



วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.

KKU Veterinary Journal

ISSN 0858-2297



RESEARCH ARTICLE

The application of near-infrared spectroscopy technique for measuring plasma Beta-hydroxybutyrate and non-esterified fatty acid concentration and subclinical ketosis screening test in dairy cow

Theerakul Nilnont^{1*}, Rittichai pilachai¹, Pranpreya Todtong¹, Saranya Workhwa²

¹Department of Veterinary Technology, Faculty of Technology, Udon Thani Rajabhat University, Thailand

²Department of Food Science and Technology, Faculty of Technology, Udon Thani Rajabhat University, Thailand

*Corresponding author E-mail: theerakul_nil@yahoo.com

Received 13 May 2021, **Revised** 14 June 2021 **Accepted** 18 June 2021, **Published** 30 June 2021

Abstract

Introduction: Ketosis is one of the metabolic diseases that causes economic losses in dairy industry. The evaluation of BHB and NEFA is a specific test for subclinical ketosis which shows the higher blood level of beta-hydroxybutyrate (BHB) and non-esterified fatty acid (NEFA). There have been applied the Near-infrared spectroscopy (NIRS) technique for detecting subclinical ketosis, however the studies of this technique are needed for supporting the accuracy of the analysis and screening tests.

Objectives: The aims of this study were to apply the NIRS technique to measure plasma BHB and NEFA of dairy cow by generating the appropriate equation to predict the relationship between the laboratory BHB and NEFA results and the NIRS results, and to investigate the prevalence of subclinical ketosis in dairy raising area, Udon Thani province.

Materials and Methods: blood and plasma samples of 102 post-partum dairy cows (5-60 DIM) were collected. The plasma samples were separated and divided into 2 parts, for laboratory BHB and NEFA analysis and NIRS analysis by using FT-NIR and DLP-NIR. The appropriate equation was generated to predict the BHB and NEFA level.

Results: The prevalence of subclinical ketosis in post-partum dairy cows was 5.88% (6/102). The statistical analysis to generate the equation to predict plasma BHB and NEFA level, by using FT-NIR และ DLP-NIR, demonstrated the R value were 0.98, 0.90 and 0.98, 0.84, respectively.

Conclusion: The results of this study showed the moderate relationship between the laboratory and the NIRS BHB and NEFA level and was able to apply in the research. The further studies and data collections is necessary for improve the accuracy of blood chemistry analysis by using NIRS technique.

Keywords: Near-infrared spectroscopy, beta-hydroxybutyrate, non-esterified fatty acid, dairy cow

การประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปีเพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรทและกรดไขมันอิสระในพลาสมา และการตรวจคัดกรองโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในโคนม

ธีระกุล นิลนนท์¹, ฤทธิชัย พิลาลัย¹, ปราณปรียา ทอดทอง¹, ศรัญญา วอขวา²

¹สาขาวิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคโนโลยี มหวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี 41000

²สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี 41000

ผู้ประพันธ์บรรณกิจ อีเมล: theerakul_nil@yahoo.com

บทคัดย่อ

บทนำ โรคคีโตซิสเป็นหนึ่งในโรคทางเมตาบอลิซึมที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในการเลี้ยงโคนม โรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ (subclinical ketosis) วินิจฉัยโดยการตรวจระดับความเข้มข้นของสารเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท (beta-hydroxybutyrate; BHB) และกรดไขมันอิสระ (non-esterified fatty acid; NEFA) ในกระแสเลือด มีการประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (near-infrared spectroscopy; NIRS) ในการตรวจคัดกรองโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษาเทคนิค NIRS ในการตรวจคัดกรองโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ ยังมีความต้องการเพื่อสนับสนุนให้เกิดความแม่นยำมากขึ้น

วัตถุประสงค์ เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ประเมินระดับ BHB และ NEFA ในพลาสมาโคนม โดยสร้างสมการที่เหมาะสมทำนายความสัมพันธ์ระหว่างค่า BHB และ NEFA จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับค่า BHB และ NEFA จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS และศึกษาความถูกต้องของการเกิดโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในพื้นที่เลี้ยงโคนม จังหวัดอุดรธานี

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ เก็บตัวอย่างเลือดจากแม่โครีดนมระยะหลังคลอด (5-60 วัน) จำนวน 102 ตัว แบ่งตัวอย่างพลาสมาเป็น 2 ส่วน เพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ค่า BHB และ NEFA และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS โดยใช้เครื่อง FT-NIR และ DLP-NIR เพื่อนำข้อมูลมาสร้างสมการที่เหมาะสมเพื่อทำนายระดับค่า BHB และ NEFA

ผลการศึกษา พบความถูกต้องของแม่โครีดนมหลังคลอดเป็นโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ 5.88% (6/102 ตัว) จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า สมการที่ใช้ทำนายความเข้มข้นสาร BHB และ NEFA ในพลาสมาที่วิเคราะห์จากเครื่อง FT-NIR และ DLP-NIR มีค่า R เท่ากับ 0.98, 0.90 และ 0.98, 0.84 ตามลำดับ

สรุป ผลการศึกษานี้ให้ความสัมพันธ์ของค่า BHB และ NEFA จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการและการวิเคราะห์ด้วย NIRS ในระดับปานกลาง ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยได้ ดังนั้น การศึกษาวิจัยต่อไปจะต้องทำการเก็บข้อมูลเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการวิเคราะห์ค่าเคมีต่างๆ ในเลือดโดยการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS

คำสำคัญ: เนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี, เบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท, กรดไขมันอิสระ, โคนม

บทนำ

โคนมที่อยู่ในระยะเปลี่ยนถ่าย (transitional period) และโคนมหลังคลอดระยะแรก ส่วนมากมักจะเกิดภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบ (negative energy balance) เนื่องจาก 3 ปัจจัยหลักๆ ได้แก่ ความต้องการพลังงานเพิ่มมากขึ้นในช่วงก่อนคลอดและช่วงคลอดลูก มีการกินได้ลดลงในช่วงก่อนคลอดและช่วงหลังคลอดเล็กน้อย และได้รับอาหารพลังงานไม่เพียงพอเนื่องจากโคต้องใช้เวลาในการสร้างน้ำนม ((Rukkamsuk et al., 1999, Ospina et al., 2010, Rutherford et al., 2016) ซึ่งโคที่มีภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบ จะมีการสลายไขมัน (lipolysis) จากเนื้อเยื่อไขมันได้เป็นกรดไขมันอิสระ (non-esterified fatty acid; NEFA) ในร่างกายเข้าสู่กระแสเลือดมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งในภาวะปกติ NEFA ในเลือดจะเกิดปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ (oxidize) โดยเซลล์ตับ (hepatocyte) หรือส่งออกในรูปของสารประกอบไลโปโปรตีนหนาแน่นต่ำ (very low density lipoprotein; VLDL) อย่างไรก็ตาม เมื่อโคระยะเปลี่ยนถ่ายและระยะหลังคลอดมีภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบและต้องการพลังงานเพื่อการให้ผลผลิตอย่างมาก จะทำให้มีระดับ NEFA เพิ่มสูงขึ้นและเกินความสามารถของตับในการออกซิไดซ์ (Herd, 1997, Adewuyi et al., 2005) ซึ่งจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ (hepatocyte toxicity) โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ตับ และก่อให้เกิดภาวะไขมันสะสมในตับ (fatty liver) ตามมา (Li et al., 2020) ซึ่งระดับของกรดไขมันอิสระในกระแสเลือดที่เกินความสามารถของตับในการออกซิไดซ์ จะถูกอะซิติล โคเอนไซม์เอ (Acetyl CoA) เปลี่ยนเป็นสารคีโตน (ketone bodies) ได้แก่ อะซิโตน (acetone) อะซิโตะซีเตท (acetoacetate) และเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท (β -hydroxybutyrate; BHB) และมีระดับสูงขึ้นในกระแสเลือด (hyperketonemia) โดยสามารถตรวจพบความเข้มข้นของสารคีโตนบอดีได้ในของเหลวต่างๆ ของร่างกาย เช่น น้ำปัสสาวะ น้ำนม (Dervishi et al., 2021, Enjalbert et al., 2001, Ospina et al., 2010)

