

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 ลำล็ก้อน

1.2 อุปกรณ์เจาะเลือด (blood lancet)

1.3 glass slide

1.4 แผ่นพลาสติก acrylic ความหนา 1.5 มิลลิเมตร

1.5 Heparinized Capillary Tube ยาว 75 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร

1.6 Automatic pipette ขนาด 100 และ 200 ไมโครลิตร และ pipette tip

1.7 Coupling jar

1.8 กล้องจุลทรรศน์

1.9 Counting chamber

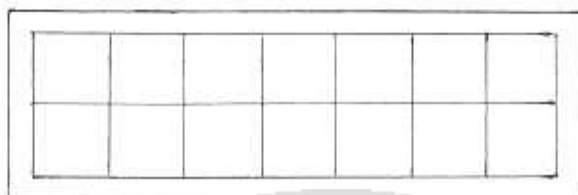
วิธีการทำ Counting chamber

1. ตัดพลาสติก acrylic ให้ได้รูปสี่เหลี่ยมมีขนาดเท่ากับกระจกใสด์แบบธรรมดา

2. เจาะบริเวณตรงกลางของพลาสติกออกให้เหลือขอบทั้ง 4 ด้าน ซึ่งแต่ละด้านมีขนาดกว้าง 0.5 เซนติเมตร ดังรูป



3. นำพลาสดิกที่ตัดเรียบร้อยแล้ว ทากาวซีเมนต์อย่างใดและมาประกอบติดกระจกสไลด์แบบธรรมดา
4. รอจนกาวแห้งแล้วนำมาขีดเส้นแบ่งช่องกระจกออกเป็นตารางด้วยเหล็กปลายแหลม ดังรูป



5. ทดสอบ Chamber ก่อนการใช้งานทุกครั้ง โดยการเติมน้ำกลั่นและสิ่งเกืดดูรอยซีมและ Chamber ที่ถูกนำมาใช้งานจะต้องไม่มีการรั่วซึมของของเหลวออกมาข้างนอก

2. สารเคมีและน้ำยา

- 2.1 70% Ethyl Alcohol
- 2.2 Methanol
- 2.3 Glycerine
- 2.4 Giemsa powder
- 2.5 Disodium hydrogen phosphate dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 2.6 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
- 2.7 ยา Diethylcarbamazine (DEC)

วิธีการเตรียมน้ำยา

1. Giemsa's stain

Giemsa's Powder	3	กรัม
Glycerine	250	มิลลิลิตร
Methanol	250	มิลลิลิตร

เตรียมโดยบด Giemsa powder กับ Glycerine จนละเอียด เทใส่ Flask นำไปอุ่นที่ $55-60^\circ\text{C}$ นาน 6-8 ชั่วโมง นำมาทำให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องเติม Methanol ผสมให้เข้ากันเก็บใส่ขวด ปิดจุกทิ้งไว้ 1-2 สัปดาห์ จึงนำมากรองก่อนใช้งาน

2. Phosphate Buffer

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.76	กรัม
KH_2PO_4	2.10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

สารละลายที่เตรียมได้ควรมี pH 7.0-7.2 ถ้าสารละลายที่เตรียมได้มี pH เป็นกรดให้ปรับด้วย 0.2% Sodium carbonate ถ้าสารละลายที่ได้มี pH เป็นด่างเกินไปให้ปรับด้วย 0.5 % Acetic acid

3.2. ประชากรและการเก็บตัวอย่าง

1. ประชากร

การเก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรซึ่งเป็นแรงงานต่างชาติในทุกอำเภอในเขต จังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งจำแนกออกตามชุมชนที่เก็บดังนี้

ตารางที่ 2. แสดงจำนวนประชากรตัวอย่างจำแนกออกเป็นแต่ละเขตอำเภอ

ลำดับ	แหล่งชุมชน	จำนวนแรงงานต่างชาติ
1.	อำเภอ เมือง	101
	-หมู่บ้านที่ ๑ ต.บางเมือง	
	บ้านพักคนงานกลุ่มที่ ๑	6
	บ้านพักคนงานกลุ่มที่ ๒	19
	-หมู่บ้านที่ ๒ ต.แพรกษา	
	บ้านพักคนงานกลุ่มที่ ๑	25
	บ้านพักคนงานกลุ่มที่ ๒	35
	บ้านพักคนงานกลุ่มที่ ๓	16
2.	อำเภอ บางพลี	96
	-หมู่บ้านที่ ๑ ต.บางปลา	38
	-หมู่บ้านที่ ๒ ต.บางปลา	58
3.	อำเภอ พระประแดง	24
	-หมู่บ้านที่ ๑ ต.บางครุ	24
4.	อำเภอ บางบ่อ	0
5.	อำเภอ พระสมุทรเจดีย์	0
6.	อำเภอ บางเสาธง	0
	รวม	221

