

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. รูปแบบการวิจัย

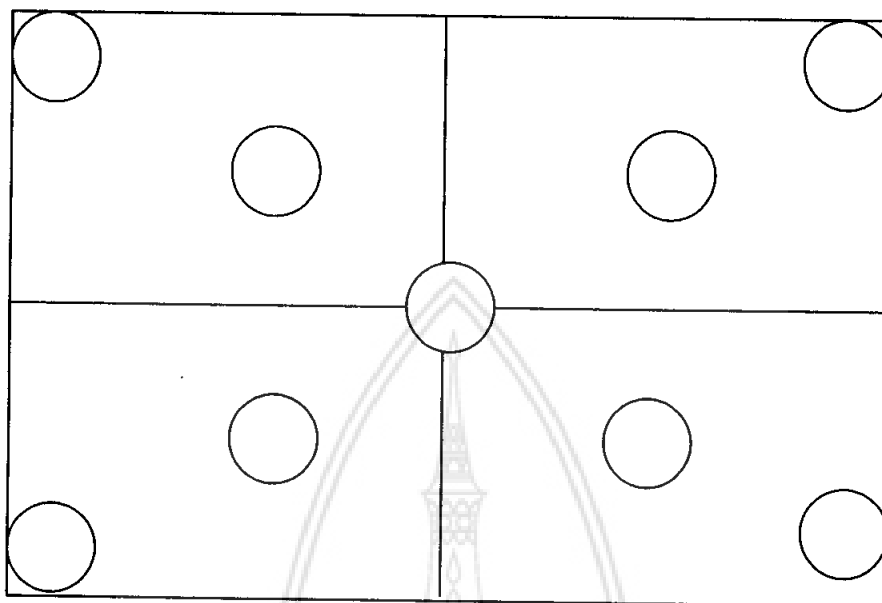
เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental study) โดยเก็บตัวอย่างที่ศึกษาในสนาม (field study) และนำมาทดลองในห้องปฏิบัติการ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD)

2. พื้นที่วิจัย

พื้นที่ศึกษาคือ อำเภอหนองบัวแดง จังหวัดชัยภูมิ ทำการเลือกตำบลที่จะสุ่มเก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงลายบ้านจากหมู่บ้านที่มีจำนวนผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกย้อนหลัง 5 ปี (ปี 2545-2549) โดยแบ่งเป็นตำบลที่มีการเกิดโรคติดต่อกัน 5 ปี หรือมีจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกสูงที่สุด (ตำบลเกิดโรคซ้ำซาก) รวม 3 ตำบล และตำบลที่ไม่มีการเกิดโรคติดต่อกัน 5 ปี หรือมีจำนวนผู้ป่วยไข้เลือดออกต่ำที่สุด รวม 3 ตำบล (ตำบลไม่เกิดโรคซ้ำซาก) ทำการเก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงลายบ้านทั้งหมด 6 ตำบล และนำยุงลายสายพันธุ์มาตรฐานจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยมีรายชื่อตำบลที่ลงสุ่มเก็บตัวอย่างดังนี้

3. วิธีการเก็บตัวอย่าง

โดยทำการเลือกเก็บตัวอย่างในหมู่บ้าน จำนวน 3 หมู่บ้านต่อ 1 ตำบล แบบกระจาย 9 จุด ตั้งทีมออกเก็บตัวอย่างจำนวน 4 ทีมๆ ละ 2 คน เพื่อทำการกระจายเก็บตัวอย่างลูกน้ำให้ครอบคลุม โดยเริ่มจากประสานกับผู้นำหมู่บ้าน จากนั้นดำเนินการเก็บที่บ้านประชาชนที่ตั้งอยู่ใจกลางหมู่บ้าน และกระจายทีมที่ตั้งขึ้นออกเป็นทิศทาง ซึ่งในแต่ละบ้านจะเก็บตัวอย่างลูกน้ำหลังละ 20 ตัว จากนั้นในแต่ละทีมให้แยกกันออกไปเก็บตัวอย่างในทิศทางที่ไม่ซ้ำกันกระจายออกไปโดยใช้บ้านหลังที่ 1 เป็นศูนย์กลาง (ดังภาพที่ 1) จากนั้นนำลูกน้ำยุงลายบ้านแต่ละหลังที่ทำการสุ่มมารวมกันจะได้จำนวนตัวอย่างหมู่บ้านละ 180 ตัว และนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการตามขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 1 ทิศทางการเก็บตัวอย่างลูกน้ำยุงลายบ้านในแต่ละหมู่บ้านในอำเภอหนองบัวแดง จังหวัดชัยภูมิ