โรคคีโตซิสในโคนม เป็นหนึ่งในโรคทางเมตาบอลิซึม (metabolic disease) ที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมเป็นอย่างมาก (Gordon et al., 2013) โรคคีโตซิสเป็นความผิดปกติทางคลินิกที่เกิดจากภาวะการมีระดับสารคีโตนในกระแสเพิ่มสูงขึ้น (hyperketonemia) ซึ่งเกิดในแม่โคระยะหลังคลอดที่มีภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบ (negative energy balance) มีการสูญเสียพลังงานเนื่องจากการดื่มน้ำและพลังงานสะสมในร่างกายไปใช้ในการสร้างน้ำนม (Herd, 2000, Rutherford et al., 2016) แม่โคที่เกิดโรคคีโตซิสจะมีความอยากอาหารลดลง สร้างน้ำนมลดลง ประสิทธิภาพความสมบูรณ์

พันธุ์ลดลง เป็นต้น (Baird, 1982) โรคคีโตซิสในโคนม แบ่งตามลักษณะอาการที่แสดงออกได้เป็น 2 แบบคือ แบบแสดงอาการ (clinical ketosis) และแบบไม่แสดงอาการ (subclinical ketosis) แม่โคที่เกิดภาวะคีโตซิสจะมีสารคีโตนบอดี (ketone bodies) ได้แก่ สารอะซิโตน (acetone) สารอะซิโตะซีเตท (acetoacetate) และสารเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท (β -hydroxybutyrate; BHB) สูงขึ้นในกระแสเลือดและสามารถตรวจพบความเข้มข้นของสารคีโตนบอดีได้ในของเหลวต่างๆ ของร่างกาย เช่น น้ำปัสสาวะ น้ำนม (Dervishi et al., 2021, Enjalbert et al., 2001, Ospina et al., 2010)

จากการศึกษาความชุกของโรคคีโตซิสในระดับฟาร์มพบว่า โรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการมีความชุกมากกว่าโรคคีโตซิสแบบแสดงอาการ (40% และ 5% ตามลำดับ) (Oetzel, 2004, Suthar et al., 2013) และโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการยังมีความสำคัญในแง่ของการสูญเสียทางเศรษฐกิจ โดยก่อให้เกิดความสูญเสียคิดเป็น 6,000 บาทต่อตัว ความสูญเสียที่เกิดขึ้นจะเกิดจากการสร้างน้ำนมลดลง ความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง และค่ารักษาพยาบาลที่เพิ่มขึ้น (Gohary et al., 2016) รวมทั้งมีความเสี่ยงให้เกิดโรคเต้านมอักเสบและมดลูกอักเสบหลังคลอดมีความเสี่ยงเกิดภาวะกระเพาะแพ้น้ำเค็มและกรดในท้อง (Suthar et al., 2013) โรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ มักพบในโคนมในระยะ 1-2 เดือนแรกของการให้นม (Andersson, 1988) โดยจะพบความชุกมากที่สุดประมาณวันที่ 65 หลังคลอด (Gordon et al., 2013, Suthar et al., 2013) มีรายงานความชุกของการเกิดโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในโคนมในหลายพื้นที่ทั่วโลก อาทิเช่น ทวีปอเมริกาเหนือ ทวีปยุโรป ทวีปอเมริกาใต้ ทวีปแอฟริกา ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ ทวีปเอเชีย พบความชุกของโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในโคนมหลังคลอด 24.1% (8.3 – 40.1%) (Brunner et al., 2019) และการศึกษาประเทศไทยพบความชุกของการเกิดโรคคีโตซิส 12.5% ในโคนมระยะ 2 สัปดาห์หลังคลอด (Promkot et al., 2011)

การตรวจหาความเข้มข้นของ NEFA และ BHB ถือว่ามีความจำเพาะในการตรวจคัดกรองภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบ และโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในโคนม (LeBlanc, 2010, Li et al., 2020, Dervishi et al., 2021) โดยแม่โคที่เป็นโรคคีโตซิสจะมีค่า BHB ในเลือดมากกว่า 1.0 mmol/L (หรือมากกว่า 10 mg%) โดยจำแนกเป็น แม่โคที่เป็นโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ และแม่โคที่เป็นโรคคีโตซิสแบบแสดงอาการ จะมีค่า BHB ในเลือด 1.0-2.9 mmol/L (10-29 mg/dl) และมากกว่า 3.0 mmol/L (มากกว่า 30 mg/dl) ตามลำดับ (Oetzel, 2004, Zhang et al., 2013) และการบ่งชี้ภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบซึ่งมีความเข้ม

ชั้นของ NEFA ในเลือดเพิ่มขึ้น โดยมีระดับความเข้มข้นมากกว่า 0.3 mmol/L (Cao et al., 2017, Liu et al., 2020, Shen et al., 2020)

การศึกษาเกี่ยวกับวิธีการวินิจฉัยโรคคิตโตซิสแบบไม่แสดงอาการโดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการประเมินค่า BHB ในเลือดโคนม เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคคิตโตซิสในโคทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การใช้เครื่อง Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) (Wu et al., 2020) และตรวจหาระดับ NEFA ในกระแสเลือดด้วยเทคนิค gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) (Zhang et al., 2013, Liu et al., 2020) รวมทั้ง การตรวจคัดกรองการเกิดคิตโตซิสในฟาร์มโคนมโดยการตรวจหาระดับ BHB ในเลือดโดยการประยุกต์ใช้เครื่องมืออิเล็กโทรนิคส์ (electrochemical meter; Precision Xtra®) (Zakian et al., 2017) และชุดตรวจสำเร็จรูปที่ใช้หลักการของวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ตรวจหาระดับ BHB ในเลือดโคนมที่สามารถตรวจในฟาร์มได้ ซึ่งมีความไว (sensitivity) 85% และมีความจำเพาะ (specificity) 94% (Voyvoda and Erdogan, 2010, Macmillan et al., 2017) ทั้งนี้ สามารถตรวจคัดกรองโรคคิตโตซิสในฟาร์มโคนมโดยการตรวจหาระดับคิตโตบอดี้ในปัสสาวะโครีดนมหลังคลอด โคที่อยู่ในช่วง 2 เดือนแรกของการให้นม ซึ่งเป็นระยะที่ตรวจพบสารคิตโตบอดี้ในปัสสาวะมากที่สุด และพบความชุกของโรคคิตโตซิสแบบไม่แสดงอาการในโคนมระยะ 2 เดือนแรกของการให้นมเท่ากับ 25% (Simasatitkul and Supaluckbunlue, 1998) และ 20% (Rukkwamsuk, 2005)

