

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย



1. รูปแบบการวิจัย

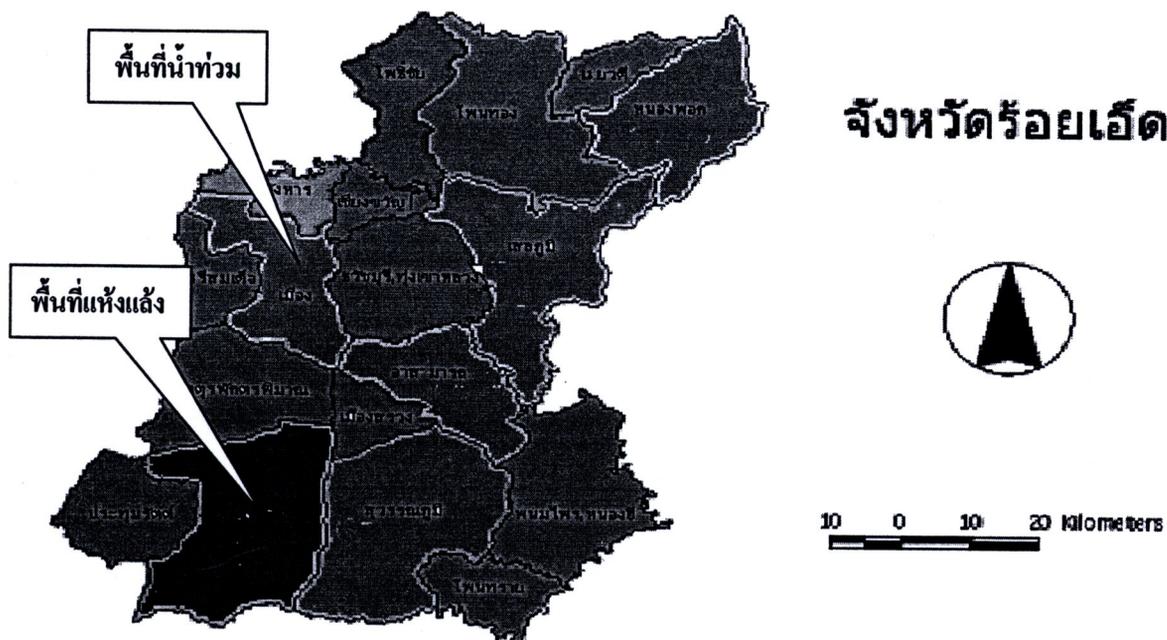
เป็นการศึกษาวิจัยแบบ Cross – sectional study โดยการสำรวจความชุกของโรคเลปโตสไปโรซิส ในโค-กระบือ ในพื้นที่ที่มีน้ำท่วมขังเกิน 4 เดือน ในอำเภอจันทาร และพื้นที่ดอนแห้งแล้ง คือ อำเภอเกษตรวิสัย จังหวัดร้อยเอ็ด และ คูบ่จชัย ต่างๆ ที่ทำให้เกิดโรคเลปโตสไปโรซิส เช่น พื้นที่น้ำท่วม ความหนาแน่นของประชากรสัตว์ ความสะอาด การมีความรู้ของเกษตรกรที่มีต่อโรคเลปโตสไปโรซิส

2. ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ คือ โค-กระบือ ในพื้นที่ หมู่ 6, 8 และ 12 ตำบลคินคำ อำเภอจันทาร ซึ่งเป็นพื้นที่น้ำท่วมขัง มีแม่น้ำชีไหลผ่าน และประชากรโค-กระบือ ในพื้นที่ หมู่ 5 ,6 และ 7 ตำบลเกษตรวิสัย อำเภอเกษตรวิสัย จังหวัดร้อยเอ็ด จำนวน 342 ตัวอย่าง

2.1 โค-กระบือ ในพื้นที่หมู่ 6, 8 และ 12 ตำบลคินคำ อำเภอจันทาร จังหวัดร้อยเอ็ด โดยวิธีสุ่มตัวอย่างแบบง่าย (Random sampling) และจากการคำนวณกลุ่มตัวอย่างโค จำนวน 116 ตัวอย่าง กระบือ จำนวน 55 ตัวอย่าง รวม จำนวน 171 ตัว

