

### บทที่ 3

#### ระเบียบวิธีวิจัย

#### 1. การเก็บตัวอย่าง

##### 1.1 สถานที่และจำนวน

แมลงสาบที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 920 ตัว ระยะตัวเต็มวัย (อวัยวะครบสมบูรณ์และมีชีวิต) นำมาจากตลาด 18 แห่ง ของจังหวัดสมุทรปราการใน 5 อำเภอ และ 1 กิ่งอำเภอ แบ่งออกเป็น 3 เขตได้แก่

1. เขตตะวันออก (อำเภอบางบ่อ และ กิ่งอำเภอบางเสาธง)
2. เขตกลาง (อำเภอเมือง และ อำเภอบางพลี)
3. เขตตะวันตก (อำเภอพระประแดง และ อำเภอพระสมุทรเจดีย์)

##### 1.1.1 เขตตะวันออก (อำเภอบางบ่อ และ กิ่งอำเภอบางเสาธง)

###### อำเภอบางบ่อ ประกอบด้วย

ตลาดสดเสริมสุข จำนวน 50 ตัว

ตลาดสดแสงเจริญ จำนวน 50 ตัว

ตลาดสดบางพลีน้อย จำนวน 50 ตัว

###### กิ่งอำเภอบางเสาธง ประกอบด้วย

ตลาดสดบางเสาธง จำนวน 50 ตัว

ตลาดสดศิระจรเข้ น้อย จำนวน 50 ตัว

ตลาดสดศิระจรเข้ใหญ่ จำนวน 50 ตัว

##### 1.1.2 เขตกลาง (อำเภอเมือง และ อำเภอบางพลี)

###### อำเภอเมือง ประกอบด้วย

ตลาดเทพประทาน จำนวน 54 ตัว

ตลาดสำโรง จำนวน 54 ตัว

ตลาดปากน้ำ จำนวน 60 ตัว

###### อำเภอบางพลี ประกอบด้วย

ตลาดกิ่งแก้ว จำนวน 50 ตัว

ตลาดแก้ววรรณะ จำนวน 50 ตัว

ตลาดบางโหลง จำนวน 50 ตัว

### 1.1.3 เขตตะวันตก (อำเภอพระประแดง และ อำเภอพระสมุทรเจดีย์)

#### อำเภอพระประแดง ประกอบด้วย

ตลาดพระประแดง	จำนวน 50 ตัว
ตลาดบางพิง	จำนวน 50 ตัว
ตลาดหน้าวัดกรูโน	จำนวน 50 ตัว

#### อำเภอพระสมุทรเจดีย์ ประกอบด้วย

ตลาดสามแยกเจดีย์	จำนวน 50 ตัว
ตลาดวัดใหญ่	จำนวน 50 ตัว
ตลาดท่าเรือ	จำนวน 50 ตัว

### 1.2 วิธีการเก็บตัวอย่างในเวลากลางคืน บริเวณตลาด

#### 1.2.1 การใช้กับดัก ช่วงเวลาประมาณ 19.00 น. – 07.00 น. ของวันถัดไป

- นำขวดพลาสติกมาเจาะรูขนาดเท่าถ้วยเยลลี่ขนาดเล็ก
- นำถ้วยเยลลี่มากรีดเป็นช่องเล็กๆนำไปใส่ในรูที่เจาะไว้
- ปิดให้แน่นสนิทโดยใช้กาวไฟฟ้า
- ใส่อาหารล่อแมลงสาบ เช่น ขนมปัง น้ำตาลทรายชนิดก้อน
- นำไปวางไว้ตามที่ระบายน้ำ ถึงขยะ ใต้โต๊ะ

#### 1.2.2 การใช้มือจับ ช่วงเวลาประมาณ 20.00 – 24.00 น.

- แต่งกายให้มิดชิด
- สวมถุงมือก่อนเริ่มจับแมลงสาบ
- จับแมลงสาบบริเวณตลาดตามที่สกปรก เช่น ที่ระบายน้ำ ใกล้กองขยะ ตลาดละ 50 ตัว โดย

ทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม (Random sample) ภายในบริเวณตลาด จับแมลงสาบกลุ่มตัวอย่างบรรจุในถุงพลาสติก (โดยถุงพลาสติก 1 ถุง บรรจุแมลงสาบ 1 ตัว ทำการปิดปากถุงให้เรียบร้อยพร้อมเจาะรูเพื่อให้แมลงสาบหายใจ) บันทึกวัน เวลา และสถานที่ลงบนถุงพลาสติก ในช่วงเวลาจากนั้นเก็บแมลงสาบไว้ 1 คืน ก่อนนำมาห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการจำแนกเพศ ชนิด ของแมลงสาบ และทำการตรวจหาเชื้อปรสิตจากผิวหนังนอก (cuticle) ของมัน

### 1.3 อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง

#### 1.3.1 อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างด้วยกับดัก

- ขวดพลาสติก
- ถ้วยพลาสติกขนาดเล็ก
- มีดขนาดเล็ก
- กาวไฟฟ้า
- ขนมปัง
- น้ำตาลทรายชนิดก้อน
- ถุงมือ
- ไฟฉาย

#### 1.3.2 อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง ด้วยมือ

- ถุงมือ
- ไฟฉาย
- ถุงพลาสติก ขนาด 3x4 นิ้ว พร้อมเจาะรู
- ตะกร้า

### 1.4 น้ำยาและสารเคมี

- 1.4.1 10% Formal saline
- 1.4.2 0.85% NaCl
- 1.4.3 Iodine solution
- 1.4.4 Kinyoun carbol fuchsin
- 1.4.5 Acid fast alcohol
- 1.4.6 Methylene blue

## 2. วิธีการตรวจวิเคราะห์

### 2.1 การตรวจหาเชื้อปรสิตจาก (cuticle) ของแมลงสาบ

2.1.1 นำแมลงสาบกลุ่มตัวอย่างที่เก็บได้จากบริเวณตลาด ที่มีขยะครบสมบูรณ์และมีชีวิต มาแยกเพศ และจำแนกชนิดโดยอนุกรมวิธานแมลงสาบของ ดร.อภิวัฏ รัชสิน<sup>(3)</sup> ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereomicroscope

2.1.2 นำแมลงสาบกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบการเป็นพาหะนำเชื้อปรสิตมาทำให้สลบโดยใช้ ether<sup>(19)</sup> (นำแมลงสาบใส่ในกระป๋องที่มีสำลีชุบ ether ประมาณ 5 นาที)

2.1.3 ใช้ forceps คีบแมลงสาบบรรจุใน centrifuge tube ที่มี 10% formal saline solution 5 ml ลงใน centrifuge tube

2.1.4 ปิด centrifuge tube ด้วย paraffin แล้วเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 2 นาที แล้วแกะ paraffin ออกจาก centrifuge tube

2.1.5 ใช้ forceps คีบแมลงสาบออก และนำน้ำล้างผิวหนังด้านนอกของแมลงสาบไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge 2,000 rpm 5 นาที

2.1.6 เติมน้ำส่วนที่ใสทิ้ง (supernatant) แล้วนำตะกอนที่ได้มาทำการตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยวิธี direct wet smear โดยใช้ 1% iodine solution หรือ normal saline solution อย่างละ 2 cover slide และตรวจหาเชื้อปรสิตด้วยการย้อมสี modified acid fast stain

2.1.7 ทำการตรวจหาเชื้อปรสิต (Parasitic organisms) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Light microscope ที่ทำการ calibrate กล้องด้วย Ocular micrometer แล้ว

2.1.8 จดบันทึกผลและเก็บรวบรวมข้อมูล

**หมายเหตุ** 10% formal saline solution ใช้ชะล้างปรสิตจาก ผิวภายนอก (cuticle) ของแมลงสาบแล้วยังใช้รักษาสภาพระยะต่างๆของปรสิตได้ดีอีกด้วย ยกเว้นระยะโทรโฟซอยด์

## 2.2 การย้อมสี Modified acid fast stain

2.2.1 การตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธีการย้อม Modified acid fast stain