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (near-infrared spectroscopy; NIRS) ใช้หลักการการดูดกลืนแสง (absorption) ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (incident) กับอะตอมหรือโมเลกุลของสารละลายหรือวัตถุ แสงอินฟราเรดย่านใกล้ (near Infrared) ที่ใช้ในเทคนิคนี้ มีความยาวคลื่นในช่วง 780 – 2500 นาโนเมตร (nm.) ซึ่งมีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของกลุ่มฟังก์ชัน (functional group; -CH, -NH หรือ -OH) และศึกษาโครงสร้างโมเลกุลได้ การศึกษาที่ผ่านมา มีการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ศึกษาทางด้านสุขภาพสัตว์มากขึ้น ได้แก่ การประยุกต์ใช้เครื่อง Fourier Transform - Near Infrared Spectrophotometer (FT-NIR) ในการตรวจคัดกรองโรคคิตโตซิสแบบไม่แสดงอาการในโคนมโดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยน้ำนมหาความเข้มข้นของสารคิตโตบอดี้ (De Roos et al., 2007, Van Kneegsel et al., 2010) การประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของค่าเคมีโลหิตในซีรัมโคนม ซึ่งพบว่ามี ความแม่นยำเพียงพอในการวัดปริมาณค่าเคมีโลหิตที่เทียบ

เท่ากับวิธีการในห้องปฏิบัติการทางคลินิก (Yawongsa and Sukhontarad, 2018) และการใช้เทคนิค NIRS วัดความเข้มข้นของสาร BHB ในซีรัมโคนมทุกระยะของการให้นมที่มีสุขภาพดี ซึ่งผลการศึกษานี้พบว่า สามารถนำผลการจากการศึกษาไปใช้งานได้ เนื่องจากความเข้มข้นของสาร BHB จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการกับค่าที่ทำนายจากเทคนิค NIRS มีความใกล้เคียงกัน

การประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการประเมินและทำนายค่า BHB และ NEFA ในกลุ่มประชากรแม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด และเพื่อตรวจคัดกรองโรคคิตโตซิสแบบไม่แสดงอาการในกลุ่มประชากรแม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด ซึ่งเป็นระยะที่มีความเสี่ยงและมักพบอุบัติการณ์การเกิดโรคคิตโตซิสแบบไม่แสดงอาการ จะเป็นประโยชน์ในการประเมินสถานการณ์โรคคิตโตซิสแบบไม่แสดงอาการในกลุ่มประชากรโคนมหลังคลอด สามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สนับสนุนการวินิจฉัยโรค และช่วยเพิ่มเครื่องมือในการวินิจฉัยโรคคิตโตซิสแบบไม่แสดงอาการในพื้นที่เลี้ยงโคนม ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า BHB และ NEFA ในพลาสมาโครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS และเพื่อศึกษาความชุกของการเกิดโรคคิตโตซิสแบบไม่แสดงอาการในโครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด ในพื้นที่เลี้ยงโคนม โดยการประเมินค่า BHB และ NEFA จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

โคนม

แม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด สายพันธุ์ลูกผสมไฮลส์ไตนีร์เซียน ในฟาร์มโคนมของเกษตรกรรายย่อย ในเขตการเลี้ยงโคนมของจังหวัดอุดรธานี โดยจำนวนตัวอย่างประชากรโครีดนมในการศึกษานี้ คำนวณด้วยวิธีการประมาณค่าเพื่อการสำรวจความชุก (sample size for prevalence survey estimation) (Dohoo et al., 2010) ใช้ค่าความชุกคาดหวัง (expected prevalence) 12.5% (Promkot et al., 2011) จากจำนวนประชากรโครีดนมในพื้นที่ประมาณ 1,000 ตัว ที่ระดับความเชื่อมั่น (Confidence interval) 95% และค่าคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ 5% โดยใช้โปรแกรม EpiInfo version 7.2 (Epi Info™, CDC, USA) การศึกษานี้ได้ผ่านการพิจารณาและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยบรรณและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ตามหลักเกณฑ์จริยบรรณการใช้สัตว์ของคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่ ศธ 0543.7/358

การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณโคนหาง (coccygeal vein) ลงในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) นำหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดมาปั่นแยกพลาสมาด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เก็บพลาสมาใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 2 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด และเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS ต่อไป

การตรวจทางห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ NEFA และ BHB

ทำการตรวจวิเคราะห์ระดับของ BHB และ NEFA ในพลาสมาแม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด (Duffield, 2000, Herdt, 2000, Jorjong et al., 2014) ทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ Olympus AU-400 (AU400 chemistry analyzer, OLYMPUS CORPORATION) ณ ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การแปลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ กำหนดให้แม่โคหลังคลอดที่มีระดับ BHB ในพลาสมา 1.2-2.9 mmol/L (Oetzel, 2004, Wang et al., 2016, Brunner et al., 2019) หรือมีระดับของ NEFA ในเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 0.26 mmol/L (Asl et al., 2011) เป็นโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ

การวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาโครีดนม ด้วยเทคนิค NIRS

นำตัวอย่างเลือดในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA และตัวอย่างพลาสมา มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของสเปกตรัมและค่าเคมีในเลือด (BHB และ NEFA) โดยทำการตรวจวิเคราะห์ ณ คณะวิศวกรรมศาสตร์และสถาปัตยกรรมศาสตร์ สาขาวิศวกรรมหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูป มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตขอนแก่น โดยวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดและพลาสมาด้วยเครื่องเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี 2 เครื่อง ได้แก่ 1) เครื่อง Digital light processing near infrared spectroscopy (DLP-NIR) ที่มีคุณสมบัติวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 900-1,700 nm และ 2) เครื่อง Fourier transform near infrared spectroscopy (FT-NIR) มีคุณสมบัติวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1,000-2,500 nm. โดย

การวัดค่าการดูดกลืนแสงแต่ละตัวอย่างจะทำการปิดด้วยวัสดุกันสะท้อน (path length) และวัดค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่างละ 2 ครั้ง เพื่อหาองค์ประกอบในตัวอย่่างและทำการทำนายความเข้มข้นของ NEFA และ BHB ในตัวอย่าง โดยทำการบันทึกค่าความเข้มข้นของ NEFA และ BHB ที่ได้จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการลงในค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย NIRS

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

รายงานความชุกของโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในโครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด (มีระดับ BHB หรือ NEFA ในพลาสมา ≥ 1.2 mmol/L หรือ ≥ 0.26 mmol/L ตามลำดับ) โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ BHB และ NEFA ในพลาสมาในแม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอดระหว่างกลุ่มที่เกิดโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการกับกลุ่มปกติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ student's t-test โดยใช้โปรแกรม SPSS (SPSS for Windows Version 20.0)

กำหนดให้ตัวแปรอิสระ (independence variable) คือ โดยผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่างพลาสมาด้วยเทคนิค NIRS แต่ละเครื่อง และตัวแปรตาม (dependence variable) คือค่า BHB และ NEFA จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ จากนั้น นำข้อมูลสเปกตรัมจากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดและพลาสมา มาสร้างสมการหาความสัมพันธ์และทำนายค่าความเข้มข้นของสาร BHB และ NEFA ในเลือด จากสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ด้วยวิธีการวิเคราะห์การถดถอยกำลังน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares regression; PLSR) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (ตัวแปรอิสระ) กับค่าความเข้มข้นของ BHB และ NEFA ทางห้องปฏิบัติการ (ตัวแปรตาม) โดยพิจารณาจากค่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient; R) คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการกับค่าที่ได้จากการทำนายด้วยเทคนิค NIRS และค่า Root Mean Square Error of Cross Validation (RMSECV) คือ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการกับค่าที่ได้จากการทำนายด้วยเทคนิค NIRS ใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกสมการ (De Roos et al., 2007, William, 2007; Sukhontarad and Yawongsa, 2020) ใช้โปรแกรม unscramble version 9.7 ทำการปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัมเพื่อลดความแปรปรวนของข้อมูล

