

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การศึกษางานวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research) มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกและปัจจัยเสี่ยงของโรคแท้งติดต่อในฝูงแพะ อำเภอเมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา โดยวิธี Rose Bengal Test กระบวนการศึกษาเริ่มขึ้นตั้งแต่ การศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง โดยใช้วิธีเก็บรวบรวมข้อมูลจากการรวบรวมเอกสาร (Desk research) ภายหลังจากได้รับข้อมูลจากกลุ่มตัวอย่างครบถ้วนแล้ว จึงทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อสรุปผลการวิจัย โดยในแต่ละกระบวนการมีรายละเอียดดังนี้

3.1 วัสดุอุปกรณ์และอุปกรณ์

1.1 อุปกรณ์

1.1.1 ที่วางหลอดทดลอง (rack)

1.1.2 Monovette

1.1.3 กระเบื้อง

1.1.4 หลอดพลาสติกปิดฝา

1.1.5 ไมโครปิเปต (Micropipette)

1.1.6 ไม้จิ้มฟัน

1.2 เครื่องมือ

1.2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

1.3 สารเคมี

1.3.1 น้ำยา Rose Bengal test (RBT)

1.3.2 แอนติเจนบรูเซลโลซิส ชนิดทดสอบโรสเบงกอล

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 ประชากรที่ใช้ในการศึกษา

ฝูงแพะในอำเภอเมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา ทำการทดลองสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดแพะ รวมทั้งหมด 487 ตัวอย่าง จาก 18 ฟาร์ม จากตัวอย่างตาราง Taro Yamane ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.2.2 การเก็บตัวอย่างเลือด

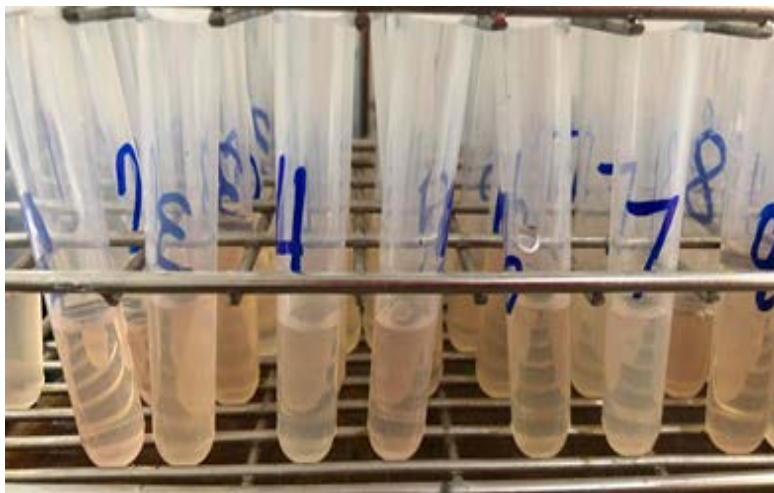
เก็บเลือดแพะที่มีอายุตั้งแต่ 3 เดือนขึ้นไป จากฟาร์มแพะในอำเภอเมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 487 ตัว เก็บตัวอย่างจากหลอดเลือดดำบริเวณคอ (jugular vein) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดเก็บที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (ดังภาพที่ 3.1) และปั่นแยกซีรัม ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แยกซีรัมบรรจุหลอดทดลองพลาสติกปิดฝาให้สนิท ปริมาตร 1 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ดังภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.1 การเจาะเลือดแพะ