ตารางที่ 1 ตัวอย่างพื้นที่เกิดโรคไข้ซิกาจากจำแนกตามประเภทพื้นที่รายตำบล

ประเภทพื้นที่	ตำบล	หมู่ที่	ชื่อหมู่บ้าน
ชนบท	หนองแวง	1	หนองแวง
		2	หนองปล่อง
		10	โคกสง่า
ชนบท	กุคชุมแสง	3	กุคชุมแสง
		6	หนองลุมพุก
		11	ชุมชนพัฒนา
เทศบาล และอบต.	หนองบัวแดง	4	ลาดเหนือ
		9	หนองบัวแดง
		15	ลาดวังม่วง

ตารางที่ 2 ตัวอย่างพื้นที่เกิดไม่เกิดโรคไข้ซิกาตามประเภทพื้นที่รายตำบล

ประเภทพื้นที่	ตำบล	หมู่ที่	ชื่อหมู่บ้าน
ชนบท	คูเมือง	7	ปากห้วยเคื่อ
		10	โนนตาปู
		16	ภูมิมะค่า
ชนบท	ท่าใหญ่	3	โนนสะอาด
		8	โนนศิลา
		10	โนนสำราญ
ชนบท	วังฆมภู	4	ห้วยหัน
		5	โคกตูม
		11	ไทรงาม

4. อุปกรณ์และเครื่องมือ

4.1 แมลงที่ใช้การทดลอง : ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* Linn.)

ยุงลายบ้านจากเขตเทศบาล และนอกเขตเทศบาลจากพื้นที่ อำเภอหนองบัวแดง จังหวัดชัยภูมิ โดยแบ่งพื้นที่การเก็บลูกน้ำออกเป็นตำบลเกิดโรคไข้ซิกา กับตำบลเกิดโรคปกติ

4.2 ชุดทดสอบความไวของยุงลายบ้านต่อสารฆ่าแมลงตามมาตรฐานจากองค์การอนามัยโลก

4.3 ชุดอุปกรณ์การทดสอบความไวของลูกน้ำยุงลายบ้านต่อสารฆ่าแมลง

ก. ถ้วยพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร

ข. กระบอกตวงขนาด 250 มิลลิลิตร

ค. ปิเปตขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร

4.4 อุปกรณ์เลี้ยงแมลง

ก. กรงสำหรับเลี้ยงตัวเต็มวัยเป็นผ้าไนลอนที่มีโครงลวดขนาด 30 x 30 x 30

เซนติเมตร

ข. ถาดพลาสติกขนาด 20 x 30 เซนติเมตร

ค. กระบะพลาสติกสำหรับเลี้ยงลูกน้ำ

ง. ถ้วยดินเผาสำหรับให้ยุงลายวางไข่

- จ. หลอดหยด (dropper) สำหรับดูดลูกน้ำ
- ฉ. ที่ช้อนลูกน้ำหรือกระบวยตักลูกน้ำ
- ช. แก้วพลาสติกสำหรับแยกตัวไม่่ง
- ซ. สำลีและไม้พันสำลี
- ณ. อาหารหนูสำหรับเลี้ยงลูกน้ำ
- ญ. น้ำหวานและวิตามินรวมชนิดน้ำเชื่อม (multi-vitamin syrup) สำหรับเลี้ยงระยะ

ตัวเต็มวัย

4.5 สารฆ่าแมลง

ก. กระจายหุบสารฆ่าแมลงที่ใช้ทดสอบ 6 ชนิด สั่งซื้อจากมหาวิทยาลัย Sains ประเทศมาเลเซีย ได้แก่