ผลการศึกษา

ระดับความเข้มข้นของสาร BHB และ NEFA จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ และความชุกของโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในโครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอดในพื้นที่ศึกษา

การคำนวณจำนวนตัวอย่างแม่โครีดนมเพื่อทำการเก็บตัวอย่างในการศึกษานี้ ใช้เกณฑ์ในการคัดเลือกแม่โครีดนมเพื่อเก็บตัวอย่างเลือด คือ แม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด จากการคำนวณด้วยโปรแกรม EpiInfo version 7.2 (Epi Info™, CDC, USA) ได้จำนวนตัวอย่างแม่โครีดนมเท่ากับ 144 ตัว ทั้งนี้มีแม่โครีดนมที่เข้าเกณฑ์เป็นกลุ่มตัวอย่างในการศึกษานี้คือ แม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด จำนวน 102 ตัว โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดในแม่โครีดนมหลังคลอด จำนวน 102 ตัว เพื่อตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของสาร BHB และ NEFA ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี ELISA พบว่า ความเข้มข้นเฉลี่ยของ BHB ในพลาสมาของกลุ่มตัวอย่าง เท่ากับ 0.6 mmol/L (0.6 ± 0.26) และความเข้มข้นเฉลี่ยของ NEFA ในพลาสมาของกลุ่มตัวอย่าง เท่ากับ 0.07 mmol/L (0.07 ± 0.06)

เมื่อพิจารณาเกณฑ์จุดตัด (cut-off point) ของค่า BHB (≥ 1.2 mmol/L) หรือค่า NEFA (≥ 0.26 mmol/L) ในการบ่งชี้โรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ (subclinical ketosis) พบความชุกของโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในแม่โครีดนม เท่ากับ 5.88% (6/102 ตัว) โดยแม่โครีดนมกลุ่มที่เป็นโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการมีความเข้มข้นเฉลี่ยของ BHB เท่ากับ 1.21 mmol/L (1.21 ± 0.03) ค่าสูงสุด (max.) เท่ากับ 1.25 mmol/L ค่าต่ำสุด (min.) เท่ากับ 0.27 mmol/L และมีความเข้มข้นเฉลี่ยของ NEFA เท่ากับ 0.25 mmol/L (0.25 ± 0.12) ค่าสูงสุด เท่ากับ 0.38 mmol/L ค่าต่ำสุด เท่ากับ 0.02 mmol/L ในขณะที่ความเข้มข้นเฉลี่ยของ

BHB ในกลุ่มแม่โครีดนมที่ไม่เป็นโรคคีโตซิส (กลุ่มปกติ) มีค่าเท่ากับ 0.56 mmol/L (0.56 ± 0.13) และความเข้มข้นเฉลี่ยของ NEFA มีค่าเท่ากับ 0.06 mmol/L (0.06 ± 0.05) เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นเฉลี่ยของ BHB และ NEFA ในพลาสมาของแม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด ระหว่างกลุ่มเป็นโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการกับกลุ่มปกติ พบว่า กลุ่มเป็นโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการมีค่าเฉลี่ย BHB และ NEFA ในพลาสมาสูงกว่าแม่โครีดนมปกติ อย่างมีนัยสำคัญ (1.21 vs 0.56 mmol/L และ 0.25 vs 0.06 mmol/L ตามลำดับ, $p < 0.05$) ความเข้มข้นของ BHB และ NEFA ในพลาสมาโครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด และความชุกของแม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอดที่เกิดโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในพื้นที่ศึกษา แสดงดังตารางที่ 1

ผลการวิเคราะห์การถดถอยกำลังน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares regression ;PLSR) เพื่อสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของสาร BHB และ NEFA ในตัวอย่างพลาสมาของแม่โครีดนม

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค NIRS และค่าความเข้มข้นของสาร BHB และ NEFA ในตัวอย่างพลาสมาของแม่โครีดนม จากการวิเคราะห์พลาสมาตัวอย่างจำนวน 102 ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง FT-NIR และ DLP-NIR ความยาวคลื่น 1,000-2,500 nm. และ 901.54-1,701.37 nm. ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์การดูดกลืนแสงในตัวอย่างพลาสมาแต่ละตัวอย่าง จำนวน 2 ครั้ง (2 ซ้ำ) ทำให้ได้ข้อมูลค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงจากเครื่อง NIRS แต่ละเครื่อง จำนวน 204 ตัวอย่าง

การสร้างกราฟสอบเทียบความถูกต้องของสมการ (calibration curve) ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแกน

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นเฉลี่ยของ BHB และ NEFA (mean $\pm$ SD) ในพลาสมาแม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด และความชุกของแม่โครีดนมที่เกิดโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ (cut off BHB ≥ 1.2 mmol/L) จำนวน 102 ตัวในพื้นที่ศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง	ความชุก(%)	ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ			
		BHB (mmol/L)	BHB min.-max.	NEFA (mmol/L)	NEFA min.-max.
ภาพรวม		0.60 $\pm$ 0.26	0.20-1.25	0.07 $\pm$ 0.06	0.01-0.38
กลุ่มคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ	5.88%	1.21 $\pm$ 0.03*	1.20-1.25	0.25 $\pm$ 0.12**	0.02-0.38
กลุ่มปกติ	94.12%	0.56 $\pm$ 0.14	0.27-0.87	0.06 $\pm$ 0.05	0.01-0.25

*แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบค่า BHB ระหว่างกลุ่มคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ กับ กลุ่มปกติ

**แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบค่า NEFA ระหว่างกลุ่มคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ กับ กลุ่มปกติ

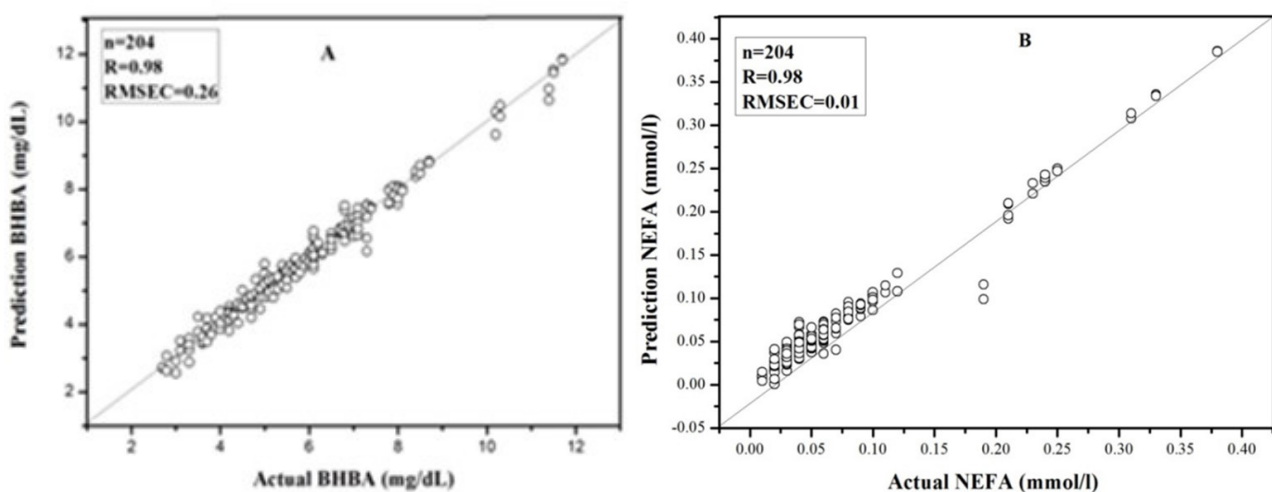
X และแกน Y โดยกำหนดให้แกน Y เป็นตัวแปรอิสระ (independence variable) คือ ผลการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่างพลาสมาด้วยเครื่อง NIRS แต่ละเครื่อง และกำหนดให้แกน X เป็นตัวแปรตาม (dependence variable) คือ ความเข้มข้นของ BHB และ NEFA ที่วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี ELISA ตามลำดับ โดยพบว่า ผลการวิเคราะห์การถดถอยกำลังน้อยที่สุดบางส่วน (PLSR) จากค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่างพลาสมาด้วยเครื่อง FT-NIR ให้กราฟของสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสง กับค่า BHB และ NEFA ที่วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการเหมาะสมที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 1

