวาแบบที่ปฏิบัติกันทั่วไปในประเทศไทย

1.3 พ่อพันธุ์ต้องเตรียมให้พร้อมก่อนลงมือรีด ตัวพ่อพันธุ์ต้องแห้ง สะอาด น้ำในกระเปาะต้องถูกบีบออกจนไม่มีเหลือ และถูกบีบนวดผิวหนังบริเวณลึงค์ก่อนการรีด

สิ่งที่ต้องระวังในขณะรีดน้ำเชื้อก็คือการปนเปื้อนของสิ่งสกปรกและน้ำปัสสาวะจากกระเปาะเยี่ยวหรือที่เปื้อนตามหนังหุ้มลึงค์ ซึ่งทำได้โดยปล่อยให้น้ำเชื้อที่หลั่งออกมาครั้งแรกทิ้งไป 2-5 ซีซี เพราะส่วนนี้เป็นส่วนที่ทำความสะอาดท่อน้ำเชื้อ และขณะรีดเก็บน้ำเชื้อต้องยกปลายลึงค์ให้สูงขึ้นเพื่อกันสิ่งสกปรกที่จะไหลจากหนังหุ้มลึงค์

หากน้ำเชื้อมีการปนเปื้อนท้องเททิ้งก่อนที่จะนำไปส่งที่ห้องเตรียมน้ำเชื้อ

2. **การกรองน้ำเชื้อ**

2.1 น้ำเชื้อที่หลั่งออกมาต้องกรองด้วยผ้าก็อซหรือกระดาษกรอง และต้องแน่ใจว่าตัวกรอง หรือภาชนะอื่นๆ เช่น บีกเกอร์ กระป๋อง และกระติกเก็บน้ำเชื้อ หรือแม้แต่ขวดเก็บน้ำเชื้อที่ใส่น้ำเชื้อที่เจือจางแล้วควรมีอุณหภูมิประมาณ 35 องศาเซลเซียส (ผ้าก็อซควรซ้อนทับกัน 5 ชั้น)

พนักงานในห้องเตรียมน้ำเชื้อ ต้องเป็นคนติดฉลากเบอร์พ่อพันธุ์ที่ขวดเก็บน้ำเชื้อ อย่าให้พนักงานในเล้าพ่อพันธุ์ตามมาติดฉลากหรือทำสัญญลักษณ์ที่ขวดก็บน้ำเชื้อเพราะจะนำแบคทีเรียและไวรัสจากเล้าสู้ห้องเตรียมน้ำเชื้อได้

3. **การตรวจน้ำเชื้อ**

3.1 ต้องตรวจและเจือจางน้ำเชื้อให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเร็วได้ ***ต้องเจือจางน้ำเชื้ออย่างน้อย 1.5 เท่า*** และใช้เวลา***ไม่เกิน 30 นาที***นับจากการรีดเก็บน้ำเชื้อ

3.2 สิ่งที่ต้องตรวจสอบน้ำเชื้อเป็นประจำมีดังนี้

ก. ปริมาตร

วัดในหน่วย มิลลิลิตร (ซีซี) หรือ กรัม (น้ำหนัก)

ข. สี

ต้องใช้น้ำเชื้อที่สีปกติเท่านั้น

สีที่ผิดปติไป (มีสีแดง เหลือง น้ำตาล: เลือดปน หรือปัสสาวะปน) ท้องเททิ้งเท่านั้น และหากน้ำเชื้อมีสีไม่ปกติต้องให้สัตวแพทย์ทำการตรวจรักษา

ค. กลิ่น

น้ำเชื้อที่มีกลิ่นเหมือนปัสสาวะหรือมีกลิ่นแอมโมเนียต้องเททิ้ง

ช. การตรวจสอบการเคลื่อนที่และรูปร่างของอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์

กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ได้ดีคือชนิดเฟสคอนทราสท์ กำลังขยายขนาด 200-400 เท่า และมีแท่นทำความร้อนอยู่ด้วยเพื่ออุ่นน้ำเชื้อที่จะตรวจให้มีอุณหภูมิ 37-39 องศาเซลเซียส

ช. การตรวจความเข้มข้น

การตรวจตามหลักวิชาต้องตรวจวัดด้วยเครื่องวัดที่เรียกโฟโตมิเตอร์ ซึ่งวิธีการตรวจขึ้นกับชนิดของเครื่องนั้นๆ ความเข้มข้นและระดับการเจือจาง (มล. ของน้ำเชื้อที่รีด/โด๊ส) ขึ้นกับระดับที่ตั้งไว้ว่าใช้อสุจิจำนวนเท่าใดต่อโด๊ส และอ่านค่าตามตารางที่ตั้งไว้

3.3 คำแนะนำในการใช้เครื่องโฟโตมิเตอร์ (Photometer)

การตรวจสอบโฟโตมิเตอร์ (Photometer control)

ต้องมีการตรวจสอบการอ่านค่าของเครื่องโฟโตมิเตอร์เปรียบเทียบกับเครื่องรุ่นเดียวกันอย่างน้อยปีละสองครั้งเพื่อทดสอบความเที่ยงตรง

การเก็บตัวอย่าง (Collections of samples)

