

อุปกรณ์และวิธีการทำวิสัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิสัย

ก. ยาฆ่าแมลง

ยาฆ่าแมลงที่ใช้ทดสอบทุกชนิดได้รับจาก ดร. ชูศักดิ์ ประสิทธิ์สุข หัวหน้าฝ่ายวิสัย
ประยุกต์ กองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ และยา
เหล่านี้ ดร. ชูศักดิ์ รับมาจากบริษัทผู้ผลิตโดยตรง

1. ยาฆ่าแมลงประเภทไพรีทรอยด์

1.1 permethrin

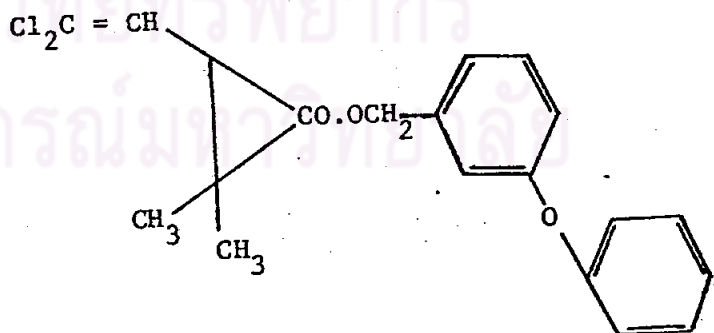
ชื่อเคมี 3-phenoxybenzyl (+)-3-(2,2-dichlorovinyl)

2,2-dimethylcyclopropane carboxylate

ชื่ออื่น Ambush, Ambushfog, Perthrine, Kafil, Coopex,

Perigen, Stomoxin

สูตรโครงสร้าง



ชนิดที่ใช้ Technical grade 92.0 %

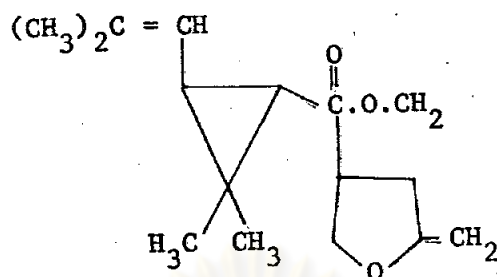
1.2 bioresmethrin

ชื่อเคมี (5-benzyl-3-furyl) methyl-2,2-dimethyl-3

(2-methylpropyl) cyclopropane carboxylate

ชื่ออื่น -

สูตรโครงสร้าง



ชนิดที่ใช้ Technical grade

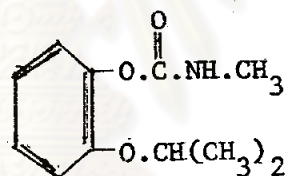
2. ยาฆ่าแมลงประเภทคาร์บาเมต

2.1 propoxur

ชื่อเคมี 2-(1-methylethoxy) phenol methylcarbamate

ชื่ออื่น Baygon, Blattanex, Unden, Sendran, Aprocarb

สูตรโครงสร้าง



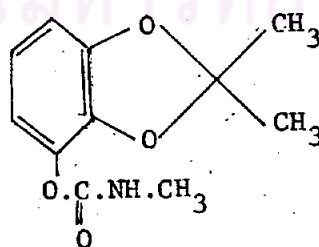
ชนิดที่ใช้ Technical grade 99.3 %

2.2 bendiocarb

ชื่อเคมี 2,2-dimethyl-1,3-benzodioxol-4-yl methyl carbamate

ชื่ออื่น Ficam

สูตรโครงสร้าง



ชนิดที่ใช้ Technical grade 97.0 %

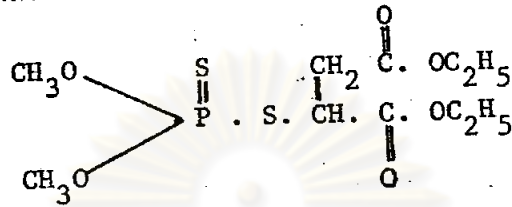
3. ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต

3.1 malathion

ชื่อเคมี 0,0-dimethyl phosphorodithioate ester of diethyl mercaptosuccinate

ชื่ออื่น Cythion, Emmatos, Malathion, Chemathion

สูตรโครงสร้าง



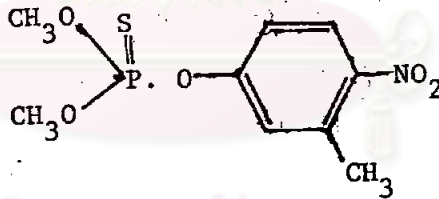
ชนิดที่ใช้ Technical grade 95.0%

3.2 Fenitrothion

ชื่อเคมี 0,0-dimethyl 0-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate.