2. การเตรียมกลุ่มประชากรก่อนเก็บตัวอย่าง

ติดต่อเจ้าหน้าที่สาธารณสุขประจำจังหวัด อำเภอ และตำบล ของจังหวัดสมุทรปราการ เพื่อสำรวจแรงงานต่างชาติทั้งหมดทั้งที่ได้รับอนุญาตให้เข้ามาทำงานอย่างถูกต้องตามกฎหมายและไม่ถูกกฎหมายที่มีในพื้นที่จังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งแรงงานที่จะถูกเก็บตัวอย่างเลือดต้องไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยารักษาพยาธิโรคเท้าช้าง (DEC) หรือได้รับยา DEC มาแล้วอย่างน้อย 3 เดือน

3. การเก็บตัวอย่าง

3.1 ให้อา Diethylcarbamazine (DEC) ขนาด 100 มิลลิกรัม (2 เม็ด) กับแรงงานต่างชาติ ที่เข้ามารับการตรวจ พร้อมหมายเลขประจำตัว รอเวลา 15 -30 นาที เพื่อกระตุ้นให้เชื้อพยาธิโรคเท้าช้างปรากฏในกระแสเลือด

3.2 เจาะเลือดปลายนิ้วของแรงงานที่มารับการตรวจ โดยเจาะเลือดเรียงตามหมายเลขประจำตัวที่ให้ไว้ในข้างต้นโดยเริ่มจากเข็ดปลายนิ้ว (นิ้วกลาง หรือนิ้วนาง) ด้วย 70% alcohol รอจนแห้งใช้ Lancet เจาะเลือด เข็ดเลือดหยดแรกทิ้งไป

3.3 แตะเลือดลงบน glass slide 3 หยด เพื่อทำ thick smear รอจนแห้ง และเก็บ slide มาย้อม Giemsa stain ณ ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

3.4 เจาะเลือดใส่ลงใน Heparinized Capillary tube ขนาด 75 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร จนเต็มหลอด เพื่อนำมาตรวจหาเชื้อพยาธิโรคเท้าช้าง โดยวิธี Counting chamber method ซึ่งทำการตรวจ ณ จุดที่ปฏิบัติงาน

4. ให้อา Diethylcarbamazine (DEC) ขนาด 200 มิลลิกรัม

หลังทำการเจาะเลือดปลายนิ้ว ให้อา Diethylcarbamazine (DEC) ขนาด 200 มิลลิกรัม (4 เม็ด) กับแรงงานทุกรายที่มาเจาะเลือด เพื่อให้ขนาดของยาครบตามจำนวนที่ให้การรักษา พร้อมแจ้งผลการตรวจด้วยวิธี Counting chamber method กับแรงงานที่มารับการตรวจตามหมายเลขประจำตัวข้างต้น

3.3. วิธีการตรวจ

1. การตรวจโดยวิธี Thick Blood Smear Technique

1.1 ปลอ่ยให้เลือดหยดลงบนกระดาษไลต์แห้งสะอาด 3 หยด

1.2 ใช้มุมสไลด์อีกแผ่นเกลี่ยเลือดให้แผ่กระจายเป็นรูปไข่ขนาด 2x3 เซนติเมตร ปลอ่ยให้แห้ง

1.3 ย้อมด้วยสี Giemsa (Stock Giemsa's 1 ส่วน ; Buffer water pH 7 50 ส่วน) เป็นเวลา 45 นาที

1.4 ล้าง slide ใน Buffer 3 ครั้ง ปลอ่ยให้แห้ง

1.5 นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. การตรวจด้วยวิธี Counting Chamber Method

2.1 ปล่อยเลือดจาก Heparinized Capillary Tube ที่ผสมกันดีแล้ว 75 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Counting chamber ที่มีน้ำกลั่นอยู่แล้ว 200 ไมโครลิตร

2.2 คนเลือดให้เข้ากันดี

2.3 ตรวจดูเชื้อพยาธิโรคเท้าช้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10X ถ้าพบเชื้อจะเห็นการเคลื่อนไหวชัดเจน

3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล และการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการศึกษาวิจัยทั้ง 2 วิธี จะรายงานในลักษณะเดียวกันคือ ถ้าตรวจพบเชื้อในแต่ละตัวอย่างจะรายงานเป็นผลบวก ถ้าตรวจไม่พบเชื้อจะรายงานเป็นผลลบ จำนวนตัวอย่างตรวจที่ให้ผลบวกทั้งหมดจะถูกรวบรวม และวิเคราะห์ออกมาในรูปของร้อยละ