ก่อนที่จะดูดเก็บน้ำเชื้อสดมาตรวจ ควรทำให้น้ำเชื้อสดเคล้ากันเป็นเนื้อเดียวโดยการหมุน และกลับขวดจนกระทั่งทุกส่วนเป็นเนื้อเดียวกัน ห้ามทำการเขย่าขวดอย่างแรง การที่ต้องทำเช่นนี้เพราะหลังการตั้งทิ้งไว้ไม่นานน้ำเชื้อก็จะมีการตกตะกอนแยกส่วนที่เป็นอสุจิเข้มข้นและส่วนน้ำเลี้ยงอสุจิออกจากกัน

การใช้ไปเปตอัตโนมัติ (Automatic pipette)

เมื่อจะทำการดูดเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ ให้ส่วนปลายที่สวมจุกแหลม(tip)ของไปเปตจุ่มลงไปในน้ำเชื้อประมาณ 1 ซม. แล้วใช้นิ้วโป้งกดไปที่หัวของไปเปตลงไปจนรู้สึกได้ถึงแรงต้าน แล้วก็ปล่อยแรงให้ก้านไปเปตดันกลับขึ้นมาเองในตำแหน่งเดิม ตัวไปเปตก็จะดูดน้ำเชื้อขึ้นมา ระวังอย่าทำให้มีฟองอากาศอยู่ในน้ำเชื้อ พยายามรักษาความสะอาดอย่าให้น้ำเชื้อเปื้อนตัวไปเปต

ก็ต้องเลือกขนาดหัวจุก(tip)ให้ถูกต้อง เมื่อเสียบไปเปตเข้ากับหัวจุกเก็บน้ำเชื้อต้องแน่ใจว่าเข้ากันแน่นสนิท อย่าให้หลวม หากหลวมจะทำให้ดูดอากาศเข้าไปและทำให้ดูดน้ำเชื้อลำบาก หรือได้ไม่เต็มปริมาตร หรือหลวมจนหลุดออกจากกันได้

ตัวไปเปตต้องรักษาให้สะอาดเสมอ โดยการถอดแยกชิ้นส่วนและทำความสะอาดตามคำแนะนำของผู้ผลิต

ควรตรวจเช็คไปเปตอย่างน้อยเดือนละครั้ง ซึ่งทำได้โดยดูดน้ำสะอาดในปริมาณ 1.00 มล. (4 x 250 ไมโครลิตร) แล้วตวงในหลอดวัดปริมาตร ถ้าค่าความแตกต่าง +/- 25 ไมโครลิตร ถือว่ายอมรับได้ ถ้าแตกต่างไปจากนี้ต้องทำการซ่อมหรือปรับปรุงตัวไปเปตและตรวจสอบอีกครั้ง

เครื่องชั่ง

ต้องตรวจสอบเครื่องชั่งอย่างน้อยเดือนละครั้ง โดยเทน้ำในขวดรูปชมพู่ 50 มล. แล้วชั่งน้ำหนัก ซึ่งต้องชั่งได้ 50 กรัม ถ้าไม่ได้ต้องทำการตรวจสอบแก้ไข แล้วทดสอบอีกครั้งหนึ่ง

การตรวจสอบแท่นทำความร้อนที่กล้องจุลทรรศน์

ให้ตรวจสอบเดือนละครั้ง โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ชนิดดิจิตอลเป็นตัววัด ถ้าอุณหภูมิไม่อยู่ในช่วง 37-39 องศาเซลเซียส ต้องหาทางแก้ไข และตรวจสอบใหม่อีกครั้ง

รูปที่ 2 เครื่องชั่งน้ำเชื้อ

การทำละลายน้ำเชื้อเพื่อตรวจวัด

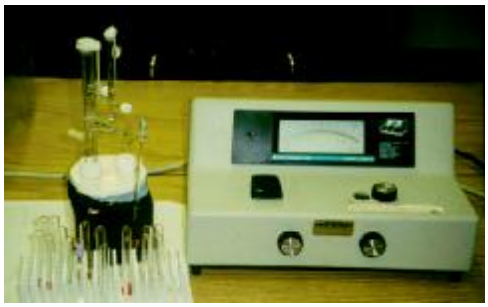
ใส่น้ำเชื้อในคิวเว็ท (cuvette) 0.25 มล. และดูดสารละลายเติมลงไป 9.75 มล. ซึ่งน้ำเชื้อและสารละลายจะผสมรวมกันเอง อย่าเขย่าคิวเว็ทเพราะจะทำให้เกิดฟองอากาศขึ้น

การวัดความเข้มข้นด้วยโฟโตมิเตอร์

เปิดโฟโตมิเตอร์เพื่ออุ่นเครื่องก่อนใช้งาน 15 นาที คิวเว็ทที่จะใช้ต้องไม่มีรอยขีดข่วนและให้จับเฉพาะด้านบนสุดเท่านั้น ระวังอย่าให้สารละลายเปื้อนผิวด้านนอกถ้าเปื้อนต้องเปลี่ยนหรือเช็ดให้สะอาด และต้องเปลี่ยนคิวเว็ททุกๆ 10 ตัวอย่าง การรีเซ็ทเครื่องโฟโตมิเตอร์ต้องใช้คิวเว็ทอันใหม่และใช้สารละลายที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ

ต้องอ่านค่าเมื่อตัวเลขนิ่งที่ค่าใดค่าหนึ่งเท่านั้น

ถ้าคิวเว็ทสกปรกต้องทำความสะอาดทันที หากผิวของมันเกิดฝ้ามัวซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากโปรตีนเกิดการตกตะกอน ให้ทำการล้างด้วย กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 10% (ควรใส่ถุงมือและแว่นตากันป้องกันการสัมผัสโดยตรง)