ชื่ออื่น Sumithion, Folithion, Accothion, Cytel, Cyfen

สูตรโครงสร้าง



ชนิดที่ใช้ Technical grade 97.0 %

ข. สัตว์ที่ใช้ทดลอง

1. ยุงก้นปล่อง 3 สายพันธุ์ (strain)

1.1 Anopheles (Cel.) dirus สายพันธุ์ SEAD (= An. balabacensis)

นำยุงสายพันธุ์นี้มาจากหน่วยวิจัยทางการแพทย์ สโป. และเลี้ยงไว้ที่ห้องเลี้ยงแมลงกองมาลาเรีย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2515 มีความสามารถในการนำเชื้อไข้มมาลาเรียได้ดีมากในห้องปฏิบัติการ

1.2 An. (Cel.) dirus สายพันธุ์ Lampang

นำยุงสายพันธุ์นี้มาจากท้องที่ในเขตจังหวัดลำปางและเลี้ยงไว้ที่ห้องเลี้ยงแมลงกองมาลาเรีย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2522 เป็นยุงพาหะนำเชื้อไข้มมาลาเรียในธรรมชาติ พบว่ามีความชุกชุมในท้องที่ป่าดิบ วางไข่ในแหล่งน้ำขังในป่าที่มีหญ้าปกคลุมล้นน้ำใหญ่มีแดดส่องถึง

1.3 An. (Cel.) minimus สายพันธุ์ Saraburi

นำยุงสายพันธุ์นี้มาจากท้องที่ตำบลเขาวง อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี และเลี้ยงไว้ที่ห้องเลี้ยงแมลงกองมาลาเรีย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2522 เป็นยุงพาหะนำเชื้อไข้มมาลาเรียในธรรมชาติ พบว่ามีความชุกชุมในท้องที่ป่าบุกเบิกท้องที่ภูเขาที่มีลำธารน้ำไหล ชอบวางไข่ในลำธารน้ำใสไหลริน

2. หนูตะเภา Cavia porcellus ได้รับจากห้องเลี้ยงแมลงฝ่ายวิจัยประยุกต์

กองมาลาเรีย กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ

ค. วัสดุที่ใช้เลี้ยงแมลง

1. สำลี
2. หลอดหยด
3. ไม้พันสำลี
4. ผ้าขาวบาง
5. ถ้วยกระดาษ
6. Insect pin
7. ฝาคลุมกรงเลี้ยงยุง
8. อาหารสุนัขซีพี รลดับ
9. หลอดทดลองขนาดกลาง
10. กระดาษกรองวัดแมน เบอร์ 1
11. ถ้วยสังกะสี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 cm. และ 20 cm.
12. เครื่องปั๊มอากาศ (Pressure vaccuum pump)
13. วิตามินขององค์การเภสัชกรรม (Panvitamin Syrup)
14. ถาดเพาะเลี้ยงลูกน้ำยุงขนาด 2.5 x 34 x 8 cm.
15. กรงเลี้ยงยุงขนาด 20 x 20 x 20 cm., 30 x 30 x 30 cm. และ 36 x 70 x 28 cm

009963



ง. เครื่องมือที่ใช้ศึกษา

1. ไฮโกรมิเตอร์
2. เทอร์โมมิเตอร์
3. นาฬิกาตั้งเวลา
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า
5. ขวดเตรียมล้าร
6. กระจกวัตแมน เบอร์ 1
7. pipette filler
8. Aspirator
9. Petri dish
10. หลอดทดสอบยุงตัวเต็มวัยขององค์การอนามัยโลก
11. ปีเปต ขนาดปริมาตร 1 cm³ และ 5 cm³