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการปั่นซีรัมและแยกซีรัม

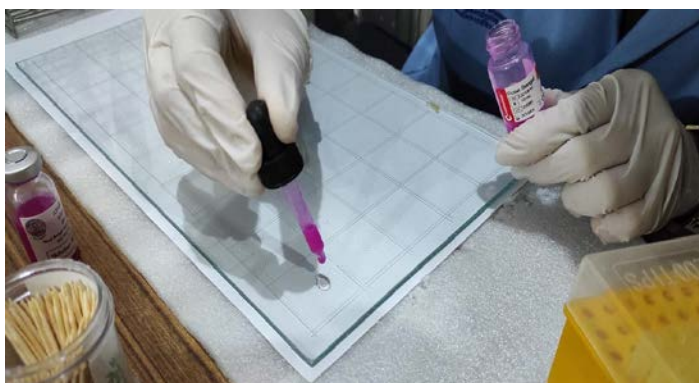


ภาพที่ 3.3 ลักษณะซีรัมที่ปั่น

3.2.3 การทดสอบหาภูมิคุ้มกันต่อโรคแท้งติดต่อ

การทดสอบหาแอนติเจนด้วยวิธี Rose Bengal test (RBT) เป็นแอนติเจนที่ผลิตจากเชื้อ *B. abortus* เชื้อสาย (strain) 1119 -3 ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ การตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยวิธี RBT ตามที่ OIE (2009) ให้คำแนะนำเป็นการตรวจ โดยเบื้องต้น เนื่องจากมีคุณสมบัติของแอนติเจนร่วมกันและมีความไวในการทดสอบต่อโรคแท้งติดต่อ ในแพะ โดยนำซีรัมและแอนติเจนวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนการทดสอบ จากนั้นหยดซีรัมจำนวน 80 ไมโครลิตร และแอนติเจน จำนวน 30 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระเบื้องคนให้เข้ากัน เป็นอย่างดี ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร เอียงกระเบื้องไปมาเพื่อให้เข้ากันดี พักไว้ 4 นาที อ่านผล การเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจน และแอนติบอดีบนแผ่นกระเบื้องภายในระยะเวลา 8 นาที การแปลผล คือ ผลลบ (negative) คือไม่มีการจับกลุ่มของแอนติเจน (no agglutination) และ

ผลบวก (positive) คือ มีการจับกลุ่มของแอนติเจน (agglutination) หากซีรัมให้ผลบวกจะทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี complement fixation test (CFT) โดยการส่งตัวอย่าง ตรวจที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์แพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตอนล่างจังหวัดสุรินทร์ มีวิธีการตรวจตามมาตรฐานของ OIE (2009) ซึ่งสามารถใช้ตรวจยืนยันผลทางซีรัมวิทยา ของโรคแท้งติดต่อได้



ภาพที่ 3.4 ขั้นตอนการหยดซีรัมและแอนติเจน



ภาพที่ 3.5 ผลลบ (negative) คือไม่มีการจับกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดี



ภาพที่ 3.6 ผลบวก (positive) คือ มีการจับกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดี

3.3 การวิเคราะห์และเก็บข้อมูล

เก็บข้อมูลโดยการสัมภาษณ์เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะด้วยแบบสอบถามเกี่ยวกับปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการเกิดโรค布鲁เซลโลซิส ในด้านของเพศ อายุ ขนาดฟาร์ม ประวัติเคยพบโรค การเลี้ยงร่วมกับสัตว์ชนิดอื่น การนำแพะตัวใหม่เข้ามาเลี้ยงฝูง และการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ ในระหว่างการออกปฏิบัติงานเป็นผู้ร่วมสังเกตการณ์ ในกลุ่มสุขภาพสัตว์

ตัวอย่างแบบสอบถามเพื่อการศึกษาปัจจัยเสี่ยงต่อการพบโรคแท้งติดต่อในแพะ

ชื่อ-นามสกุล(นาย/นาง/นางสาว)_____

ที่อยู่_____

ที่ตั้งฟาร์มเลี้ยงแพะ_____

1. จำนวนแพะที่เลี้ยง/เพศ ผู้_____ตัว เมีย_____ตัว
2. อายุแพะภายในฝูง < 4 ปี _____ตัว ≥ 4 ปี _____ตัว
3. จำนวนแพะภายในฝูง < 50 ตัว ≥ 50 ตัว
4. ประวัติเคยพบโรคแท้งติดต่อภายในฟาร์ม
 เคย
 ไม่เคย
5. มีการเลี้ยงแพะร่วมกับสัตว์ชนิดอื่น เช่น โค กระบือ สุกร แกะ
 มี
 ไม่มี
6. มีการนำแพะตัวใหม่เข้ามาเลี้ยงร่วมกับฝูงเป็นประจำ
 มี
 ไม่มี
7. มีการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อโรคภายในฟาร์มเป็นประจำ
 มี
 ไม่มี



ภาพที่ 3.7 ทำแบบสอบถามเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ

3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ปัจจัยของโรคแท้งติดต่อแต่ละปัจจัย โดยการทดสอบสำหรับความเป็นอิสระ (Test for Independence) ด้วยการใช้แบบทดสอบไคสแควร์ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$)

ตั้งสมมุติฐาน

H_0 : ปัจจัยเสี่ยงกับการเกิดโรคแท้งติดต่อเป็นอิสระต่อกัน (ไม่สัมพันธ์กัน)

H_1 : ปัจจัยเสี่ยงกับการเกิดโรคแท้งติดต่อไม่เป็นอิสระต่อกัน (สัมพันธ์กัน)

ปรากฏว่าไม่พบปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์กับการตรวจผลบวกทางซีรัมวิทยาต่อโรคแท้งติดต่อ เนื่องจาก χ^2_{cal} มีค่าน้อยกว่า $\chi^2_{critical}$ แปลว่ายอมรับ H_0 และค่า P-Value มีค่ามากกว่า 0.05