รูปที่ 3 โฟโตมิเตอร์รุ่นที่อ่านค่าออกมาเป็นค่าการดูดซึม หรือค่าการผ่านของแสงแล้วมาเปรียบหาความเข้มข้นของอสุจิจากตารางที่หาค่าไว้

3.4 โฟโตมิเตอร์ที่มีเครื่องแปลงไฟกระแสสลับเป็นกระแสตรงในตัวต้องต่อสายดินเพื่อป้องกันไฟฟ้ารั่ว

3.5 ผลการตรวจทุกอย่างต้องเก็บไว้ในแฟ้มเป็นเวลาอย่างน้อย 2 ปี

รูปที่ 4 โฟโตมิเตอร์รุ่นที่สามารถระบุความเข้มข้นของอสุจิต่อซีซีได้ (Spermacue ™)

4. **การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ**

4.1 **การตรวจเบื้องต้น**

4.1.1 **ปริมาตร**: ปริมาตรอาจมีตั้งแต่ 80-600 มล.

4.1.2 **สี ลักษณะ ความเข้มข้น**

A ใสเป็นน้ำ (clear watery):

ไม่มีหรือมีอสุจิเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากพ่อหนุ่มเกิน หรือเกิดจากความผิดปกติของอัณฑะ ทำให้ไม่สามารถพัฒนาตัวอสุจิได้ (โรค อัณฑะเสื่อม)

B ขุ่นใส (greyish-watery-semitransparent):

มีอสุจิน้อยมาก (น้อยกว่า 150,000 เซลล์/ลบ.มม. หรือ 150,000,000 เซลล์/มล) ต้องถือว่าพ่อพันธุ์ตัวที่ให้น้ำเชื้อไม่สมบูรณ์พันธุ์ น้ำเชื้อที่ได้ต้องเททิ้ง

C ขุ่น (greyish-white-watery):

ความเข้มข้นอสุจิต่ำ (ต่ำกว่า150-250,000 เซลล์/ลบ.มม. หรือ 150-250,000,000 เซลล์/มล.)

D ขาวน้ำนม (whitish-milky):

ความเข้มข้นอสุจิปกติ (250-500,000 เซลล์/ลบ.มม. หรือ 250-500,000,000 เซลล์/มล.)

E ขาวข้น-ขาวครีมเหลือง (whitish-yellowish white-creamy):

ความเข้มข้นอสุจิสูง หรือสูงมาก (500-800,000 เซลล์/ลบ.มม. หรือ 500-500,000 เซลล์/มล.) ความเข้มข้นระดับนี้จะพบได้ในพ่อพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ดีและรีดเอาเฉพาะน้ำเชื้อส่วนข้นเท่านั้น (spermrich fraction)

☺☺☺ ในการป้อนข้อมูลในโปรแกรม "พ่อหมู" เกษตรศาสตร์ มีการกำหนดให้บันทึกเพียงเป็น "**ใส**" และถ้าเกรด C หรือ D ให้บันทึกเป็น "**ขุ่น**" และหากเป็นเกรด E ให้บันทึกเป็น "**ขุ่นข้น**"

4.1.3 สีน้ำเชื้อที่ผิดปกติ

มักจะเจือปนเลือด หรือปัสสาวะ ถ้าปัสสาวะเจือปนน้ำเชื้อจะสีออกเหลืองและมีกลิ่นเหม็น มักเกิดจากการไม่ได้เตรียมตัวพ่อพันธุ์ให้ถูกต้องก่อนการรีด แล้วไม่พิถีพิถันและระมัดระวังเรื่องความสะอาดในขณะรีดเก็บน้ำเชื้อ แม้น้ำเชื้อจะมีการเคลื่อนที่ที่ดี (สมบูรณ์พันธุ์) แต่ไม่ให้ใช้ต้องเททิ้ง

4.1 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

ถ้าจะให้ได้ผลดีต้องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเฟส-คอนทราสท์ (phase-contrast microscope) ด้วยกำลังขยาย 200-400 เท่า แผ่นสไลด์ที่ใส่น้ำเชื้อต้องตั้งอยู่บนแท่นทำความร้อน (37-39 ^{0}ซ) เมื่อจะตรวจก็หยดน้ำเชื้อลงแผ่นสไลด์แล้วใช้แผ่นกระจกบาง(cover glass) วางทาบลงไปให้สนิท

ในการตรวจจำเป็นจะต้องทำให้ตัวอย่างที่ตรวจมีความพร้อม การหยดน้ำเชื้อควรหยดให้เป็นหยดเล็กดีกว่าหยดใหญ่ โดยให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-6 มม.เมื่อวางแผ่นกระจกบางปิดทับลงไปต้องไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้น จัดตำแหน่งให้แผ่นกระจกวางค่อนไปด้านใดด้านหนึ่งของกระจกสไลด์

4.1.1 ตรวจการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

ตารางที่ 1 การแบ่งเกรดการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

การเคลื่อนที่ของอสุจิ	คุณภาพ
90%	ดีมาก
70-80%	ดี
50-60%	ต่ำ
20-40%	เลว
ต่ำกว่า 20%	ใช้ไม่ได้อย่างสัมบูรณ์