จากนั้นนำข้อมูลตัวแปรอิสระและตัวแปรตามมาวิเคราะห์การถดถอยกำลังน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares regression ;PLSR) เพื่อสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของสาร BHB และ NEFA ในตัวอย่างพลาสมาแม่โครีดนม โดยพิจารณาความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี จากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R) และค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างสมการ (root mean standard error of calibration; RMSECV) ผลการศึกษานี้พบว่า สเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี 2nd Derivative มีความเหมาะสมสำหรับการทำนายความเข้มข้นสาร BHB และ NEFA โดยสมการที่ใช้ทำนายความเข้มข้นสาร BHB และ NEFA ในพลาสมา ที่วิเคราะห์จากเครื่อง FT-NIR และ DLP-NIR มีค่า R เท่ากับ 0.98, 0.90 และ 0.98, 0.84 ตามลำดับ และมีค่า RMSECV เท่ากับ 0.34, 0.05 และ 0.01, 0.04 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

วิจารณ์

โรคคีโตซิสในโคนมเป็นภาวะความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม (metabolic disorder) ที่พบได้ในหลายช่วงอายุของโคนม เช่น ระยะแห้งนม (dry period) ระยะเปลี่ยนถ่าย (transitional period) ระยะคลอดลูก รวมทั้งระยะแรกของการให้นม (Duffield et al., 2009, Promkot et al., 2011) วิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในโคนม คือ การตรวจหาระดับ BHB ในเลือด โดยใช้จุดตัด (cut-off point) ค่า BHB มากกว่าหรือเท่ากับ 1.2 mmol/L ($BHB \geq 1.2 \text{ mmol/L}$) บ่งชี้โรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในโคนม (Oetzel, 2004, Wang et al., 2016, Brunner et al., 2019) ซึ่งในการศึกษานี้ พบความชุกของแม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอดที่มีค่า BHB $\geq 1.2 \text{ mmol/L}$ เท่ากับ 5.88% (6/102 ตัว) ซึ่งการวินิจฉัยโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการโดยใช้จุดตัด (cut-off point) ค่า BHB $\geq 1.2 \text{ mmol/L}$ มีความไวและมีความจำเพาะต่อการบ่งชี้ภาวะคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ 97% และ 82% ตามลำดับ (Mahrt et al., 2015)

มีรายงานพบความชุกของโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในกลุ่มโครีดนมประมาณ 40% ขณะที่ความชุกของโรคคีโตซิสแบบแสดงอาการพบกลุ่มโครีดนมประมาณ 5% อย่างไรก็ตาม ความชุกที่พบจะแปรผันขึ้นอยู่กับแต่ละฟาร์ม และในบางฟาร์มสามารถพบความชุกของโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการสูงถึง 80% (Jenskin et al., 2015, Brunner et al., 2019) โดยผลการศึกษาพบความชุกของโครีดนมหลังคลอดที่เกิดโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในเขตพื้นที่ศึกษา (5.88%) ซึ่งใกล้เคียงและ



รูปที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FT-NIR เพื่อใช้เป็นกราฟในการตรวจสอบความถูกต้อง (calibration curve) ของการสร้างสมการทำนายค่า (calibration) ของ BHB (A) และ NEFA (B)

ตารางที่ 2 ผลวิเคราะห์ทางสถิติหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น BHB และ NEFA ในพลาสมาแม่โครีดนมทางห้องปฏิบัติการ กับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NIRS: FT-NIR และ DLP-NIR ด้วยวิธีการวิเคราะห์การถดถอยกำลังน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares regression ;PLSR) จำนวน 204 ตัวอย่าง

วิธีการปรับแต่ง สเปกตรัม	การทำนายค่า BHB				การทำนายค่า NEFA			
	FT-NIR		DLP-NIR		FT-NIR		DLP-NIR	
	R	RMSECV	R	RMSECV	R	RMSECV	R	RMSECV
ไม่มีการปรับแต่ง	0.91	0.74	0.91	0.73	0.86	0.03	0.89	0.03
วิธี Smoothing	0.82	1.04	0.71	1.11	0.82	0.03	0.78	0.04
วิธี 1st derivative	0.97	0.38	0.90	0.79	0.98	0.01	0.91	0.03
วิธี 2nd derivative	0.98	0.34	0.90	0.05	0.98	0.01	0.84	0.04
วิธี SNV	0.83	1.01	0.95	0.64	0.89	0.03	0.92	0.03
วิธี MSC	0.83	1.01	0.85	0.74	0.89	0.03	0.92	0.03

สอดคล้องกับการศึกษาของ Vicente et al. (2014) ที่ทำการศึกษาการเกิดภาวะคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในระยะเปลี่ยนถ่ายในโคนม (transitional period) และระยะหลังคลอด พบความชุกของภาวะคีโตซิสในประชากร เท่ากับ 9.2% (8.9% – 34%)

การวินิจฉัยโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในระดับฟาร์ม โดยการตรวจระดับความเข้มข้นของ BHB ในเลือด ควรมีหลักเกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างโครีดนมเพื่อเป็นตัวแทนที่เหมาะสมของประชากรโครีดนมในฟาร์ม ควรเลือกกลุ่มโครีดนมหลังคลอด 5-60 วัน ซึ่งเป็นกลุ่มโครีดนมที่มีความเสี่ยงสูงในการเกิดโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ ร่วมกับการพิจารณาสัดส่วนของโครีดนมที่มีค่า BHB ในเลือดมากกว่าค่าจุดตัด ($BHB \geq 1.2$ mmol/L) ซึ่งฟาร์มที่ประชากรโครีดนมมีค่า BHB ในเลือดสูงกว่าค่าจุดตัด ($BHB \geq 1.2$ mmol/L) มีสัดส่วนมากกว่า 15% ของประชากรโครีดนมทั้งหมด สามารถบ่งชี้ถึงปัญหาของโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในระดับฟาร์มได้ (Duffield and Bagg, 2002) โดยในการศึกษานี้ พบว่า สัดส่วนของโครีดนมหลังระยะ 5-60 วันหลังคลอดที่มีค่า BHB ในเลือดสูงกว่าค่าจุดตัด ($BHB \geq 1.2$ mmol/L) เท่ากับ 5.88% ซึ่งบ่งชี้ว่าประชากรโครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอดในพื้นที่ศึกษามีการเกิดโรคคีโตซิสในระดับที่ยอมรับได้ในพื้นที่ศึกษา และบ่งชี้ว่าโครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอดในพื้นที่ศึกษา ไม่มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะกระเพาะไคเลี่ยนผิดปกติและเกิดโรคคีโตซิสแบบแสดงอาการและผลิตน้ำนมลดลงตามมา ซึ่งมีรายงานว่าแม่โครีดนมหลังคลอดที่มีค่า BHB มากกว่าค่าจุดตัด ($BHB \geq 1.2$ mmol/L) 3 เท่า บ่งชี้ว่าโครีดนมเหล่านี้มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะกระเพาะไคเลี่ยนผิดปกติและเกิดโรคคีโตซิสแบบแสดงอาการตามมา ส่วนโครีดนมกลุ่มที่มีค่า