- ข. กระจาย control ของสารกลุ่ม ออร์กาโนฟอสฟอรัสและคาบาร์เมต
- ค. กระจาย control ของสารกลุ่ม ไพรีทรอยด์
- ง. กระจายหุบสารฆ่าแมลงมาตรฐาน cyfluthrin 0.15 %
- จ. กระจายหุบสารฆ่าแมลงมาตรฐาน deltamethrin 0.05 %
- ฉ. กระจายหุบสารฆ่าแมลงมาตรฐาน permethrin 0.75 %
- ช. กระจายหุบสารฆ่าแมลงมาตรฐาน malathion 5 %
- ซ. สารฆ่าแมลงมาตรฐาน temephos
- ณ. สารฆ่าแมลง cypermethrin (โบกิล่า 10, cypermethrin 10% w/v EC)

5. ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

5.1 การเตรียมแมลงที่ใช้ในการทดสอบ

ยุงที่ใช้สำหรับทดสอบเป็นยุงลายบ้านที่ดำเนินการเก็บจากหมู่บ้าน จำนวน 3 หมู่บ้านต่อ 1 ตำบล แบบกระจาย 9 จุดตั้งทีมออกเก็บตัวอย่างจำนวน 4 ทีมๆ ละ 2 คน เพื่อทำการกระจายเก็บตัวอย่างลูกน้ำให้ครอบคลุม โดยเริ่มจากประสานกับผู้นำหมู่บ้าน จากนั้นดำเนินการเก็บที่บ้านประชาชนที่ตั้งอยู่ใจกลางหมู่บ้านและกระจายทีมที่ตั้งขึ้นออกเป็นทิศทาง ซึ่งในแต่ละบ้านจะเก็บตัวอย่างลูกน้ำหลังละ 20 ตัว จากนั้นในแต่ละทีมให้แยกกันออกไปเก็บตัวอย่างในทิศทางที่ไม่ซ้ำกันกระจายออกไปโดยใช้บ้านหลังที่ 1 เป็นศูนย์กลาง (ดังภาพที่ 1) จากนั้นนำลูกน้ำของลายบ้านแต่ละหลังที่ทำการสุ่มมารวมกันจะได้จำนวนตัวอย่างหมู่บ้านละ 180 ตัว จากนั้นนำมาเลี้ยงให้เป็นตัวเต็มวัยในห้องปฏิบัติการ ให้อาหารสารละลายน้ำตาล 10% ผสมวิตามิน นำตัวเต็มวัยเข้าเลี้ยงในกรงขนาด 30 x 30 x 30 เซนติเมตร ให้ยุงลายผสมพันธุ์กันเองในกรง จากนั้นให้เลือดกับยุงโดยการนำ

หนุตะเภาใส่กรงให้ยุงดูดเลือด ทิ้งไว้ 3-5 ชั่วโมง ในช่วงกลางวัน จากนั้น 2-3 วัน นำภาชนะใส่น้ำให้ยุงลายวางไข่ในกรง นำไข่ยุงลายที่ได้มาเพาะเลี้ยงเป็นลูกน้ำจนได้ยุงลายตัวเต็มวัย รุ่นที่ 1 (F₁)

5.2 การทดสอบความไวของลูกน้ำยุงลายบ้านต่อสารฆ่าแมลง temephos

โดยใช้วิธี susceptibility test

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design ทำการทดสอบกับลูกน้ำยุงลายบ้านที่มีขนาดใกล้เคียงกันในระยะที่ 3 ตอนปลายหรือระยะที่ 4 ตอนต้นรุ่นที่ 1 เตรียมสารละลายสารฆ่าแมลงที่มีความเข้มข้นต่างๆ ละลายในน้ำ ใส่ลงในถ้วยพลาสติกจำนวน 250 มิลลิลิตร จากนั้นปล่อยลูกน้ำจำนวน 25 ตัวต่อซ้ำ นำมาเก็บที่สภาพห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ตรวจนับจำนวนลูกน้ำตายที่ 24 ชั่วโมง หาค่า lethal concentration (LC₅₀ และ LC₉₅) โดยใช้วิธี probit analysis

การทดลองเบื้องต้น (preliminary test) เพื่อหาระดับความเข้มข้นอย่างกว้างของสารฆ่าแมลงแต่ละชนิดที่ทำให้เกิดการตายที่ร้อยละ 50 โดยใช้ความเข้มข้น 4 ระดับทำ 4 ซ้ำต่อระดับความเข้มข้น ข้อมูลจำนวนแมลงที่ตายนำไปปรับเพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงแต่ละชนิดในการทดลองอย่างละเอียดต่อไป