น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำกว่า 70% ไม่สามารถใช้ในการผสมเทียม หากไม่ผ่านการเห็นชอบร่วมกันในเงื่อนไขบางประการ และหากมีการนำน้ำเชื้อมาผสมกันก็จะยอมให้มีการเจือจางน้ำเชื้อได้ต่อเมื่อน้ำเชื้อที่ผสมกันนั้นมีการเคลื่อนที่มากกว่า 70% ขึ้นไป

รูปที่ 5 การตรวจการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าแบบรายตัวด้วยกล้องจุลทัศน์

ตารางที่ 2 การประเมินความสมบูรณ์พันธุ์โดยอาศัยการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ทำได้ดังนี้:

การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า, %	ความสมบูรณ์พันธุ์
มากกว่าหรือ เท่ากับ 70%	ความสมบูรณ์พันธุ์ปกติ
60-50%	ความสมบูรณ์พันธุ์ลดลงแต่ยังมีโอกาสกลับมาปกติ
40-20%	ความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ/ต่ำมาก
ต่ำกว่า 20%	พิจารณาเป็นพ่อพันธุ์ไม่มีความสมบูรณ์พันธุ์ หรือเป็นหมัน

4.1.2 **ตรวจรูปร่างอสุจิ**

(ลักษณะรูปร่างของอสุจิแต่ละตัว)

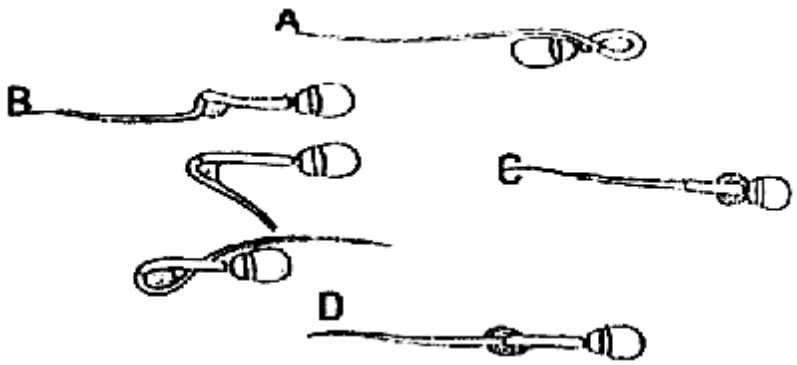
ในตัวอย่างน้ำเชื้อที่ตรวจอาจพบว่ามีตัวอสุจิที่ผิดปกติอยู่ 1-5% ในระดับนี้เราถือว่าเป็นน้ำเชื้อปกติ เพราะไม่กระทบต่อความสมบูรณ์พันธุ์ แต่ถ้าความผิดปกติเริ่มสูงกว่า 5% ให้เริ่มพิจารณาว่าน้ำเชื้อหรือพ่อพันธุ์ตัวนั้นอาจมีความผิดปกติ

ความผิดปกติในรูปร่างของอสุจิที่พบได้บ่อยคือหางบิด(curled tail) อสุจิที่หางบิดจะมีการเคลื่อนที่ผิดปกติ ดังนั้นน้ำเชื้อที่มีอสุจิหางบิดมากๆ จะมีการเคลื่อนที่ที่ต่ำลง ความผิดปกติอื่นๆ ที่พบได้เสมอเช่น หยดน้ำส่วนคอ หยดน้ำส่วนหาง หรืออสุจิที่ไม่มีหัวเป็นต้น

ตารางต่อไปนี้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของอสุจิผิดปกติและผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ที่ลดลงของมัน

ตารางที่ 3 ความผิดปกติของอสุจิต่อผลการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

ความผิดปกติของอสุจิ	ผลต่อการลดการเคลื่อนที่ของอสุจิ, %	การเคลื่อนที่ของอสุจิ
≤5	0	90
6-15	10	80
16-25	20	70
>25	30 หรือมากกว่า	<70



รูปที่ 6 ตัวอย่างความผิดปกติของรูปร่างอสุจิที่พบได้บ่อย

A: หางบิด

B: หางบิดร่วมกับหยดน้ำส่วนปลาย

C: หยดน้ำส่วนคอ

D: หยดน้ำส่วนหาง

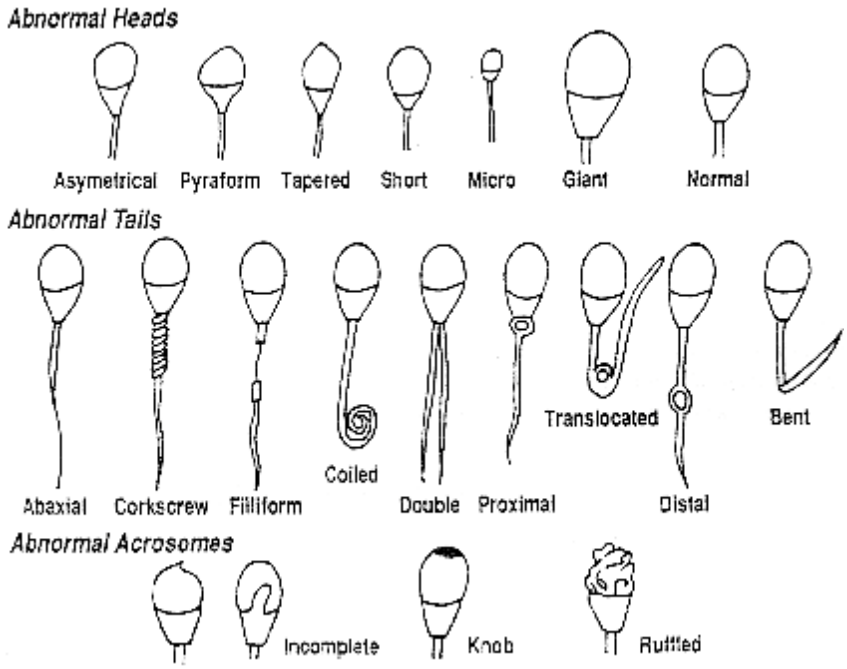
ถ้าอสุจิจำนวนมากกว่า 30% ผิดปกติ หรือไม่เคลื่อนที่ ต้องถือว่าพ่อพันธุ์ในกลุ่มนี้เข้าข่ายมีความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง ถ้ามีความผิดปกติหรือตายมากกว่า 50% ถือว่าพ่อพันธุ์มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำมากหรือเป็นหมันได้