1. นำตะกอนที่ได้จากการปั่นน้ำล้างแมลงสาบมาเกลี่ยเป็นแผ่นบางบน slide ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง
2. นำแผ่น slide ไปลงผ่านไฟประมาณ 2-3 ครั้งเพื่อช่วยให้แห้งและติดแผ่น slide ดีขึ้น
3. ย้อมด้วยสี Kinyoun carbol fuchsin นานประมาณ 5 นาที ล้างน้ำ
4. ล้างสีส่วนเกินออกด้วย Acid fast alcohol จนแผ่นย้อมมีสีติดน้อยลง
5. นำไปย้อมทับต่อด้วยสี Methylene blue นาน 1 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา
6. เช็ด Slide ให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์
7. นำไปตรวจหาด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ objective x 10 ก่อน แล้วจึงใช้ objective x 40 แล้วใช้ objective x 100

**หมายเหตุ** Slide ที่ใช้ดูแล้วนำไปแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อค้างคืนเพื่อป้องกันการติดเชื้อ

## 2.3 การแปลผล

รายงานชนิดและระยะของปรสิตที่ตรวจพบจากกล้องจุลทรรศน์

2.3.1 ถ้าตรวจพบปรสิต รายงานผลเป็นชนิดและระยะของปรสิตที่ก่อโรคในคน และปรสิตที่ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ (Unidentified egg/larva)

2.3.2 ถ้าตรวจไม่พบปรสิต รายงานผล not found

### สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

1. คำนวณจำนวนแมลงสาบแต่ละ species โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\% \text{ แมลงสาบแต่ละ species/เพศ} = \frac{\text{จำนวนแมลงสาบแต่ละ species/เพศ} \times 100}{\text{จำนวนแมลงสาบทั้งหมด}}$$

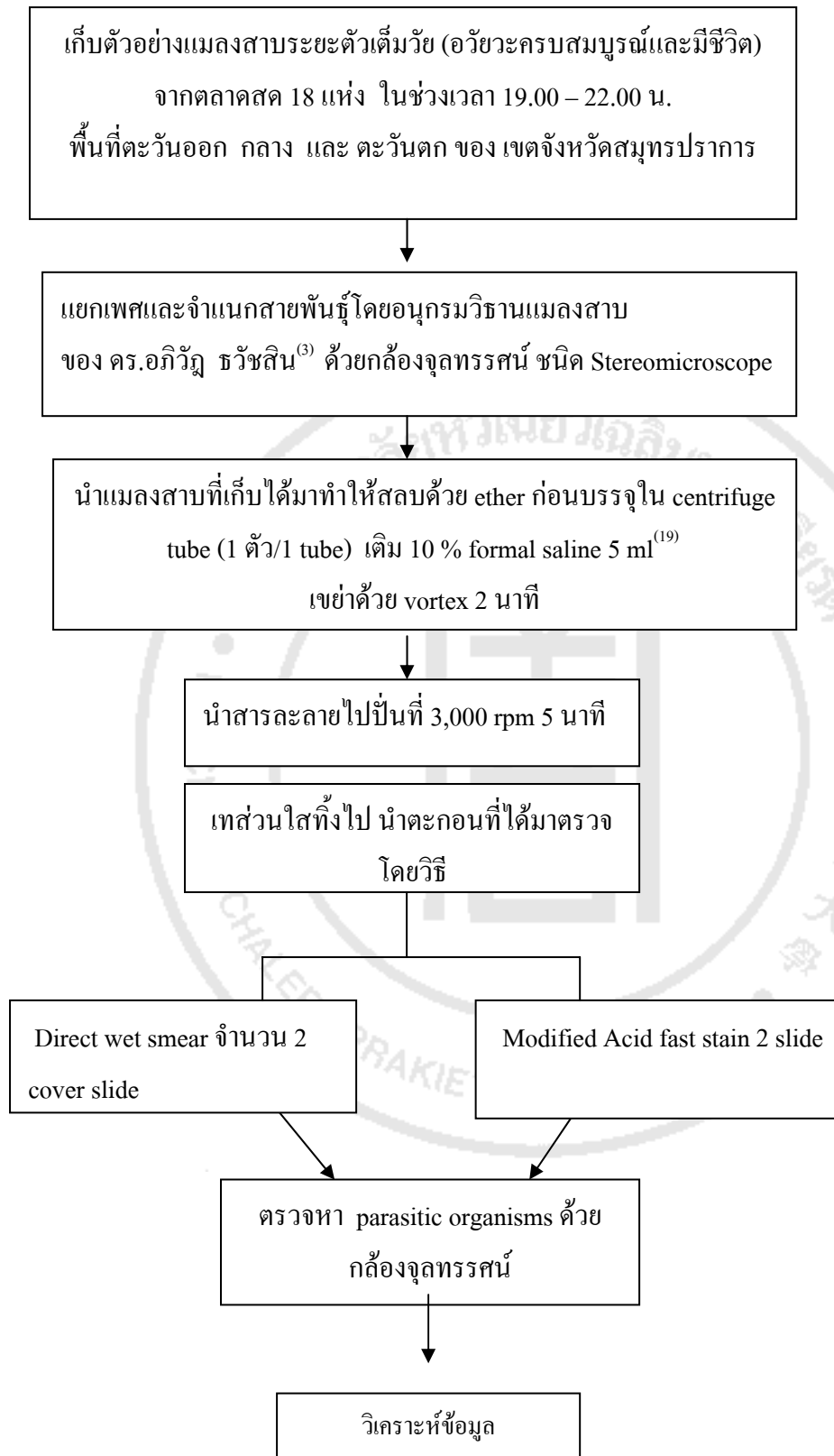
2. คำนวณจำนวนแมลงสาบที่พบเชื้อปรสิตบน Cuticle ต่อจำนวนแมลงสาบทั้งหมด โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\% \text{ แมลงสาบที่พบเชื้อปรสิต} = \frac{\text{จำนวนแมลงสาบที่พบเชื้อปรสิตบน Cuticle} \times 100}{\text{จำนวนแมลงสาบทั้งหมด}}$$

