

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเลี้ยงยุงลาย *Ae. aegypti* ทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์ โดยนำไข่ของยุงสองสายพันธุ์มาจากภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ทำการเลี้ยงยุงทั้งสองสายพันธุ์มาโดยตลอด มาทำการแบ่งเลี้ยงแต่ละสายพันธุ์ตามวิธีของ Limsuwan (1987) มีรายละเอียดดังนี้

ไข่ (eggs)

1. นำถ้วยวางไข่ใส่สำลีเป็นก้อน ใช้กระดาษกรองเป็นวงกลมวางด้านบน
2. ใส่น้ำที่ปราศจากคลอรีนลงในถ้วยวางไข่ ประมาณครึ่งถ้วย
3. ใส่ถ้วยวางไข่ไว้ในกรงยุงตัวเมียที่กินเลือดอิ่มแล้ว ซึ่งจะวางไข่ในวันที่ 3-4 หลังจากกินเลือด
4. ย้ายถ้วยออกจากกรงแล้วเทน้ำที่เหลือออกไป
5. ทิ้งกระดาษกรองที่มีไข่ไว้ในถ้วย 24 ชม.
6. นำกระดาษกรองออกจากถ้วยแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
7. เก็บไข่บนกระดาษกรองไว้ในภาดพลาสติก
8. เมื่อต้องการให้ไข่ฟักเป็นตัวลูกน้ำ ให้นำกระดาษกรองที่มีไข่ยุงใส่ลงในภาดที่มีน้ำปราศจากคลอรีน ไข่ฟักภายใน 2-6 ชม.

ลูกน้ำ (larvae)

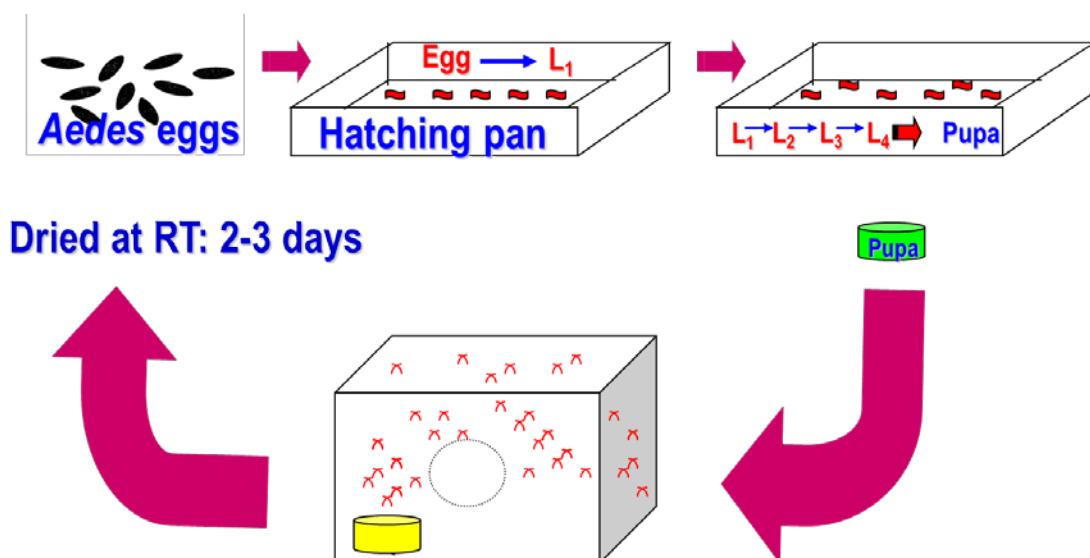
1. ใส่น้ำ 2 ลิตรลงในภาดเลี้ยงลูกน้ำ
2. ใส่ลูกน้ำเกิดใหม่ 400-500 ตัวลงในภาด
3. ให้อาหารลูกน้ำ ในวันแรกที่ลูกน้ำฟักเป็นตัว
4. ให้อาหารลูกน้ำทุกวัน
5. ปาดฝ้าบนผิวน้ำทิ้งโดยใช้กระดาษฟางทุกวัน ก่อนให้อาหาร
6. เปลี่ยนน้ำ 2-3 ครั้ง/สัปดาห์

ตัวโม่ง (pupae)

1. เก็บตัวโม่งจากภาดเลี้ยงลูกน้ำ ใส่ไว้ในถ้วยพลาสติก ที่มีน้ำปราศจากคลอรีน
2. ใส่ถ้วยที่มีตัวโม่งประมาณ 400 ตัวในกรงยุง โดยจะกลายเป็นตัวยุงภายใน 2 วัน
3. นำถ้วยออกเมื่อตัวโม่งกลายเป็นยุงหมดแล้ว