การเจือจางน้ำเชื้อในระดับ 40 เท่า ซึ่งเหมือนการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจด้วยโฟโตมิเตอร์อาจมีผลทำให้น้ำเชื้อเกิดความผิดปกติได้

การตรวจน้ำเชื้อเป็นการประเมินคุณภาพอสุจิเพื่อคัดเลือกน้ำเชื้อพ่อพันธุ์มาผสมเทียม เป็นไปได้ที่จะคัดทิ้งพ่อพันธุ์ที่คุณภาพน้ำเชื้อไม่ผ่านทิ้งไปด้วยเหตุผลว่าไม่สมบูรณ์พันธุ์ แต่การตรวจเป็นการตรวจลักษณะของอสุจิพ่อพันธุ์ที่น้ำเชื้อผ่านการตรวจในช่วงนั้นก็ไม่สามารถกล่าวได้ว่ามันมีความสมบูรณ์พันธุ์ นอกไปจากสรุปได้ว่าน้ำเชื้อของมันไม่มีความผิดปกติ แต่ไม่ทราบได้ว่าสมบูรณ์พันธุ์หรือไม่สมบูรณ์พันธุ์

ดังนั้น: การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อจึงไม่ได้รับประกันถึงความสมบูรณ์พันธุ์

รูปที่ 7 ความผิดปกติของอสุจิในรูปแบบอื่นๆ



5 การเจือจางน้ำเชื้อ

5.1 สารละลายที่ใช้ต้องใส่ยาปฏิชีวนะ ยาปฏิชีวนะที่ใช้ต้องเป็นชนิดที่สามารถฉีดเข้ากระแสโลหิตได้ เช่น เจนต้ามัยซิน แอมม็อกซี่ซิลลิน

ห้ามสัมผัสกับยาปฏิชีวนะโดยตรง

5.2 *ต้องเตรียมสารละลายก่อนใช้อย่างน้อยหนึ่งชั่วโมง* ถ้าเป็นสารละลายที่ชั่งเองต้องชั่งและเตรียมสารละลายไว้ก่อน ถ้าเป็นซองสำเร็จรูปต้องอ่านรายละเอียดทุกครั้งก่อนใช้เพราะสารละลายแต่ละสูตรหรือแต่ละยี่ห้อมีคำแนะนำที่ต่างกัน เช่น 1 ซองอาจสามารถละลายได้ตั้งแต่ 1-10 ลิตร บางชนิดผสมยาปฏิชีวนะมาแล้ว เป็นต้น ควรดูสีของผงสารละลายด้วย ต้องเป็นสีขาวบริสุทธิ์ ไม่จับตัวกันเป็นก้อน

เมื่อทำละลายให้เตรียมขวดตวง (ขวดตวง ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์) และกรวยแก้วไว้ เทผงสารละลายลงไปในกรวยให้ผ่านลงไปที่ภาชนะ ถ้ามีผงสารละลายติดที่ก้นซองให้ใช้น้ำกลั่นเทลงเขย่าให้เข้ากันแล้วเทราดลงไปให้ทั่วกรวยแก้ว เทน้ำกลั่น (Sterile water for injection) ลงไปให้ครบตามปริมาตร ปิดฝาขวดตวงแล้วเขย่าให้เกิดการละลาย ในกรณีใช้บีกเกอร์และมีเครื่องมือช่วยทำละลาย(เครื่องปั่น) ให้นำแท่งแม่เหล็กใส่ลงไปในภาชนะ นำวางบนแท่นเครื่องแล้วเปิดสวิตซ์ให้แท่งแม่เหล็กหมุน จนกระทั่งสาร

ละลายละลายหมดก็เสร็จสิ้น หากจะใช้ในวันนั้นให้ผสมยาลงไปตามขนาดที่กำหนด อุ่นในเครื่องอุ่นที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 1 ชั่วโมงจึงจะนำไปใช้ได้

รูปที่ 8 สารละลายและยาปฏิชีวนะ (ตัวอย่างในภาพ SPEED ™ เป็นสารละลายน้ำเชื้อสำเร็จรูป)

หากเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในวันต่อไปให้นำแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศา เมื่อจะนำสารละลายที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นมาใช้ให้อุ่นจนได้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสก่อนทุกครั้ง