2.2 โค-กระบือ ในพื้นที่ หมู่ 5, 6 และ 7 ตำบลเกษตรวิสัย อำเภอเกษตรวิสัย จังหวัดร้อยเอ็ด โดยสุ่มตัวอย่างแบบง่าย (Random sampling) และจากการสุ่มตัวอย่าง โค จำนวน 116 ตัวอย่าง กระบือ จำนวน 55 ตัวอย่าง รวม จำนวน 171 ตัว



ภาพที่ 1 แผนที่จังหวัดร้อยเอ็ด

ตารางที่ 3 ข้อมูลเปรียบเทียบพื้นที่น้ำท่วม

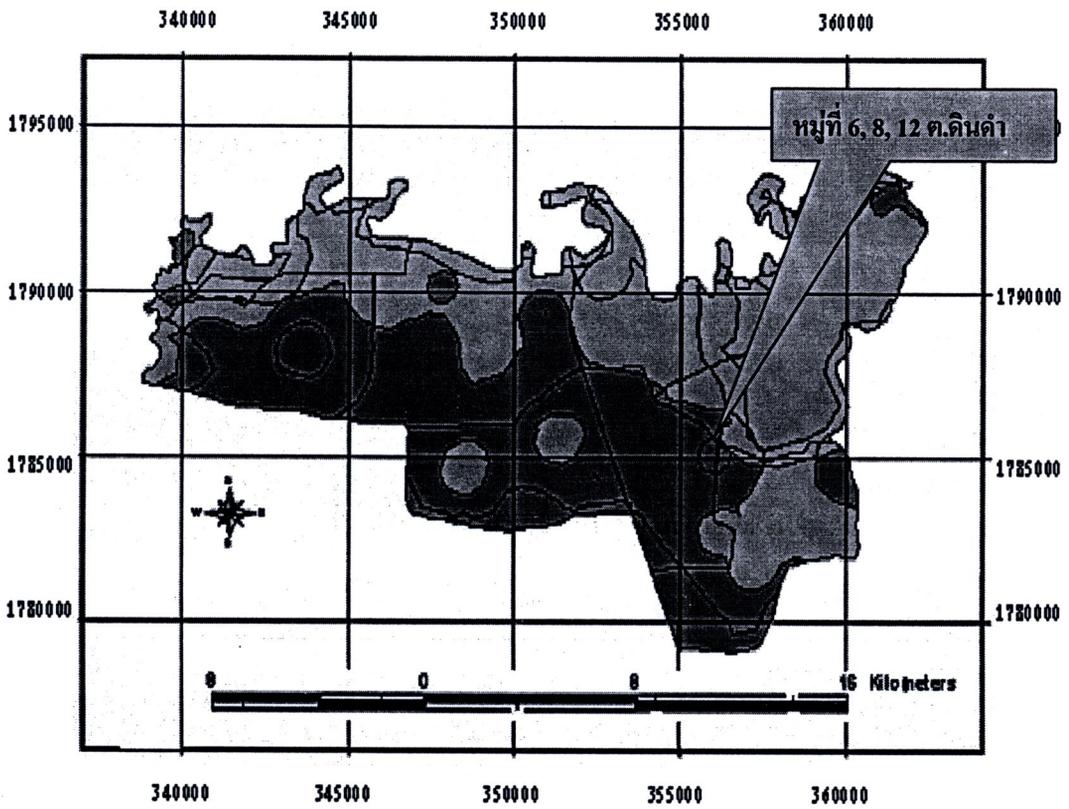
อำเภอ	พื้นที่ทั้งหมด	พื้นที่น้ำท่วม	ร้อยละ*	ร้อยละ **
เกษตรวิสัย	848,055,783	89,174,187	10.52	1.07
จังหวัด	183,205,863	99,748,127	54.45	1.19