ตัวเต็มวัย (Adults)

1. เลี้ยงตัวยุงด้วยสารละลายน้ำตาล 10% และน้ำวิตามินรวม 5% ซุปด้วยสำลีจนชุ่ม
2. เปลี่ยนสำลีและสารละลายน้ำตาลทุกวัน
3. ให้ยุงตัวเมียกินเลือดหนูแฮมเตอร์เป็นเหยื่อใส่ไว้ในกรงยุง
4. ใส่ถ้วยสำหรับวางไข่ในกรงยุง และเก็บไข่ได้ภายใน 3-4 วัน หลังจากยุงกินเลือดอิ่มแล้ว



รูปที่ 3.1 วิธีการเลี้ยงยุงทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์

การเตรียมสารไล่ยุงมาตรฐาน

การเตรียมสาร: นำสารไล่ยุงเคมีสังเคราะห์มาตรฐาน DEET หรือ N,N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET, Sigma-Aldrich, United States) มาเตรียมเป็นสารละลายในความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้น 10%, 15%, 20%, 25%, 50% และ 95% ในตัวทำละลาย Absolute ethanol, Sigma-Aldrich, United States) จากนั้นนำไปใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์ไล่ยุง

ตารางที่ 3.1 แสดงผลิตภัณฑ์ไล่ยุงในท้องตลาดที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ลำดับ	ชื่อผลิตภัณฑ์และสารสำคัญ	ชนิด	เวลาตามฉลาก
1	Soffell กลิ่น ฟลอรา, Deet 12%	สเปรย์	7 ชั่วโมง
2	Soffell กลิ่น เฟรช, Deet 12%	สเปรย์	7 ชั่วโมง
3	Sketolene กลิ่น ตะไคร้, Eucalyptus Citriodora Oil 15%	สเปรย์	7 ชั่วโมง
4	Sketolene กลิ่น ซิลด์, Deet 20%	สเปรย์	7 ชั่วโมง
5	รีเฟลลิน สเปรย์, Eucalyptus Citriodora Oil 10%	สเปรย์	7 ชั่วโมง
6	รีเฟลลิน สเปรย์สูตรเย็น, Eucalyptus Citriodora Oil 10%	สเปรย์	7 ชั่วโมง
7	จิงโก้-เอ็กซ์ 95, Deet 95%	สเปรย์	7 ชั่วโมง
8	จิงโก้-เอ็กซ์ 30, Deet 30%	สเปรย์	7 ชั่วโมง

ลำดับ	ชื่อผลิตภัณฑ์และสารสำคัญ	ชนิด	เวลาตามฉลาก
9	Mixz, Eucalytus Citrodora Oil 10%	สเปรย์	7 ชั่วโมง
10	Natural mosquito, Citronella, Eucalyptus, Geranium oils	สเปรย์	6 ชั่วโมง
11	Herb Friends, Citronella Grass Extract, Camphor, Ethyl alcohol	สเปรย์	-
12	อินเซค บล็อก 55, Deet 55%	สเปรย์	7 ชั่วโมง
13	อินเซค บล็อก 95, Deet 95%	สเปรย์	7 ชั่วโมง
14	สเปรย์ตะไคร้หอมกันยุง, Citronella Grass Oil 20%	สเปรย์	4 ชั่วโมง
15	ใจโก้, Deet 24%	โลชั่น	7 ชั่วโมง
16	Sketolene สูตรเย็น, Deet 12%	โลชั่น	7 ชั่วโมง
17	Sketolene สูตรเซนซิทีฟ, Deet 12%	โลชั่น	7 ชั่วโมง
18	Sketolene สูตรโซซอพท์, Deet 12%	โลชั่น	7 ชั่วโมง
19	กย 15 กลิ่นเฟรช บลอสซัม, Deet 15%	โลชั่น	7 ชั่วโมง
20	กย 15 กลิ่นลาเวนเดอร์, Deet 15%	โลชั่น	7 ชั่วโมง
21	กย 15 กลิ่นมายด์ ลิลลี่, Deet 15%	โลชั่น	7 ชั่วโมง
22	ภูมิดิน โลชั่นน้ำมันมะพร้าวตะไคร้หอม, น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์, น้ำมันตะไคร้หอม	โลชั่น	4-5 ชั่วโมง
23	รีเฟลลีน สูตรเย็น, Eucalyptus Citriodora Oil 10%	โลชั่น	7 ชั่วโมง
24	Anti-mosquito, Nature99, Ethyl Alcohol, Finsolv TN	โลชั่น	-
25	มิสทีน เอสเคป, Deet 12.5%	โลชั่น	7 ชั่วโมง
26	โลชั่นป้องกันยุง, Citronella, Holy basil, Philippine violet, Calamus, Zingiber cassumunar Roxb, PrimaLife	โลชั่น	2 ชั่วโมง
27	อภัยภูเบศรตะไคร้หอมกันยุง, Eucalyptus Citriodora Oil 4.43%, Citronella Oil 13.18%	โลชั่น	3 ชั่วโมง
28	ทาทา กลิ่นเมอร์รี่, EthylButylacetylaminopropionate 12%	โลชั่น	7 ชั่วโมง
29	OFF Kids, Deet 7.5%	โลชั่น	2 ชั่วโมง
30	OFF Family, Deet 15%	โลชั่น	6 ชั่วโมง