จ. สารเคมีอื่น ๆ

1. อีเทอร์
2. อะซิโตน
3. คลอโรฟอร์ม
4. olive oil
5. silicone fluid
6. dioctyl phthalate

วิธีดำเนินการวิจัย

ทำการทดลองตามเทคนิควิธีการขององค์การอนามัยโลก (Anonymous, 1970)

ในการหาความไวต่อพิษหรือความต้านทานต่อยาฆ่าแมลงของยุงตัวเต็มวัย

1. การเลี้ยงยุงก้นปล่อง An. (Cel.) dirus และ An. (Cel.) minimus

ทำการเพาะไขยุงก้นปล่องในถ้วยสังกะสีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 cm, ที่รองด้วย กระจกกรองวัตแมน เบอร์ 1 และมีน้ำอยู่ประมาณ 1 ใน 3 ของถ้วย ไข่ของยุงก้นปล่องเป็น ฟองเดี่ยว ๆ ระยะเวลาที่ไข่จะฟักเป็นตัวขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ภายใต้อุณหภูมิต่ำก็ช้าแต่ถ้าอากาศ อบอุ่นก็เร็วระยะเวลาในการฟักตัวของยุงทั้งชนิด An. (Cel.) dirus และ An. (Cel.)

minimus โดยเฉลี่ยประมาณ 2-3 วัน (Esah and Scanlon 1966, Vanicha, 1982) เมื่อไข่ฟักเป็นตัวแล้วถ่ายยุง An. (Cel.) dirus ลงสู่ถาดเพาะเลี้ยงขนาด 25 x 34 x 8 cm. ที่ใส่น้ำไว้ประมาณ 1 ใน 3 ของถาด (2,000 cm³) ส่วนยุง An. (Cel.) minimus ถ่ายลงสู่ถ้วยสังกะสีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 cm. ก่อนเป็นเวลาประมาณ 5-7 วัน จึงถ่ายลงถาดเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับยุง An. (Cel.) dirus พร้อมทั้งใส่น้ำไว้ด้วย เพื่อให้ลูกน้ำเจริญเติบโตได้ดี (Vanicha, 1982) ให้อาหารสุนัข ซีพี รสตัด (ของบริษัท เจริญโภคภัณฑ์ จำกัด) ที่บดละเอียดแล้วแก่ลูกน้ำอย่างน้อยวันละ 2 ครั้ง โดยโรยให้ครั้งละน้อย ๆ เพราะถ้าอาหารมากเกินไปจะทำให้หน้าเป็นเมือก ลูกน้ำจะตายได้ง่าย ในขณะที่เลี้ยงลูกน้ำถ้าพบว่า หน้าเป็นเมือกต้องเปลี่ยนน้ำใหม่ทันที และถ้ามีฝ้าปรากฏขึ้นที่ผิวน้ำก็ใช้กระดาษกรองและขับออกให้หมด