ร้อยละ * ร้อยละของพื้นที่อำเภอ

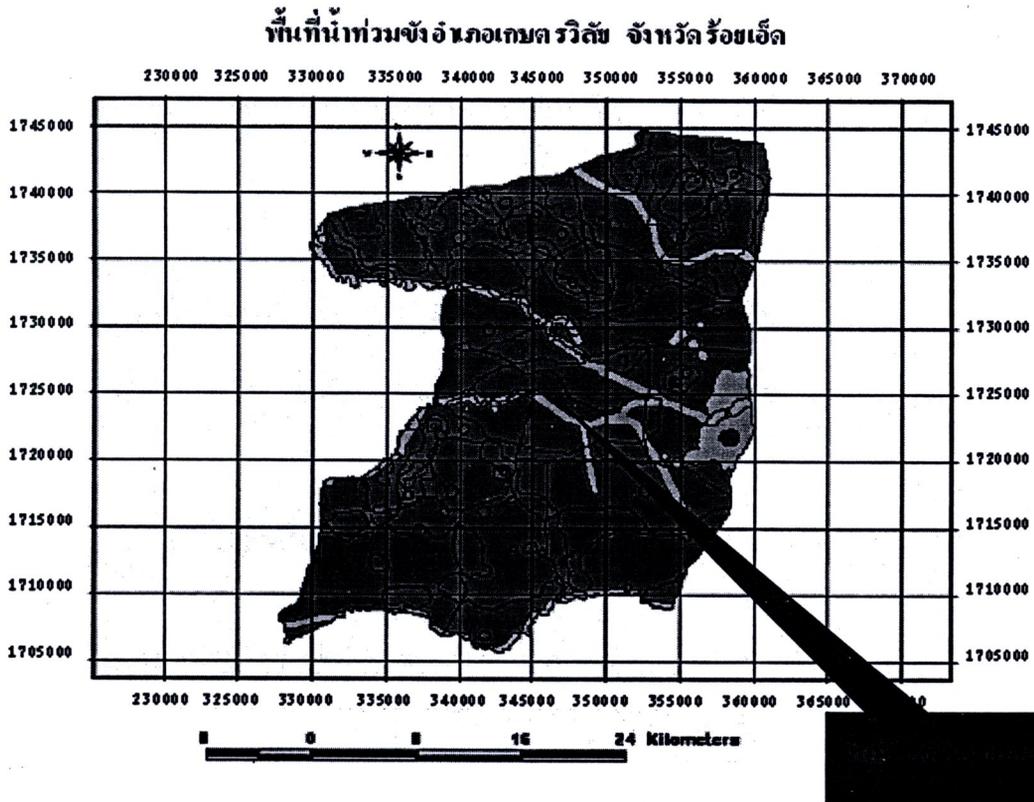
ร้อยละ ** ร้อยละของพื้นที่จังหวัด

ข้อมูลเปรียบเทียบพื้นที่ราบลุ่มน้ำท่วมในฤดูน้ำหลาก (มิถุนายน - พฤศจิกายน) ของพื้นที่อำเภอจังหวัดร้อยเอ็ด พบว่า อำเภอจังหวัดร้อยเอ็ด เป็นอำเภอขนาดเล็ก ภูมิประเทศมีแม่น้ำไหลผ่าน เกิดเป็นที่ราบลุ่มแม่น้ำและมีน้ำหลาก น้ำล้นตลิ่งในฤดูฝน จึงมีพื้นที่ราบลุ่มน้ำท่วมถึงบริเวณกว้าง ร้อยละ 54.45 ของพื้นที่ทั้งอำเภอ อำเภอเกษตรวิสัย เป็นอำเภอขนาดใหญ่ ภูมิประเทศส่วนใหญ่เป็นทุ่งกว้าง (ทุ่งกุลาร้องไห้) ไม่มีที่ราบลุ่มแม่น้ำมากนัก แต่เป็นน้ำท่วมขังในฤดูฝนตามท้องทุ่ง มีพื้นที่น้ำท่วมร้อยละ 10.52 ของพื้นที่อำเภอ