การทดสอบฤทธิ์ป้องกันยุงกัดในห้องปฏิบัติการ

วิธีนี้ปฏิบัติตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก (WHO, ๑๙๙๖) โดยทำการทดสอบกับยุงลาย *Ae. aegypti* ทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์ ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ ในช่วงเวลากลางวัน (๐.๖๐๐-๑๘.๐๐ น.) โดยควบคุมสภาพแวดล้อมให้อยู่ในสถานะเดียวกันเสมอ เช่น ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง ๒๗-๓๐°C และความชื้นสัมพัทธ์ ๖๐-๘๐% ในการทดลองปฏิบัติดังนี้

1. คัดเฉพาะยุงเพศเมียที่ยังไม่เคยกินเลือดมาก่อน อายุ 5-7 วัน จำนวน 250 ตัว ใส่ในกรงเลี้ยงยุงขนาดมาตรฐาน (30x30x30 ซม.³) ที่ปูด้วยผ้าไนลอนสีขาว ปลอ่ยให้ยุงปรับตัวอยู่ในสภาพนี้สักระยะหนึ่ง (~ 1 ชั่วโมง) ในช่วงนี้หากพบยุงที่มีลักษณะหรืออาการที่ผิดปกติให้คัดออกและใส่ตัวใหม่ที่มีสภาพปกติดีเข้าไปแทน

2. จัดเตรียมสภาพของอาสาสมัคร (เพศชายและหญิง, อายุระหว่าง 18-60 ปี, จำนวน 6 คน) ให้พร้อม โดยทำเครื่องหมายสีเหลี่ยมผืนผ้าพื้นขนาด 3x10 ซม.² ลงบนผิวหนังบริเวณท้องแขนในช่วงระหว่างข้อมือถึงข้อศอกของแขนทั้งสองข้าง จากนั้นพันส่วนแขนดังกล่าวด้วยแผ่นพลาสติกที่เจาะช่องขนาด 3x10 ซม.² ไว้ โดยให้ช่องนี้เปิดพอดีกับบริเวณพื้นที่ทดสอบบนผิวหนังของอาสาสมัครที่ทำเครื่องหมาย จากนั้นให้ปิดพื้นที่ส่วนอื่นของแขนทั้งสองข้าง เช่น ใส่ถุงมือและใส่เสื้อแขนยาวโดยให้เปิดเฉพาะตรงบริเวณพื้นที่ทดสอบเท่านั้น

3. ทาสารละลายจากผลิตภัณฑ์ไล่ยุงทั้ง 30 ผลิตภัณฑ์ ตามตารางที่ 1 และสารละลายมาตรฐาน DEET ที่ความเข้มข้น 10%, 15%, 20%, 25%, 50% และ 95% โดยใช้ปริมาณในแต่ละตำรับปริมาณ 0.1 ml ลงบนแขนข้างใดข้างหนึ่งของอาสาสมัคร ในบริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้ เกลี่ยให้ทั่วๆ ให้ครอบคลุมพื้นที่ดังกล่าว และทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 2 นาที ส่วนแขนอีกด้านหนึ่งที่เป็นตัวควบคุมจะทาด้วย alcohol