ลูกน้ำยุงก้นปล่องจะมีการลอกคราบในน้ำ 4 ครั้ง การลอกคราบแต่ละครั้งตัวจะโตขึ้นและขนต่าง ๆ ก็เจริญขึ้นตามลำดับ เมื่อกลอกคราบครั้งที่ 3 แล้ว ลูกน้ำจะเจริญเต็มที่เรียกว่า ลูกน้ำระยะที่ 4 (fourth instar larva) ระยะตั้งแต่ฟักเป็นลูกน้ำระยะแรกจนพ้นการเป็นลูกน้ำระยะที่ 4 (larval stage) จะใช้เวลาประมาณ 7 - 21 วัน (เลี้ยงที่อุณหภูมิเหมาะสม 10 - 15° C) สำหรับยุง An. (Cel.) dirus (Esah และ Scanlon, 1966) และประมาณ 26 วัน สำหรับยุง An. (Cel.) minimus (Wilkinson และคณะ, 1974) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิภายในห้องเลี้ยงแมลง เมื่อลูกน้ำระยะที่ 4 เจริญโตขนาดแล้วจะลอกคราบก่อนเป็นดักแด้หรือไ้โมง (pupa) มันจะโค้งส่วนหัวลง หยุดกินอาหาร และเคลื่อนไหวช้าลง เมื่อถึงระยะนี้จะใช้ dropper ตูดักแด้ยุงใส่น้ำด้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 cm. บรรจุน้ำประมาณ 2 ใน 3 ของถ้วย นำไปวางในกรงเลี้ยงยุง ระยะดักแด้ของยุง An. (Cel.) dirus และ An. (Cel.) minimus ใช้เวลา $1\frac{1}{2}$ - 2 วัน (Scanlon และ Sandhinand, 1965) และ 2-3 วัน (Wilkinson และคณะ, 1974) ตามลำดับก็จะเจริญเป็นตัวเต็มวัยเลี้ยงอาหารยุงตัวเต็มวัยด้วยวิตามินขององค์การเภสัชกรรม เข้มข้น 10% โดยใช้สำลีชุบพันรอบแท่งไม้ขนาดเล็ก และต้องเปลี่ยนทุก ๆ 3 วัน เพราะวิตามินจะบูด เมื่อยุงมีอายุ 3-5 วัน ยุงก็พร้อมที่จะผสมพันธุ์ ดังนั้นจึงต้องให้อาหารเลือดโดยนำหนูตะเภาที่ถูกตัดขนบางส่วนออกมาใส่กรงขนาดพอดีตัว เพื่อให้ยุง An. (Cel.) dirus ตูดเลือดกินได้ง่าย ส่วนยุง An. (Cel.) minimus จะให้กินเลือดคนเป็นอาหารแทนโดยผู้เลี้ยงยื่นมือเข้าไปวางในกรงให้ยุงกัดเลือดจนอิ่ม เมื่อยุงกินเลือดอิ่มแล้วนำมาผสมพันธุ์กับตัวผู้โดยใช้วิธีผสมเทียม (artificial mating) ของ Baker และคณะ (1962) เพราะยุงก้นปล่องไม่ผสมพันธุ์กันเองภายในกรง

ขนาดที่ใช้เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เมื่อยุงตัวเมียผสมติดแล้วใส่เข้าไปในกรง เพื่อให้วางไข่ในถ้วยสังกะสีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 cm ที่รองด้วยกระดาษกรอง และใส่น้ำไว้ประมาณ 1 ใน 3 ของถ้วย หลังจากยุงวางไข่ในตอนกลางคืนแล้ว รุ่งเช้านำถ้วยที่มีไข่ยุงออกมาจากกรงตั้งไว้ให้ฟักเป็นตัวเอง และในเวลาบ่าย ๆ ใส่น้ำที่จะให้ยุงวางไข่เข้าไปไว้ในกรงใหม่ ยุง An. (Cel.) minimus จะวางไข่เป็นเวลา 3-15 วันหลังผสมพันธุ์ (Wilkinson และคณะ, 1974) และในระยะนี้ต้องให้อาหารเลือดทุกวัน จากการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการอุณหภูมิระหว่าง 26 - 28°C และความชื้นสัมพัทธ์ 60-80% พบว่ายุงตัวเมียบที่ผสมพันธุ์แล้วมีชีวิตอยู่ได้ 7-40 วัน (Esañ และ Scanlon, 1966)

2. เตรียม Stock solution ของยาฆ่าแมลงแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 10% เก็บใส่ขวดไวท์ที่อุณหภูมิ 4 - 6°C

ซึ่งยาฆ่าแมลงที่เป็นผง (bendiocarb และ propoxur) และชนิดที่เป็นผลึก (permethrin และ bioresmethrin) อย่างละ 1 กรัม แยกใส่ในถ้วยที่ละลายชนิดที่ 1 (9 cm³) คือ dioctyl pthalate, olive oil, silicone fluid และ olive oil สำหรับ bendiocarb, propoxur, permethrin และ bioresmethrin เรียงตามลำดับ จะได้สารละลายเข้มข้น 10%

บีเปตยาฆ่าแมลงที่เป็นของเหลว (malathion และ fenitrothion) อย่างละ 1 cm³ แยกใส่ในถ้วยที่ละลายชนิดที่ 1 (9 cm³) คือ olive oil ซึ่งเป็นตัวทำละลายทั้งของ malathion และ fenitrothion จะได้สารละลายเข้มข้น 10%