พื้นที่น้ำท่วมขังอำเภอจันทหาร จังหวัดร้อยเอ็ด



ภาพที่ 2 แผนที่พื้นที่น้ำท่วมขังอำเภอจันทหาร: สีเหลืองแสดงพื้นที่น้ำท่วมขัง (สาคร ส่งเสริม, 2551)



ภาพที่ 3 แผนที่พื้นที่น้ำท่วมซ้ำอำเภอเกษตรวิสัย (สาคร ส่งเสริม, 2551)

3. การคำนวณขนาดตัวอย่าง

สูตรที่ใช้ในการคำนวณขนาดตัวอย่าง

$$n = 4pQ / L^2$$

เมื่อ n = ขนาดตัวอย่าง

P = ความชุกของโรค (29.8) โดยอ้างอิงจากการสำรวจความชุก

โรคเลปโตสไปโรซิสในช่วงปี 2540 – 2541 ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

$$Q = 100 - p$$

L = ค่าที่ยอมให้คาดเคลื่อนได้ (5)

การคำนวณประชากรกลุ่มตัวอย่างโค-กระบือ ในพื้นที่ หมู่ 6, 8 และ 12 ตำบลดินคำ อำเภอจังหาร และประชากรกลุ่มตัวอย่างโค กระบือ ในพื้นที่ หมู่ 5, 6 และ 7 ตำบลเกษตรวิสัย อำเภอเกษตรวิสัย :

$$n = 4 \times 29.8 (100 - 29.8) / 5^2$$

$$n = 334.71 = 335 \text{ ตัวอย่าง}$$

4. ตัวแปรที่ทำการวิจัย

4.1 ตัวแปรต้น โค-กระบือ ที่อยู่ในพื้นที่น้ำท่วมขัง และพื้นที่ดอนแห้งแล้ง

4.2 ตัวแปรตาม ภูมิคุ้มกันต่อโรคเลปโตสไปโรซิส ชนิด Serovar ที่พบในโค-กระบือ

5. การเก็บรวบรวมข้อมูล

5.1 เครื่องที่ใช้ในการวิจัย แบบสัมภาษณ์เจ้าของและคนเลี้ยงสัตว์ ประกอบด้วยข้อมูลเกี่ยวกับเจ้าของสัตว์

- 1) ชื่อ - สกุล เจ้าของสัตว์
- 2) เพศ
- 3) ประวัติการเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส
- 4) การมีความรู้เรื่องโรคเลปโตสไปโรซิส

5.2 ข้อมูลเกี่ยวกับสัตว์เลี้ยง

- 1) ชนิดและจำนวนสัตว์
- 2) อายุของสัตว์
- 3) ที่มาของสัตว์
- 4) การได้รับวัคซีนของสัตว์
- 5) ผลการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา
- 6) การสัมผัสโรค

5.3 ข้อมูลด้านสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวกับสัตว์เลี้ยง

- 1) ลักษณะของพื้นที่คอก
- 2) การระบายน้ำในคอก
- 3) แสงแดด
- 4) การระบายน้ำของพื้นรอบๆ คอก
- 5) ลักษณะพื้นที่ออกหากิน
- 6) การเลี้ยงสัตว์อื่นรวมอยู่ด้วย

5.4 ข้อมูลเกี่ยวกับหมู่บ้าน/ชุมชน

- 1) ลักษณะที่ตั้งหมู่บ้าน
- 2) สภาพสิ่งแวดล้อมภายในหมู่บ้าน
- 3) แหล่งน้ำสาธารณะ
- 4) ประวัติการเกิดโรคเลปโตสไปโรซิสในหมู่บ้าน

- 5) การมีปัญหาน้ำเสียในหมู่บ้าน
- 6) การเก็บขยะมูลฝอยในหมู่บ้าน

6. ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ

6.1 การตรวจภูมิคุ้มกันโรคเลปโตสไปโรซิสในซีรัมด้วยวิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) ตามวิธีของ ดวงใจ สุวรรณเจริญ และคณะ (2545)