อย่า! *อุ่นสารละลายเกินปริมาตรที่ต้องใช้ในแต่ละครั้ง*

เลือกใช้สารละลายน้ำเชื้อจากแหล่งที่เชื่อใจได้ (มีการผลิตและตรวจสอบที่ได้มาตรฐาน) หากทำสารละลายเองต้องใช้สารละลายเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade) และสั่งซื้อมาใช้ในขนาดที่เหมาะสมกับฟาร์ม(ไม่เกิน 6 เดือน) และควรตรวจคุณภาพทางเคมีหลังการทำละลายทุก 3 เดือน ยาปฏิชีวนะต้องเป็นชนิดฉีดเข้ากระแสโลหิตได้

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของสารละลาย

คุณสมบัติ	ค่ามาตรฐาน
ความเป็นกรดเป็นด่าง(pH)	6.8-7.2
ออสโมลาริตี้ (Osmolarity)	300-310 mOsmoles/kg
ค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity)	6-7 mSeimen

5.3 ในการทำละลายหนึ่งโด๊สผสมต้องมีจำนวนอสุจิอย่างน้อย 2,000,000,000 ล้านเซลล์ ($2,000 \times 10^6$)

ในทางปฏิบัติหากทำละลายเพื่อใช้ในฟาร์มไม่ควรต่ำกว่า 3,000,000,000 ล้านเซลล์ ไม่ว่าจะเป็นการเจือจางแบบง่ายหรือตามความเข้มข้นของอสุจิ เมื่อทราบจำนวนโด๊สที่ต้องทำละลายแล้วให้ปฏิบัติดังนี้

- ทำให้อุณหภูมิของสารละลายเท่ากับน้ำเชื้อ (ห้ามปรับให้น้ำเชื้อเท่ากับสารละลาย)

- ทำการเจือจาง 1:1 ก่อน (น้ำเชื้อกับสารละลายปริมาตรเท่ากัน) ค่อยๆ เทสารละลายที่ใส่ยาปฏิชีวนะแล้วลงไปในน้ำเชื้อ เอียงภาชนะไปมาให้น้ำเชื้อและสารละลายผสมเข้ากัน (ห้ามคน หรือปั่นด้วยเครื่องทำละลาย) *ทำการตรวจการวิ่งไปข้างหน้า การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต้องมากกว่า 70%*

- ทำการเจือจางส่วนที่เหลือ โดยค่อยๆ เทสารละลาย ร่วมกับการเอียงและหมุนภาชนะไปมาเพื่อผสมน้ำเชื้อกับสารละลายให้เข้ากัน *ทำการตรวจการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าอีกครั้งซึ่งต้องมากกว่า 70%* อุณหภูมิสุดท้ายต้องอยู่ระหว่าง 20-35 องศาเซลเซียส (ควรรักษาอุณหภูมิไว้ให้สม่ำเสมอที่ที่ 35 ^{0}ซ)

- บรรจุใส่ขวดผสมให้มีปริมาตร 80-100 มล. แต่ละขวดต้องระบุ เบอร์พ่อ พันธุ์ สายพันธุ์หรือรหัส และวันที่ที่ทำการเจือจาง หากมีพ่อพันธุ์อยู่หลายโรงเรือนต้องระบุโรงเรือนที่พ่อพันธุ์อยู่ด้วย

6 การควบคุมการเจือจางน้ำเชื้อ

6.1 น้ำเชื้อสดที่มีการเคลื่อนที่ต่ำ (70%) หรือมีรูปร่างผิดปกติมากกว่า 10% เมื่อทำละลายเสร็จต้องมีการตรวจซ้ำอย่างรอบคอบ ซึ่งการตรวจซ้ำในน้ำเชื้อที่มีคุณภาพเช่นนี้ต้องทำหลังจากตรวจครั้งแรกอย่างน้อยหนึ่งชั่วโมง

6.2 น้ำเชื้อที่ซื้อมาจากที่อื่นหากมีการรับรองคุณภาพการผสมแม้การเคลื่อนที่ต่ำกว่า 70% อาจอนุโลมให้ใช้ได้

6.3 ต้องมีการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อไว้ตรวจสอบการเคลื่อนที่หลังการทำละลายแล้ว 72 ชั่วโมง(ในตู้เย็น) อย่างน้อย 15% ของจำนวนทั้งหมด

6.4 เมื่อตรวจสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิหลัง 72 ชั่วโมง หากพบว่าน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ตัวใดเคลื่อนที่ไม่ถึง 70% ให้งดใช้ก่อน จนกว่าจะตรวจสอบผ่าน

6.5 ข้อมูลทุกอย่างต้องจดบันทึกไว้ และเก็บอย่างเป็นระบบ ปัจจุบันมีโปแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปที่เก็บข้อมูล และวิเคราะห์การผลิตของพ่อพันธุ์โดยเฉพาะ (โปรแกรม **"พ่อหมู" เกษตรศาสตร์** TM ซึ่งพัฒนาโดยบริษัทไลฟ์ อินโฟร์เมติคส์จำกัด)

รูปที่ 9 โปรแกรม **"พ่อหมู" เกษตรศาสตร์**™ โปรแกรมเพื่อการจัดการพ่อพันธุ์และการผสมเทียม