BHB ในเลือดมากกว่าค่าจุดตัด 2 เท่าจะมีความเสี่ยงต่อการผลิตน้ำนมลดลง (Duffield, 2000)

เมื่อประเมินความชุกของโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการโดยพิจารณาค่าจุดตัดความเข้มข้นของ NEFA ($NEFA \geq 0.26$ mmol/L) ในพลาสมาของโครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอดจำนวน 102 ตัว ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอดที่มีระดับ NEFA ในพลาสมาสูงกว่าหรือเท่ากับ 0.26 mmol/L มีความชุกเท่ากับ 2.94% (3/102ตัว) ซึ่งโครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอดที่มีค่า NEFA ในพลาสมา ≥ 0.26 mmol/L ทั้ง 3 ตัวนี้ เป็นโครีดนมที่อยู่ในกลุ่มที่เกิดโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ (มีระดับ BHB ≥ 1.2 mmol/L) ส่วนโครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอดใน อีก 3 ตัวกลุ่มที่เกิดโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ มีค่า NEFA น้อยกว่า 0.26 mmol/L (0.02, 0.21 และ 0.23) การพิจารณาค่าจุดตัด $NEFA \geq 0.26$ mmol/L ในการบ่งชี้การเกิดโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการในโคนม มีความไว 82.54% และมีความจำเพาะ 91.89% (Asi et al., 2011) ระดับ NEFA ในพลาสมาของโคนมที่มีสมดุลพลังงานเป็นบวก (positive energy balance) คือโคนมที่มีระดับ NEFA ในพลาสมา มีค่าต่ำกว่า 0.2 mmol/L และถ้าโคนมมีระดับ NEFA มากกว่า 0.7 mmol/L ในระยะหลังคลอด จะบ่งชี้ภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบได้ (Adewuyi et al., 2005) การบ่งชี้ภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบ (negative energy balance) สามารถใช้ค่าจุดตัดของระดับ NEFA ในพลาสมา มากกว่า 0.57 mmol/L ($NEFA > 0.57$ mmol/L) (Ospina et al., 2013) การศึกษานี้ พบว่า โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด มีค่าเฉลี่ยของ NEFA เท่ากับ 0.07 mmol/L (0.07 ± 0.06 mmol/L) โดยมีค่าสูงสุด เท่ากับ 0.38 mmol/L บ่งชี้

ว่าโครีดนมหลังระยะ 5-60 วันหลังคลอด ในการศึกษานี้ไม่มีภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบจากการใช้จุดตัดค่า NEFA > 0.57 mmol/L ซึ่งภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบที่พบในฟาร์มโคนมประเทศไทยมักเกิดจากการจัดการด้านอาหารพลังงานในสัดส่วนที่ไม่เหมาะสมกับระดับการให้ผลผลิตของโครีดนม (Rukkamsuk, 2005)

มีการศึกษาระดับความเข้มข้นของ NEFA และ BHB ในพลาสมาโคนมในระดับฟาร์ม เพื่อใช้เป็นค่าจุดตัดในการทำนายการเกิดภาวะกระเพาะแพ้น้ำนม (displace abomasum) โรคคีโตซิส (ketosis) ภาวะมดลูกอักเสบ (metritis) และภาวะรกค้าง (retained placenta) โดยกำหนดเกณฑ์ระดับ NEFA ในโคนมหลังคลอด เท่ากับ 0.57 mmol/L และกำหนดเกณฑ์ระดับ BHB เท่ากับ 1.0 mmol/L ผลการศึกษาพบว่า โครีดนมระยะ 30 วันหลังคลอดที่มีค่า NEFA ≥ 0.57 mmol/L จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะกระเพาะแพ้น้ำนม โรคคีโตซิส ภาวะมดลูกอักเสบ และภาวะรกค้าง เท่ากับ 1.8 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับโครีดนมหลังคลอดที่มีค่า NEFA ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด และโคนมหลังคลอดที่มีค่า BHB ≥ 1.0 mmol/L จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรสดังกล่าว เท่ากับ 2.8 เท่า เมื่อเทียบกับโคนมที่มีค่า BHB ต่ำกว่าเกณฑ์ ซึ่งจากการศึกษานี้ พบว่า โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด จำนวน 102 ตัว มีระดับ NEFA ในการศึกษานี้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.07 mmol/L (0.07 ± 0.06 mmol/L) โดยมีค่าสูงสุด เท่ากับ 0.38 mmol/L ซึ่งมีค่า NEFA ต่ำกว่าเกณฑ์ (0.57 mmol/L) ทุกตัว ซึ่งบ่งชี้ถึงการไม่มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะกระเพาะแพ้น้ำนม โรคคีโตซิส ภาวะมดลูกอักเสบ และภาวะรกค้าง

การหาความสัมพันธ์ของระดับความเข้มข้นของ BHB และ NEFA ในตัวอย่างพลาสมาแม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอดจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ (ELISA) เปรียบเทียบกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS โดยการสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของ BHB และ NEFA ในพลาสมา โดยพิจารณาค่า R ที่มีค่าเข้าใกล้ 1 และค่า RMSECV ที่มีค่าน้อย ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางสถิติสร้างสมการทำนายความเข้มข้นของ BHB และ NEFA ในตัวอย่างพลาสมาแม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด พบว่า สเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี 2nd Derivative มีความเหมาะสมสำหรับการทำนายความเข้มข้นสาร BHB และ NEFA โดยสมการที่ใช้ทำนายความเข้มข้นสาร BHB และ NEFA ในพลาสมาแม่โครีดนมระยะ 5-60 วันหลังคลอด ที่วิเคราะห์จากเครื่อง FT-NIR และ DLP-NIR มีค่า R เท่ากับ 0.98 , 0.90 และ 0.98 , 0.84 ตามลำดับ และมีค่า RMSECV เท่ากับ 0.34 , 0.05 , 0.01 และ 0.04 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าสหสัมพันธ์ (R) ที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการทำนายความสัมพันธ์ของสมการที่สร้างขึ้น

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค NIRS กับวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่า ค่า R ของความเข้มข้นสาร BHB และ NEFA ในพลาสมาที่วิเคราะห์จากเครื่อง FT-NIR และ DLP-NIR (0.98 , 0.90 และ 0.98 , 0.84 ตามลำดับ) สามารถใช้เพื่อการคัดกรอง (screening) ใช้สร้างสมการทำนายค่า (calibration) และใช้เพื่อสร้างสมการทำนายค่าในการศึกษาวิจัยได้ (William, 2007)