การทดลองอย่างละเอียด (full scale test) ทำการทดลองโดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการทดลองเบื้องต้นมาทำการทดลองละเอียดโดยการลดความกว้างของช่วงความเข้มข้น และเพิ่มระดับความเข้มข้นเป็น 5 ระดับในแต่ละชนิดของสาร ทดสอบ 5 ซ้ำ ต่อระดับความเข้มข้น โดยมีเงื่อนไขของการทดสอบคือ

ก. ถ้าจำนวนการตายของของลูกน้ำยุงลายในชุดควบคุมอยู่ระหว่างร้อยละ 5-20 ให้ปรับอัตราตายโดยใช้ Abbott's formula ตามสูตร

$$\text{corrected mortality} = \frac{\% \text{ test mortality} - \% \text{ control mortality}}{100 - \% \text{ control mortality}} \times 100$$

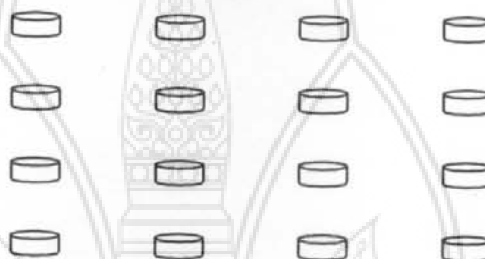
ข. ถ้าอัตราการตายของของลูกน้ำยุงลายในชุดควบคุมมากกว่าร้อยละ 20% หรือหลังการทดสอบ 24 ชั่วโมง พบตัวไม่มากกว่าร้อยละ 10% การทดสอบจะใช้ไม่ได้และต้องเริ่มการทดสอบใหม่

ข้อมูลจำนวนแมลงที่ตายนำไปคำนวณค่า LC_{50} และ LC_{95} ที่ 24 ชั่วโมง โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป polo probit จากนั้นนำค่า LC_{95} คำนวณหาค่าระดับความต้านทาน (resistance ratio) (WHO, 1981) ตามสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{resistance ratio (RR)} = LC_{95} \text{ resistance strain} / LC_{95} \text{ susceptible}$$

การทดลองเบื้องต้น (preliminary test)