4. ให้อาสาสมัครสอดแขนข้างควบคุมเข้าไปในกรงยุงที่เตรียมไว้ โดยการเหยียดแขนให้ตรงเพื่อเปิดพื้นที่ที่ทาสารให้ยุงสามารถสัมผัสได้เต็มที่ ซึ่งหากมียุงมาเกาะในบริเวณพื้นที่ทดสอบอย่างน้อย 2 ตัว ให้เอาแขนออก และใส่แขนข้างทดสอบเข้าไปแทนโดยทำในลักษณะเดียวกัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที ระหว่างนี้ให้สังเกตและนับจำนวนยุงที่ลงเกาะในพื้นที่ทดสอบ เมื่อครบ 3 นาที หากยังไม่มียุงมาเกาะให้เอาแขนออก ทำการทดสอบในลักษณะเดิมโดยนำแขนเข้ากรงทดสอบทุกๆ 30 นาที โดยยื่นแขนควบคุมเข้าไปก่อนเสมอ ทำการทดลองในลักษณะนี้ไปเรื่อยๆ จนกระทั่งมียุงมาเกาะในพื้นที่ที่ทาสารของแขนข้างทดสอบอย่างน้อย 2 ตัว ให้หยุดการทดลองทันที

ระยะเวลาป้องกันยุงกัด (Protection time) ของสารทดสอบจะนับตั้งแต่เวลาที่เริ่มยื่นแขนเข้าไปในกรงยุงครั้งแรกจนถึงเวลาที่มียุงมาเกาะบริเวณพื้นที่ทาสารทดสอบเป็นตัวที่ 2 ซึ่งเป็นเวลาที่ถือว่าสารหมดฤทธิ์ป้องกันยุงแล้ว ในอาสาสมัครแต่ละคนจะทำการทดสอบอย่างน้อย 2 ครั้ง โดยสลับแขนซ้าย-ขวา ซึ่งระยะเวลาป้องกันยุงของสารทดสอบจะดูภาพโดยรวมที่ได้จากอาสาสมัครทุกคน และบันทึกเป็นช่วง (Range) เช่น ระยะเวลาป้องกันยุงกัดอยู่ในช่วง 3-5 ชั่วโมง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และสำนักงาน

คณะกรรมการอาหารและยามีข้อกำหนดร่วมกันว่าผลิตภัณฑ์สารทาป้องกันยุงที่ขอจดทะเบียนกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเพื่อจำหน่ายในประเทศไทยนั้น จะต้องสามารถป้องกันการกัดของยุงลายซึ่งทดสอบตามวิธีการดังกล่าวได้ไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง สำหรับประสิทธิภาพในการป้องกันการกัดของยุงชนิดอื่นนั้นยุงไม่นำมาใช้เป็นมาตรฐาน ในการขึ้นทะเบียน

อาสาสมัครที่เข้าร่วมในการทดลองจะคัดเลือกเฉพาะผู้ที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง และยินยอมเข้าร่วมการวิจัยโดยสมัครใจ โดยต้องลงนามในหนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมโครงการวิจัยให้เรียบร้อยก่อนทำการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

- Median complete-protection time ใช้กับการศึกษาเพื่อวัดประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไล่ยุงทั้ง 30 ผลิตภัณฑ์ กับยุงลาย *Ae. aegypti* สายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์ ที่ทดสอบภายใต้ห้องปฏิบัติการ โดยทำการหาค่าเฉลี่ยเพื่อเปรียบเทียบแต่ละผลิตภัณฑ์
- การศึกษาผลของปริมาณสารเคมีสังเคราะห์มาตรฐานของ DEET ในแต่ละความเข้มข้นต่อระยะเวลาป้องกันยุงใช้ Mann-Whitney U Test ใช้โปรแกรม SPSS version 18.0

สถานที่สำหรับทำการศึกษาวิจัย

- การเตรียมสารเคมีสังเคราะห์ไล่ยุงมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น ทำการศึกษาวิจัยที่ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ศูนย์ลำปาง
- การศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไล่ยุงทั้ง 30 ผลิตภัณฑ์กับยุงลาย *Ae. aegypti* สายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์ ที่ทดสอบภายใต้ห้องปฏิบัติการ ทำการศึกษาวิจัยที่ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จังหวัดเชียงใหม่ และ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ศูนย์ลำปาง
- การศึกษาประสิทธิภาพของสารไล่ยุงมาตรฐาน DEET ในความเข้มข้นต่างๆ กับยุงลาย *Ae. aegypti* สายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์ ที่ทดสอบภายใต้ห้องปฏิบัติการ ทำการศึกษาวิจัยที่ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จังหวัดเชียงใหม่ และ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ศูนย์ลำปาง