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค FT-NIR กับ DLP-NIR ในการทำนายความเข้มข้นของ BHB และ NEFA ในศึกษานี้ พบว่า ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการใช้เทคนิค FT-NIR มีค่า R สูงกว่าและมีค่า RMSECV น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค DLP-NIR ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการใช้ FT-NIR ในการตรวจคัดกรองโรคคีโตซิสแบบไม่แสดงอาการ โดยการตรวจหาความเข้มข้นของ BHB ในน้ำนม ซึ่งมีความไวและความจำเพาะ เท่ากับ 70% และ 95% ตามลำดับ โดยจุดเด่นของเทคนิค FT-NIR ในการตรวจวินิจฉัยคือ สามารถตรวจได้รวดเร็ว ค่าตรวจไม่แพง และสามารถให้ตรวจตัวอย่างจำนวนมากได้ การใช้ FT-NIR ทำนายค่า BHB มีความถูกต้องเพียงพอและสามารถใช้เพื่อประเมินภาวะของโรคคีโตซิสในระดับฝูงได้ (De Roos et al., 2007) การศึกษาค้นคว้านี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Sukhontarad and Yawongsa (2020) ที่ศึกษาการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ BHB ในซีรัมโคนมด้วยวิธี NIRS โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.98 และมีค่าคลาดเคลื่อน 0.23 ซึ่งบ่งชี้ว่าสามารถนำสมการที่สร้างขึ้นไปใช้ในการทำนายค่า BHB ในซีรัมโคนมได้ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Denis-Robichaud et al. (2014) ที่พบความสัมพันธ์ของความเข้มข้น BHB ในน้ำนมเมื่อเปรียบเทียบกับระดับ BHB ในเลือดในโคนม ใช้เทคนิค FT-NIR โดยมีค่า R เท่ากับ 0.89 และสอดคล้องกับรายงานของ De Roos et al. (2007) ที่พบความสัมพันธ์ระหว่างผลลัพธ์ของวิธีการตรวจทางเคมีและค่าที่วิเคราะห์ผ่านเทคนิค FT-NIR สำหรับการตรวจวิเคราะห์ระดับสาร acetone และ BHB โดยมีค่า R เท่ากับ 0.80 มีความไว (sensitivity) $69-70\%$ และมีความจำเพาะ (specificity) 95% ซึ่งสมการที่สร้างขึ้นสามารถใช้ทำนายความเข้มข้นของสาร BHB ในนมได้ McParland and Berry (2016) ได้รายงานการใช้เทคนิค FT-NIR วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำนมโคนม เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการทำนายปริมาณสารอาหารในน้ำนม อัตราส่วนความเข้มข้นของโปรตีนและไขมันในน้ำนม และสถานะสมดุลพลังงานของโคนม ซึ่งผลการศึกษานี้ชี้ว่า เทคนิค FT-NIR สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้หรือตัวชี้วัดภาวะสมดุลพลังงานเป็นลบที่เกี่ยวข้องกับการได้รับสัดส่วนอาหารพลังงานที่ไม่เหมาะสมของโคนมหลังคลอดได้ โดยมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.78 นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เครื่อง FT-NIR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจ

การตั้งท้องในโคนม โดยการตรวจระดับไขมันและโปรตีนในน้ำนม เพื่อทำนายการตั้งท้องของโคนม ผลการศึกษาพบว่า การตรวจวิเคราะห์ระดับโปรตีนและไขมันในน้ำนมด้วยเทคนิค FT-NIR มีความสัมพันธ์กับสถานะการตั้งท้อง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.65 ทั้งนี้ ยังมีข้อจำกัดในแต่ละสายพันธุ์ที่มีคุณภาพน้ำนมที่แตกต่างกัน (Toledo-Alvarado et al., 2018)

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่ามีความสำคัญและมีความน่าเชื่อถือในระดับปานกลาง ซึ่งถือเป็นเครื่องมือที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยได้ โดยการศึกษาวิจัยต่อไปจะต้องทำความเข้าใจอย่างลึกซึ้งและต้องการการเก็บข้อมูลเพิ่มเติม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านอื่น ๆ เช่น การศึกษาเพื่อรายงานผลความน่าเชื่อถือของเครื่องมือ (Reliability) การศึกษาเพื่อทดสอบเพื่อการวินิจฉัยโรค (Diagnostic test) เพื่อแสดงค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) เพื่อให้เกิดความแม่นยำเทียบเท่ากับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพิ่มความถูกต้องและแม่นยำของการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการทำนายค่าเคมีต่างๆ ในเลือดและค่าดัชนีการผลิตโคนมด้านต่างๆ และเพื่อสามารถพัฒนาอุปกรณ์การตรวจวิเคราะห์ที่เกษตรกรสามารถใช้ได้ด้วยตัวเองต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าของฟาร์มโคนมพื้นที่อำเภอสรีราตุและอำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้ใช้สถานที่ในการเก็บตัวอย่างเลือดและสัตว์ทดลองสำหรับเจาะเก็บเลือด และให้ข้อมูลทางด้านวิชาการประกอบการวิจัย รวมทั้งผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาแนะนำใช้ในงานวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คณะจารย์รวมทั้งเจ้าหน้าที่และนักศึกษาสาขาวิศวกรรมหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูป คณะวิศวกรรมศาสตร์และสถาปัตยกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์และคำแนะนำในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างส่งตรวจด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในการให้ความอนุเคราะห์วิเคราะห์ตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนงบประมาณสนับสนุนจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2561

เอกสารอ้างอิง

Adewuyi AA, Gruys E, Van Eerdenburg FJCM, 2005. Non esterified-fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review, Vet Q 27(3),

117-126.

Andersson L, 1988. Subclinical ketosis in dairy cows. Vet Clin North Am Food Anim Pract 4(2), 233-51.

Asl AN, Nazifi S, Ghasrodashti AR, Olyaei A, 2011. Prevalence of subclinical ketosis in dairy cattle in the Southwestern Iran and detection of cutoff point for NEFA and glucose concentrations for diagnosis of subclinical ketosis. Prev Vet Med 100(1), 38-43.

Baird GD, 1982. Primary ketosis in the high-producing dairy cow: clinical and subclinical disorders, treatment, prevention, and outlook. J Dairy Sci 65(1), 1-10.

Brunner N, Groeger S, Raposo J C, Bruckmaier R M, Gross J J, 2019. Prevalence of subclinical ketosis and production diseases in dairy cows in Central and South America, Africa, Asia, Australia, New Zealand, and Eastern Europe. Transl. Anim. Sci 3, 19-27.

Denis-Robichaud J, Dubuc J, Lefebvre, DesCôteaux L, 2014. Accuracy of milk ketone bodies from flow-injection analysis for the diagnosis of hyperketonemia in dairy. J Dairy Sci 97, 3364-3370.

De Roos A.P, van den Bijgaart J, Horlyk G, De Jong, 2007. Screening for subclinical ketosis in dairy cattle by Fourier transform infrared spectrometry. J Dairy Sci 90, 1761-1766.

Dervishi E, Plastow G, Hoff B, Colazo M, 2021. Common and specific mineral and metabolic features in dairy cows with clinical metritis, hypocalcaemia or ketosis. Res Vet Sci 135, 335-342

Dohoo I, Martin W, Stryhn, H. (2010) Veterinary Epidemiologic Research. VER Inc., Charlottetown.

Dohoo IR, Martin SW, 1984. Subclinical Ketosis: Prevalence and Associations with Production and Disease. Can J Comp Med 48, 1-5.

Duffield T, 2000. Subclinical Ketosis in Lactating Dairy Cattle. North Am Food Anim Pract 16(2), 231-253.

Duffield T, Bagg R, 2002. Herd level indicators for the prediction of high-risk dairy herds for subclinical ketosis. In: Proceeding of American Association of Bovine Practitioner, Rome, GA. 175-176

Duffield TF, Lissemore KD, McBride BW, Leslie KE, 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. J Dairy Sci 92(2), 571-580.