เตรียมยาฆ่าแมลงแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 1% ได้โดยบีเปตสารละลายแต่ละชนิดมา 1 cm³ ใส่ในถ้วยที่ละลายชนิดที่ 1 จำนวน 9 cm³ และทำให้ได้ความเข้มข้นเท่าที่ต้องการ โดยอาศัยวิธีการเดียวกัน

3. เตรียมกระดาษยาฆ่าแมลงโดยใช้กระดาษวัดแมน เบอร์ 1 ตัดให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 12 x 15 cm. (180 cm²) ตัดสารละลายยาฆ่าแมลงจำนวน 0.7 cm³ ใสลงในขวดเตรียมสารที่มีตัวทำละลายชนิดที่ 2 จำนวน 1.8 cm³ จะได้สารละลายยาฆ่าแมลงเป็น 2.5 cm³ ในการผสมขึ้นนี้ถ้าตัวทำละลายชนิดที่ 1 เป็น silicone fluid จะใช้คู่กับตัวทำละลายชนิดที่ 2 คือ คลอโรฟอร์ม และถ้าตัวทำละลายชนิดที่ 1 เป็น olive oil หรือ dioctyl pthalate จะใช้คู่กับตัวทำละลายชนิดที่ 2 คือ อะซีโตน

ใช้ปีเปตขนาด 1 cm³ ดูดสารละลายยาฆ่าแมลงที่ผสมกับตัวทำละลายชนิดที่ 2 แล้วค่อย ๆ ปล่อยลงบนผิวของกระดาษด้านหยาบให้กระจายอย่างสม่ำเสมอ

นำกระดาษที่ฉาบยาฆ่าแมลงแล้วตากไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวทำละลายชนิดที่ 2 ระเหยไปจนหมด

4. ทดลองหาความสัมพันธ์มาตรฐานและช่วงเวลาเป็น logarithmic series ของยาฆ่าแมลงแต่ละชนิดที่ทำให้ยุงตัวเต็มวัยตายจากน้อยไปหามาก โดยให้อัตราการตายต่ำกว่าร้อยละ 50 และสูงสูดร้อยละ 100 หรือใกล้เคียง

5. ทดสอบความเป็นพิษของยาฆ่าแมลงแต่ละชนิดตามความเข้มข้นและช่วงเวลาที่หาได้จากข้อ 4 ตามวิธีการทดสอบขององค์การอนามัยโลก (Anonymous, 1970) ดังนี้

5.1 นำกระดาษที่ฉาบยาฆ่าแมลงความเข้มข้นมาตรฐานที่หาได้ของยาฆ่าแมลงแต่ละชนิดใส่ลงในหลอดทดสอบจุดแดง

5.2 ใช้ aspirator ดูดยุงเพศผู้และเพศเมียอายุ 1 วัน แยกใส่หลอดทดสอบจุดเขียว ซึ่งใส่กระดาษธรรมดาไว้ ซ้ำละ 30 ตัว

5.3 ถ่ายยุงจากหลอดทดสอบจุดเขียวเข้าไปในหลอดทดสอบจุดแดง ปล่อยให้ยุงเกาะเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน 5 ช่วงเวลา เช่น 7.5, 15, 30, 60 และ 120 นาที แล้วถ่ายยุงกลับเข้าสู่หลอดทดสอบจุดเขียว ใส่ลีสส์ซูบิโตะมินเข้มข้น 10% วางบนหลอดทดสอบจุดทั้งไว้ 24 ชั่วโมง

5.4 ทดลอง 8 ซ้ำ ต่อหน่วยเวลาและทุกซัปดาห์กลุ่มควบคุมซึ่งใส่ตัวทำละลายชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 ฉาบบนกระดาษ

5.5 คัดอัตราการตายของยุงโดยคำนวณจากสูตรของแอบบอทท์หรือ Abbott's formular

$$\text{อัตราการตาย (ร้อยละ)} = \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มทดลอง (ร้อยละ)} - \text{อัตราการตายของกลุ่มควบคุม (ร้อยละ)}}{100 - \text{อัตราการตายของกลุ่มควบคุม (ร้อยละ)}} \times 100$$