7 การควบคุมคุณภาพด้านสุขาภิบาลของสารละลายน้ำเชื้อและยาปฏิชีวนะ

7.1 ในสถานีพ่อพันธุ์ต้องตรวจการปนเปื้อนของแบคทีเรียในสารละลายทุกชุด ซึ่งต้องน้อยกว่า 1 CFU ต่อ มล. ถ้าปริมาณสูงเกินกว่า 1,000 – 5,000 CFU ต่อ มล. ต้องปรึกษาสัตวแพทย์ ซึ่งถ้าสูงเกินระดับนี้ติดต่อกัน 3 สัปดาห์ ต้องตรวจสอบอุปกรณ์ในกระบวนการผลิตทุกอย่าง เกิน 5,000 CFU ถือว่ามีปัญหารุนแรงน้ำเชื้อที่ผลิตในชุดนั้นต้องทำลายทิ้ง

7.2 การตรวจ pH ของสารละลาย

สารละลายต้องมีค่า pH อยู่ระหว่าง 6.8-7.1 ถ้าเบี่ยงเบนไปจากนี้ต้องปรึกษาสัตวแพทย์ และตรวจสอบสารเคมี อุปกรณ์และกระบวนการทำงานทุกอย่าง

ถ้า pH ของสารละลายต่ำกว่า 6.0 และสูงกว่า 7.9 สารละลายชุดนั้นต้องทำลายทิ้ง และตรวจสอบแก้ไขจนค่า pH อยู่ระหว่าง 6.8-7.1 จึงจะสามารถใช้ได้

7.3 การทดสอบสารละลายกับความเสียหายของน้ำเชื้อ

ให้สุ่มนำขวดสารละลาย 5 ขวดต่อชุดไปตรวจสอบ แต่ละขวดให้ดูดสารละลายไปใส่หลอดทดลอง 2 หลอด หลอดละ 7 มล. แล้วใส่น้ำเชื้อลงไปหลอดละ 1 มล. (น้ำเชื้อคนละตัว) ทำให้เข้ากันแล้วตรวจดูการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เก็บไว้ในตู้เย็น(16-18 ^{0}ซ) แล้วตรวจซ้ำหลังจากการตรวจครั้งแรก 6 ชั่วโมง การเคลื่อนที่ของอสุจิต้องเท่าเดิม

หลัง 6 ชั่วโมงหากการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิลดลง แต่ pH ยังอยู่ในช่วง 6.8-7.1 แล้วทดสอบด้วยวิธีข้างต้นซ้ำอีก 2 พ่อ ถ้าการเคลื่อนที่ยังต่ำลงให้ทำลายน้ำเชื้อทุกขวดทิ้ง แล้วให้นำผลตรวจสอบและตัวอย่างที่เก็บไว้ปรึกษากับสัตวแพทย์

ถ้าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าลดลงพร้อมกับ pH ไม่อยู่ในช่วง 6.8-7.1 ใน 6 ชั่วโมง ให้ทำลายน้ำเชื้อทุกขวดทิ้ง แล้วให้นำผลตรวจสอบและตัวอย่างที่เก็บไว้ปรึกษากับสัตวแพทย์

ตารางที่ 5 แบบแผนการทำงานในการตรวจสอบผลของสารละลายต่อความเสียหายของน้ำเชื้อ

	0 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง
2 x 1 มล. ของน้ำเชื้อ + สารทำละลาย	ตรวจการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และ pH	ตรวจการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

ตารางที่ 6 การประเมินผลการตรวจการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าหลังจาก 6 ชั่วโมง

การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าลดลง pH ของสารละลาย 6.8-7.1	ให้ตรวจสอบซ้ำ กับน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สองตัว ถ้าการเคลื่อนที่ลดลงหลังหกชั่วโมงให้ทำลายชุดนั้นทิ้ง และแจ้งผู้เกี่ยวข้องให้ทราบ
การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าลดลง pH ของสารละลาย <6.8 หรือ >7.1	ทำลายน้ำเชื้อชุดนั้น และแจ้งผู้เกี่ยวข้องให้ทราบ

ตัวอย่างที่สุ่มมาและไม่ได้ตรวจให้เก็บไว้ในตู้เย็น 5 ^{0}ซ เป็นเวลา 1 เดือน

8 การทำความสะอาด

8.1 เครื่องแก้ว เช็ดล้างด้วยน้ำสบู่ แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด กลั้วด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อด้วยการอบในตู้อบแห้งตั้งอุณหภูมิ 150 ^{0}ซ เป็นเวลาสองชั่วโมง หรือ 140 ^{0}ซ เป็นเวลาสองชั่วโมงครึ่ง

8.2 ขวดพลาสติก เช็ดล้างด้วยน้ำสบู่ แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด กลั้วด้วยน้ำกลั่น และทำให้แห้งที่อุณหภูมิที่พลาสติกนั้นจะทนได้

8.3 หัวจุกไปเปต หลังใช้ให้แช่ไว้ในน้ำทันที
ทำการล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วแช่ใน RBS35 อย่างน้อย 30 นาที นำขึ้นมาล้างล้างด้วยน้ำอุ่น แล้วจุ่มล้างในน้ำร้อน 80 ^{0}ซ ผึ่งให้แห้ง