Enjalbert F, Nicot MC, Bayourthe C, Moncoulon R, 2001. Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. J. Dairy Sci 84, 583-589.

Gohary K, Overton MW, Von Massow M, LeBlanc SJ, Lissemore KD, Duffield TF, 2016. The cost of a case of subclinical

- ketosis in Canadian dairy herds. *Can Vet J* 57(7), 728-32.
- Gordon JL, Leblanc SJ, Duffield TF, 2013. Ketosis treatment in lactating dairy cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 29(2), 433-45.
- Herdth TH, 1997. Gastrointestinal physiology and metabolism. Textbook of Veterinary Physiology, 2nd edition. Edited by J. G. Cunningham. WB Sanders Company 1997, 263-380.
- Herdth TH, 2000. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *North Am Food Anim Pract* 16, 215-230.
- Jenkins NT, Peña G, Risco C, Barbosa C, Vieira-Neto, A, Galvão KN, 2015. Utility of inline milk fat and protein ratio to diagnose subclinical ketosis and to assign propylene glycol treatment in lactating dairy cows. *Can Vet J* 56(8), 850-854.
- Jorjong S, van Kneegsel ATM, Verwaeren J, Val Lahoz M, Bruckmaier RM, De Baets B, Kemp B, Fievez V, 2014. Milk fatty acids as possible biomarkers to early diagnose elevated concentrations of blood plasma nonesterified fatty acids in dairy cows. *J Dairy Sci* 97(11), 7054-7064.
- LeBlanc S, 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J Reprod Dev* 56, 29-35.
- Li Y, Ding H, Liu L, Song Y, Du X, Feng S, Wang X, Li X, Wang Z, Li X, Li J, Wu J, Liu G, 2020. Non-esterified Fatty Acid Induce Dairy Cow Hepatocytes Apoptosis via the Mitochondria-Mediated ROS-JNK/ERK Signaling Pathway. *Front Cell Dev Biol* 28(8), 245.
- Liu L, Shen T, Yang W, Yu H, Gao S, Huang B, Xu C, 2020. Ketotic cows display a different serum nonesterified fatty acid composition. *J Dairy Res* 87(1), 52-55.
- Macmillan K, López Helguera I, Behrouzi A, Gobikrushanth M, Hoff B, Colazo MG, 2017. Accuracy of a cow-side test for the diagnosis of hyperketonemia and hypoglycemia in lactating dairy cows. *Res Vet Sci* 115, 327-331.
- Mahrt A, Burfeind O, Heuwieser W, 2015. Evaluation of hyperketonemia risk period and screening protocols for early-lactation dairy cows. *J Dairy Sci* 8(5), 3110-3119.
- McParland S, Berry DP, 2016. The potential of Fourier transform infrared spectroscopy of milk samples to predict energy intake and efficiency in dairy cows. *J Dairy Sci* 99(5), 4056-4070.
- Oetzel GR, 2004. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 20, 651-674.
- Ospina P, Nydam D, Stokol T, Overton T, 2010. Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *J Dairy Sci* 93, 1596-1603.
- Ospina P, Jessica M, Overton T, Stokol T, Nydam D, 2013. Using Nonesterified Fatty Acids and β -Hydroxybutyrate Concentrations During the Transition Period for Herd-Level Monitoring of Increased Risk of Disease and Decreased Reproductive and Milking Performance. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 29, 387-412.
- Promkot C, Mansathit J, Wanapat M, 2021. Metabolic Disorders of Transitional Low Production Dairy Cow. *J. Agric. Sci. Technol* 1(8), 1221-1223.
- Ren Z, Wang Y, Liu H, Zhou Z, Cai D, Hu Y, Zong X, Cao S, 2020. Characterization of serum adiponectin and leptin in healthy perinatal dairy cows or cows with ketosis, and their effect on ketosis involved indices. *Pol J Vet Sci* 23(3), 373-381.
- Rukkamsuk T, Kruip TA, Wensing T, 1999. Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet. Q*, 21, 71-77.
- Rukkamsuk T, 2005. Research for improving nutrition and health of dairy cow: in medium scale dairy farm, in: Proceedings of AHAT/BSAS International Conference: Integrating Livestock-Crop Systems to Meet the Challenges of Globalisation, Nov. 14-18, Khon Kaen, Thailand, 3, 96-99.
- Rutherford AJ, Oikonomou G, Smith RF, 2016. The effect of subclinical ketosis on activity at estrus and reproductive performance in dairy cattle. *J Dairy Sci* 99(6), 4808-4815.
- Simasatitkul N, Supaluckbunlue R, 1998. Ketonuria in Dairy Cows and Correlation between Ketonuria Level and Milk Production, *KKU. Vet. J* 8(1-2), 19-27.
- Sukhontarad P, Yawongsa A, 2020. The Measurement of Serum Beta-hydroxybutyrate Concentrations in Dairy Cows by Near Infrared Spectroscopy. *J. Kasetsart Vet* 30(2): 61-78.
- Tveit B, Lingaas F, Svendsen M, Sjaastad OV, 1992. Etiology of acetonemia in Norwegian cattle. Effect of ketogenic silage, season, energy level, and genetic factors. *J Dairy Sci* 75(9), 2421-2432.
- Suthar VS, Canelas-Raposo J, Deniz A, Heiwieser W, 2013. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *J Dairy Sci* 96, 2925-2938.
- Toledo-Alvarado H, Vazquez AI, de Los Campos G, Tempelman RJ, Bittante G, Cecchinato A, 2018. Diagnosing pregnancy status using infrared spectra and milk composition in dairy cows. *J Dairy Sci* 101(3), 2496-2505.
- Van Kneegsel ATM, van der Drift SGA, Horneman M, de Roos APW, Kemp B, Graat EAM, 2010. Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy.

copy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *J Dairy Sci* 93, 3065-3069.

Voyvoda H, Erdogan H, 2010. Use of a hand-held meter for detecting subclinical ketosis in dairy cows. *Res Vet Sci* 89(3), 344-51.

Williams, P, 2007. Near-infrared technology getting the best out of light. PDK Grafin, Canada. Blackwell Pub.

Wang H, Gao Y, Xia C, Zhang H, Qian W, Cao Y, 2016. Pathway analysis of plasma different metabolites for dairy cow ketosis, *Ital. J. Anim. Sci*, 15(3), 545-551.

Wu ZL, Chen SY, Hu S, Jia X, Wang J, Lai SJ, 2020. Metabolomic and Proteomic Profiles Associated With Ketosis in Dairy Cows. *Front Genet* 16(11), 551-587.

Xu S, Wu Z, Zou Y, Li S, Cao Z, 2017. Evaluation of a Hand-Held Meter to Detect Subclinical Ketosis in Dairy Cows. *J Adv Dairy Res* 5(2), 173-178.

Yawongsa A, Sukhontarad P, 2018. Preliminary study on measurement of blood chemistry concentrations in dairy cows serum by near infrared spectroscopy. *J Kasetsart Vet* 28, 69-87.

Zakian A, Tehrani-Sharif M, Mokhber-Dezfouli MR, Nouri M, Constable PD, 2017. Evaluation of a point-of-care electrochemical meter to detect subclinical ketosis and hypoglycaemia in lactating dairy cows. *Aust Vet J* 95(4), 123-128.

Zhang H, Wu L, Xu C, 2013. Plasma metabolomic profiling of dairy cows affected with ketosis using gas chromatography/mass spectrometry. *BMC Vet Res* 9, 186.