ลูกน้ำช่วงระยะที่ 3-4
จำนวน 25 ตัวต่อซ้ำ

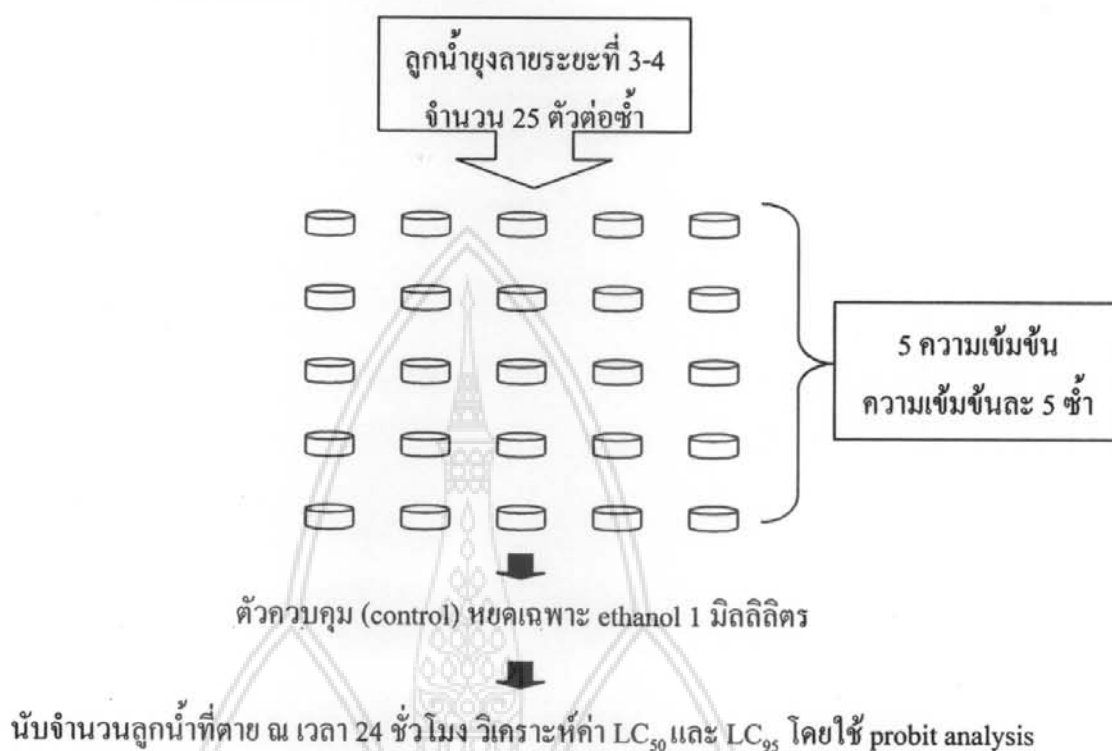


4 ความเข้มข้น
ความเข้มข้นละ
4 ซ้ำ

ตัวควบคุม (control) หยดเฉพาะ ethanol 1 มิลลิลิตร

นับจำนวนลูกน้ำที่ตาย ณ เวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่ได้จะนำไปคำนวณปรับหาความเข้มข้นของสารชนิดต่างๆ เพื่อทดสอบอย่างละเอียดต่อไป

การทดลองอย่างละเอียด (full scale test)



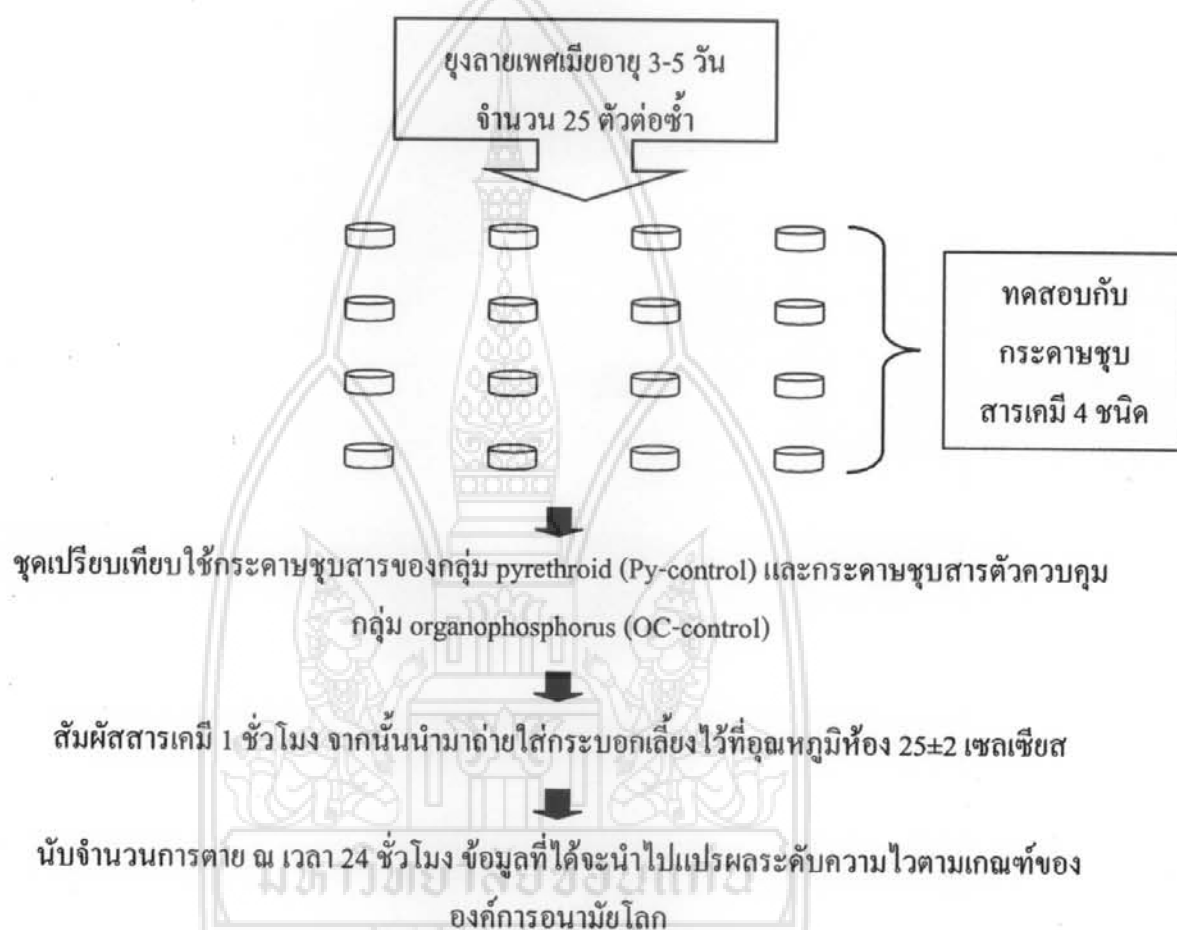
การทดลองอย่างละเอียดทำการทดลองโดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการทดลองเบื้องต้นมาทำการทดลองละเอียดโดยการลดความกว้างของช่วงความเข้มข้น และใช้ระดับความเข้มข้นเป็น 5 ระดับ ทดสอบ 5 ซ้ำ ต่อระดับความเข้มข้น