9 การควบคุมสารก่อพิษต่อน้ำเชื้อ

9.1 ภาชนะที่ใช้ในการเก็บน้ำเชื้อและสารทำละลายอันใหม่ (โดยเฉพาะขวดหรือถุงผสม) ต้องทดสอบก่อนว่าไม่เป็นพิษหรือมีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ ซึ่งทดสอบโดยการใส่น้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วในภาชนะนั้น (ทดสอบอย่างน้อย 25 อัน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อตรวจการเคลื่อนที่ต้องไม่แตกต่างไปจากภาชนะอันเดิม

10 **การนำน้ำเชื้อที่แช่เก็บไว้มาใช้ ต้องตรวจการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าก่อนทุกครั้ง**

10.1 ดูดเก็บน้ำเชื้อจากขวดที่เก็บไว้มา 3 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด (screw-capped plastic tube) ผสมสารทำละลายประมาณ 7 มล. ลงไป ปิดฝา แล้วกลับหลอดทดลองไปมาจนผสมเข้ากันดี

10.2 ใช้ไปเปตดูดน้ำเชื้อใส่ในหลอดทดลอง 2-4 มล. เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน อุ่นในอ่างอุ่นน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37-39 ^{0}ซ

10.3 หลังอุ่นได้ 5 นาที นำขึ้นมาแล้วเขย่าเบาๆ นำลงอุ่นอีกครั้ง

10.4 หลังอุ่นครั้งที่สองเป็นเวลา 5 นาที่ นำน้ำเชื้อในหลอดทดลองมาตรวจการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

10.5ถ้าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำกว่า 70% ให้เขย่าหลอดทดลองใหม่อีกครั้งแล้วอุ่นในอ่างอุ่นน้ำเชื้อประมาณ 10 นาที แล้วตรวจน้ำเชื้อซ้ำอีกครั้ง

10.6 ถ้าการเคลื่อนที่ดีขึ้น น้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ชุดนั้นก็สามารถอุ่นและนำไปใช้ผสมได้

10.7 หากน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ตัวใดไม่ผ่านการตรวจหลังเก็บเป็นเวลา 24 ชั่วโมงต้องทำลายทิ้ง ห้ามนำไปใช้

10.8 ผลการตรวจทุกอย่างต้องบนทึกข้อมูลไว้

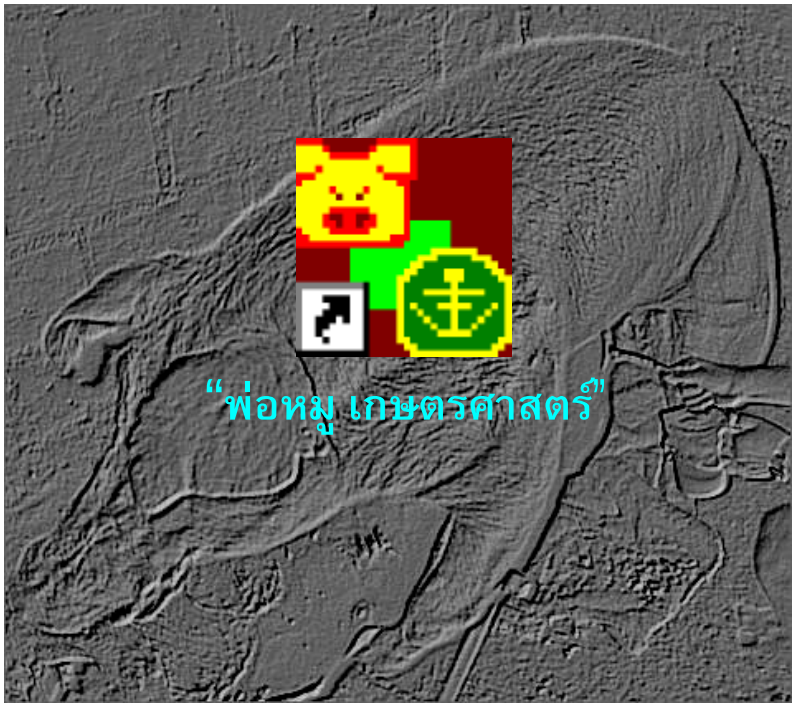
11 **การจัดการพ่อเข้าฝูงใหม่**

11.1 พ่อพันธุ์ที่จะใช้งานต้องผ่านการตรวจคุณภาพน้ำเชื้ออย่างน้อย 3 ครั้ง โดยทดสอบการเคลื่อนที่หลังการรีดทันที หลังการทำละลาย 24 และ 72 ชั่วโมง

คุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ตัวใหม่ต้องเป็นไปตามเกณฑ์ดังนี้

การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า: 80-90%
ความเข้มข้นขั้นต่ำ: 150,000 เซลล์/มม ^{3} หรือ 150,000,000 เซลล์/มล.

11.2 น้ำเชื้อที่ตรวจครั้งแรกแม้จะผ่านการตรวจก็ห้ามใช้ และห้ามขาย
การตรวจในครั้งที่สองและสามต้องตรวจด้วยเช่นกัน ถ้าการตรวจครั้งที่สองและสามมีการเคลื่อนที่มากกว่า 70% หลัง 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง น้ำเชื้อนั้นสามารถใช้ และขายได้ อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อต้องมีการตรวจคุณภาพและประเมินผลตลอดเวลา



"โปรแกรมเพื่อพ่อพันธุ์ และการผสมเทียม"

บริษัทไลฟ์ อินโฟร์เมติคส์ จำกัด โทร. 0292-16818 โทรสาร 0292-16819 เว็บไซต์ www.liveinformatics.com