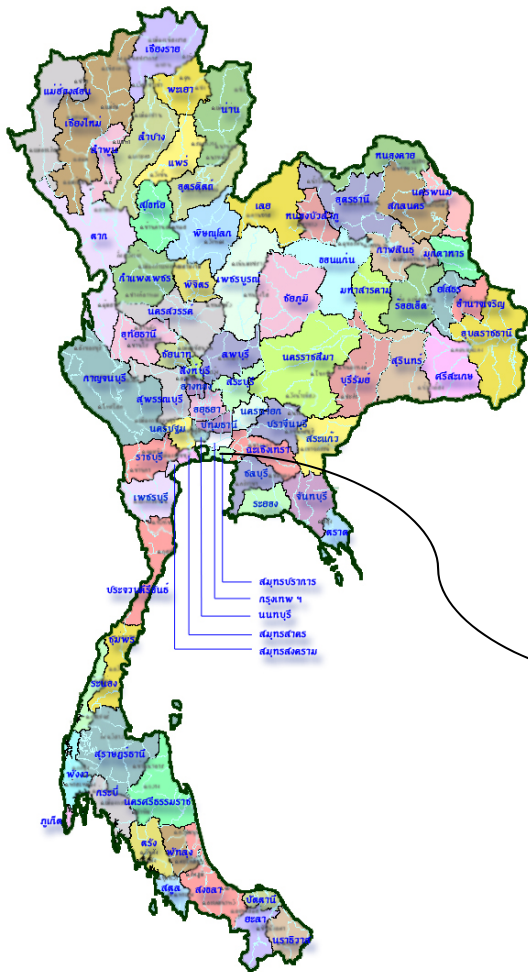
3. คำนวณชนิดของเชื้อปรสิตที่พบบน Cuticle ของแมลงสาบต่อจำนวนแมลงสาบที่พบเชื้อปรสิตทั้งหมด โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\% \text{ ชนิดของเชื้อปรสิตที่พบบนแมลงสาบ} = \frac{\text{จำนวนชนิดของเชื้อปรสิตบน Cuticle} \times 100}{\text{จำนวนแมลงสาบที่พบเชื้อปรสิตทั้งหมด}}$$

### ผังปฏิบัติงาน (Framework)



รูปที่ 45. ผังปฏิบัติงาน



รูปที่ 46. เขตจังหวัดสมุทรปราการ ประเทศไทย