5.3 การทดสอบความไวของยุงลายบ้านระยะตัวเต็มวัยโดยใช้กระดาษหุบสารฆ่าแมลง มาตรฐานจากองค์การอนามัยโลก

สารฆ่าแมลงที่นำมาทดสอบได้แก่ malathion 5%, deltamethrin 0.05%, permethrin 0.75% และสาร cyfluthrin 0.15% ซึ่งเป็นอุปกรณ์ทดสอบมาตรฐานจากองค์การอนามัยโลก (WHO, 1981 : WHO, 1998) ดำเนินการศึกษาเริ่มจากการคัดเลือกยุงลายบ้านเพศเมียที่สมบูรณ์อายุ 1-5 วัน มาทำการทดสอบ ใส่ลงในกระบอกทดสอบกระบอกละ 25 ตัว (บุญเสริม และคณะ, 2543) ทดสอบยุงลายบ้านครั้งละ 1 ตำบล โดยนำยุงลายบ้านจากการเก็บรวบรวมลูกน้ำยุงลายบ้านในหมู่บ้านของตำบลที่มีการระบาดของโรคอย่างต่อเนื่อง 3 ปี กับตำบลที่มีการระบาดต่ำหรือไม่มีรายงานการเกิดโรค ใส่กระบอก 4 กระบอก ๆ ละ 25 ตัว รวมยุงลายบ้านทดสอบในแต่ละหน่วยทดลอง อย่างละ 100 ตัว และยุงลายบ้านสำหรับชุดเปรียบเทียบ แบ่งเป็นยุงตัวควบคุมจากที่มีการระบาดของโรคอย่างต่อเนื่อง 3 ปี กับตำบลที่มีการระบาดต่ำหรือไม่มีรายงานการเกิดโรค อย่างละ 1 กระบอก รวม 50 ตัว ให้ยุงลายบ้านสัมผัสกระดาษหุบสารฆ่าแมลงในกระบอกสัมผัส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ ส่วนชุดเปรียบเทียบ ให้สัมผัสกระดาษเป็นเวลา 1 ชั่วโมงทำการทดสอบเพียง 1 ซ้ำ

เมื่อครบกำหนดแล้วจึงย้ายยุงลายบ้านจากกระบอกทดสอบใส่กระบอกเก็บ นำยุงลายบ้านที่ได้จากการทดสอบมาเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนยุงลายบ้านที่ตาย

การทดสอบความไวของยุงลายบ้านระยะตัวเต็มวัยโดยใช้กระดาษชุบสารฆ่าแมลงมาตรฐาน



5.4 การทดสอบความไวของยุงลายบ้านระยะตัวเต็มวัยโดยใช้กล่องสภาพจำลองพื้นที่ของสารฆ่าแมลง cypermethrin 0.1%