6.2 ขั้นตอนในการวิจัย

1) ประสานงานกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ สำนักงานปศุสัตว์อำเภอจันทราบึง อำเภอกะเปอร์ จังหวัดร้อยเอ็ด ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง จังหวัดสุรินทร์

2) ทำการประชุมในหมู่บ้านที่ทำการวิจัย คือ หมู่ 5, 6 และ 7 ตำบลกะเปอร์ อำเภอกะเปอร์ และ หมู่ 6, 8 และ 12 ตำบลคินคำ อำเภอจันทราบึง จังหวัดร้อยเอ็ด พร้อมทั้งมีการสำรวจสัตว์ที่มีอยู่จริงในพื้นที่

3) กำหนดวัน เวลา ในการเก็บตัวอย่าง และข้อมูลงานวิจัย

4) สุ่มตัวอย่างโค กระบือ ในหมู่ 5, 6 และ 7 ตำบลกะเปอร์ อำเภอกะเปอร์ และ โค-กระบือในหมู่ 6, 8 และ 12 ตำบลคินคำ อำเภอจันทราบึง โดยวิธีการสุ่มแบบง่าย โดยการจับฉลากจากบ้านเลขที่ที่เกษตรกรมีการเลี้ยงโค-กระบือ โดยใช้ตัวอย่างคอกละ 1 ตัว โดยผู้วิจัยใช้ตัวอย่างเฉพาะโค-กระบือที่อยู่ในพื้นที่ในส่วนของโค-กระบือที่เคลื่อนย้ายเข้ามาใหม่ทางผู้ทำการวิจัยจะไม่นำมารวมด้วยพร้อมนี้โค-กระบือที่อยู่ระหว่างการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะจะไม่นำมาวิจัยในครั้งนี้ด้วย หลังจากนั้นทำการเก็บรวบรวมข้อมูล เจาะเลือด โค-กระบือ กลุ่มตัวอย่าง แล้วแยกซีรัมใส่หลอดเก็บซีรัม ตีฉลากรายละเอียด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วทำการสัมภาษณ์เจ้าของสัตว์ ตรวจวิเคราะห์หาภูมิคุ้มกันโรคเลปโตสไปโรซิสจากตัวอย่างซีรัม ด้วยวิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดสุรินทร์ ภายใน 1 สัปดาห์ ประมวลผล วิเคราะห์ผล และสรุปผลการวิจัย

6.3 วิธีการตรวจ Microscopic Agglutination Test (MAT)

เป็นวิธีการตรวจทางซีรัมวิทยา โดยใช้เชื้อเลปโตสไปราเป็นแอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ เชื้อเลปโตสไปราในซีรัมของสัตว์ ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นมืด ผลบวกจะเกิดการจับกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรา มีลักษณะเป็น lysis ball, star

ซีโรวาร์ที่ใช้ในการทดสอบคือ

1. australis	9. grippotyphosa	17. pomona
2. autumnalis	10. hebdomadis	18. pyrogenes
3. ballum	11. icterohaemorrhagiae	19. ranarum
4. bataviae	12. javanica	20. sarmin
5. canicola	13. louisiana	21. sejroe
6. celledoni	14. manhao	22. shermani
7. cynopteri	15. mini	23. tarassovi
8. djasiman	16. panama	24. patoc

7. วิธีการตรวจ

7.1 Screening test

- 1) เจือจางตัวอย่างซีรัมให้เป็น 1:50 ด้วย Phosphate buffered saline
- 2) ใส่ซีรัมที่เจือจางแล้วใน microtiter plate โดยใส่ 25 μ l ต่อหลุม
- 3) เติมแอนติเจนซึ่งเป็นเชื้อเลปโตสไปร่าชนิดต่างๆ 24 ชนิด โดยใส่ 25 μ l ต่อหลุม
- 4) นำมาเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 90 นาที
- 5) ตรวจสอบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเชื้อในแต่ละหลุมด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นมีด
- 6) นำตัวอย่างซีรัมที่มีปฏิกิริยาเกาะกลุ่มตั้งแต่ 50% ขึ้นไป (โดยการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อเลปโตสไปร่าที่เกาะกลุ่มกับเชื้อที่เป็นอิสระ) ไปทดสอบหาค่าไตเตอร์ต่อเชื้อ เลปโตสไปร่าชนิดนั้น (Titer test)