(Anonymous, 1970)

จะใช้สูตรนี้เมื่ออัตราการตายของกลุ่มควบคุมอยู่ระหว่างร้อยละ 5-20 ถ้าต่ำกว่าร้อยละ 5 ไม่ควรนำมาคิด ถ้าสูงกว่าร้อยละ 20 ต้องทำการทดลองใหม่

5.6 เขียนกราฟระหว่างระยะเวลาที่ยุงเกาะบนกระต๊ากที่ฉาบน้ำฆ่าแมลงกับอัตราการตายเป็นร้อยละในกระต๊ากกราฟโดยใช้ Probit-log scale และสร้างสมการเส้นตรงจากข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ของ Probit analysis (Finney และ Tattersfield, 1952) อ่านค่า LT_{50} และ LT_{90} จากกราฟที่ได้

5.7 ศึกษาเปรียบเทียบความเป็นพิษของยาฆ่าแมลงกับยุงที่มีสภาวะทางชีววิทยาแตกต่างกันบางประการ

5.7.1 ทดสอบความเป็นพิษของยาฆ่าแมลง permethrin, fenitrothion และ bendiocarb กับยุง An. (Cel.) dirus สายพันธุ์ SEAD อายุ 3 วัน และ 5 วัน ที่กินเลือดแล้วกับไม่ได้กินเลือดตามวิธีการข้อ 5.1 - 5.6

5.7.2 เปรียบเทียบความเป็นพิษของยาฆ่าแมลงแต่ละชนิดระหว่างยุงเพศผู้กับเพศเมีย อายุ 1 วัน, ยุงอายุ 3 วัน ที่กินเลือดแล้วกับไม่ได้กินเลือด, ยุงอายุ 5 วัน ที่กินเลือดแล้วกับไม่ได้กินเลือด, ยุงอายุ 3 วัน กับอายุ 5 วัน ที่กินเลือดแล้ว และยุงอายุ 3 วัน กับ 5 วัน ที่ไม่ได้กินเลือด

5.8 เปรียบเทียบความเป็นพิษของยาฆ่าแมลงทั้ง 6 ชนิดต่อยุงทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยนำค่าความเข้มข้นของยาฆ่าแมลงแต่ละชนิดที่ใช้ศึกษาคูณกับค่า LT_{50} ของยาฆ่าแมลงชนิดนั้นๆ

6. การวิเคราะห์ผล ใช้วิธีการทางสถิติเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลดังนี้

6.1 หาค่าเฉลี่ยการตายของยุงจากการทดลอง 8 ซ้ำ โดยใช้สูตรหาค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean)

$$\bar{X} = \frac{\sum xi}{n}$$

6.2 หาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Diviation)

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum (xi - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

6.3 เปรียบเทียบอัตราการตายของยุงแต่ละประเภทเพื่อแสดงความแตกต่างของยาฆ่าแมลงแต่ละชนิดกับยุงนั้น ๆ โดยใช้ Chi-square (X^2) จากตารางสำเร็จแบบ

2 x 2

	A	B	
x	a	b	a + b
y	c	d	c + d
	a + c	b + d	N

$$\chi^2 = \frac{(|ad - cb| - \frac{1}{2} N)^2}{N(a+b)(a+c)(b+d)(c+d)}$$

(ล่ายยค้, 2519)

ความหมายอักษรย่อในสูตร

- \bar{X} = ค่าเฉลี่ยเลขคณิต
- S.D. = ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน
- X_i = ข้อมูลของแต่ละหน่วยเวลา
- n = จำนวนกลุ่มตัวอย่าง
- χ^2 = Chi - square
- x = ชนิดของถุงที่ 1
- y = ชนิดของถุงที่ 2
- A = ถุงที่ตาย
- B = ถุงที่ไม่ตาย
- a, c = อัตราการตายของถุง (ร้อยละ)
- b, d = อัตราที่ถุงไม่ตาย (ร้อยละ)
- N = ผลรวมของข้อมูลทั้งหมด