เนื่องจากดังกล่าวไม่มีกระดาษชุบสารฆ่าแมลงมาตรฐานจากองค์การอนามัยโลก จึงใช้วิธีการจำลองสภาพพื้นที่ โดยใช้กล่อง ขนาด 1 ลูกบาศก์เมตร ดำเนินการศึกษาเริ่มจากการคัดเลือกยุงลายบ้านเพศเมียที่สมบูรณ์อายุ 1-5 วัน มาทำการทดสอบ ใส่ลงในกระบอกทดสอบกระบอกละ 25 ตัวทดสอบยุงลายบ้านครั้งละ 1 ตำบล โดยนำยุงลายบ้านจากการเก็บรวบรวมลูกน้ำยุงลายบ้านในตำบลที่มีการระบาดซ้ำซากกับตำบลที่เกิดโรคปกติ ใส่กระบอก 4 กระบอก ๆ ละ 25 ตัว รวมยุงลายทดสอบในแต่ละหน่วยทดลอง อย่างละ 100 ตัว และยุงลายบ้านสำหรับชุดเปรียบเทียบแบ่งเป็นยุงลายบ้านตัวควบคุมตำบลที่มีการระบาดซ้ำซากกับตำบลที่เกิดโรคปกติ อย่างละ 1

กระบอก รวม 50 ตัว นำสาร cypermethrin 10% นำมาเจือจางตามอัตราผสมมาตรฐานตามคู่มือการใช้สารเคมี เครื่องพ่นเคมี และการบำรุงรักษาในงานควบคุมโรคติดต่อ นำโดยแมลง อัตรา 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำมันดีเซล 99 มิลลิกรัม (ความเข้มข้น 0.1%) (บุญเสริม และคณะ, 2543) วางกระบอกทดสอบที่มียุงลายบ้านเพศเมียที่เตรียมไว้ในกล่องจำลอง แขนงกระบอกไว้ในห้องแบบทแยงมุม ทั้งไว้ที่ไว้อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาทีก่อนการทดสอบ จากนั้นทำการพ่นสารฆ่าแมลงแบบหมอกควัน (fogging) ตามอัตราส่วนที่กำหนด ให้ยุงสัมผัสสารฆ่าแมลงเป็นเวลา 20 นาที ทำการพ่นในช่วงเวลา 8.00 - 10.00 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่พบยุงลายออกหากินมากที่สุด ตรวจนับอัตราการสลบ (knock down) จากนั้นดูยุงลายบ้านออกจากกระบอกทดสอบมาเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80% นับจำนวนการตายที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

6. การเปรียบเทียบระดับความไว

ตรวจนับจำนวนการตายที่ 24 และ 48 ชม. ในแต่ละการทดลอง จากนั้นนำจำนวนการตายที่ได้ไปเปรียบเทียบระดับความไวตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก ดังนี้

- ก. มีความไวต่อสารฆ่าแมลงในระดับสูง หมายถึง จำนวนการตายระหว่าง 98 – 100%
- ข. มีความไวต่อสารฆ่าแมลงในระดับปานกลาง หมายถึง จำนวนการตายระหว่าง 80 – 97%
- ค. มีความไวต่อสารฆ่าแมลงในระดับต่ำ (หรือต้านต่อสารเคมี) หมายถึง จำนวนการตายต่ำกว่า 80%

โดยมีสูตรคำนวณร้อยละจำนวนการตายของยุงลายบ้าน

$$\text{ร้อยละจำนวนการตาย} = \frac{\text{จำนวนการตายของยุงทดสอบ}}{\text{จำนวนของยุงที่ใช้ทดสอบ}} \times 100$$

ทั้งนี้ หากจำนวนการตายของยุงลายบ้านใน control อยู่ระหว่างร้อยละ 5-20 ให้ปรับค่าจำนวนการตายของยุงลายบ้านทดสอบด้วย Abbott's formula ดังนี้

จำนวนการตายที่แท้จริง =

$$\frac{\text{จำนวนตายของยุงทดสอบ} - \text{จำนวนการตายของยุง control} \times 100}{100 - \text{จำนวนการตายของยุง control}}$$

และ ถ้าจำนวนการตายของยุงลายบ้านชุดเปรียบเทียบมากกว่าร้อยละ 20 ให้ทำการทดสอบใหม่