7.2 Titer test

- 1) เจือจางแอนติซีรัมให้เป็น 1: 50, 1:100, 1:200 จนถึง 1:6400
- 2) เติม 25 μ l แอนติเจนซึ่งเป็นเชื้อเลปโตสไปร่า ชนิดที่ให้ปฏิกิริยาเกาะกลุ่มในการทดสอบ screening test
- 3) นำมาเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 90 นาที
- 4) ตรวจสอบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นมีด

8. การอ่านผล

การอ่านปฏิริยาการเกาะกลุ่มตกตะกอนตั้งแต่ 50% ขึ้นไป (โดยการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อเลปโตสไปราที่เกาะกลุ่มกับเชื้อที่เป็นอิสระ) ชีร์ม์เจ็องสูงสุดที่ให้ปฏิริยา การเกาะกลุ่มตกตะกอนถือเป็นค่า end point

การแปลผลทางชีร์ม์วิทยา

การตัดสินใจผลว่า Positive ทางชีร์ม์วิทยา บ่งบอกถึงการได้สัมผัสเชื้อ แต่จะบอกว่ากำลังเกิดปัญหาของโรคหรือไม่นั้น

8.1 ต้องทำการเจาะเลือดส่งตรวจ 2 ครั้ง (Paired serum) ห่างกันประมาณ 1-2 สัปดาห์ ถ้าระดับแอนติบอดีต่อโรคสูงขึ้น 4 เท่า แสดงว่า สัตว์กำลังมีอาการป่วยพร้อมที่จะมีการระบาดของเชื้อเลปโตสไปรา

8.2 กรณีฝูงสัตว์ที่มีปัญหาให้เก็บปัสสาวะ หรือซากที่แห้งมาตรวจ โดยการเพาะแยกเชื้อ ถ้าพบเชื้อแสดงว่าสัตว์อยู่ในระยะที่สามารถแพร่เชื้อติดต่อกับสัตว์อื่นได้

9. การวิเคราะห์ข้อมูล

9.1 สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistic) เพื่อศึกษาลักษณะของข้อมูลโดยใช้สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ความถี่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ในแบบสัมภาษณ์ส่วนที่ 1 และ 2)

9.2 สถิติเชิงวิเคราะห์ (Analytical statistics) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ กับการตรวจพบภูมิคุ้มกันโรคเลปโตสไปโรซิส โดยการสัมภาษณ์เกษตรกรเจ้าของสัตว์ ซึ่งเป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ เช่น ชนิดสัตว์ อายุของสัตว์ ความหนาแน่นของสัตว์ การสุขาภิบาลในคอกสัตว์ การมีความรู้ของเจ้าของสัตว์ต่อโรคเลปโตสไปโรซิส ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น ลักษณะพื้นที่น้ำท่วมขัง พื้นที่ดอนแห้งแล้ง กับภูมิคุ้มกันโรคเลปโตสไปโรซิส (ในแบบสัมภาษณ์ส่วนที่ 3 และ 4)

9.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ของแต่ละปัจจัยกับภูมิคุ้มกันโรคเลปโตสไปโรซิส คำนวณระดับความสัมพันธ์โดยใช้ Odd Ratio (OR.) ช่วงเชื่อมั่น (95 % CI ของ Odd Ratio) และทดสอบความสัมพันธ์โดยใช้ไค-สแควร์ (χ^2 - test) จากโปรแกรม SPSS (ในแบบสัมภาษณ์ส่วนที่ 3 และ 4)

9.4 ทำการเปรียบเทียบการตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราในโค-กระบือ ระหว่าง พื้นที่น้ำท่วมขัง และ พื้นที่ดอนแห้งแล้ง โดยสถิติที่ใช้คือ ไค - สแควร์ (χ^2 - test)