

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

ขั้นตอนและวิธีการวิจัย (Research Procedures)

1. ตัวอย่างในการวิจัย (Sample for research)

1.1 โคนมพันธุ์ผสมไฮลันด์สไตน์ฟรีเซียน อยู่ในอำเภोधาราม
อำเภอบางแพ อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี

1.2 ฟาร์มโคนมขนาดใหญ่คือ ฟาร์มที่มีแม่โครีดนมประมาณ
250 ตัว และฟาร์มโคนมขนาดย่อยคือ ฟาร์มที่มีแม่โครีดนมประมาณ 15 ตัว
โคนมที่เก็บตัวอย่างจากฟาร์มขนาดใหญ่ 33 ตัว และฟาร์มขนาดย่อย 57 ตัว
รวมทั้งหมด 90 ตัว (ตารางที่ 2)

1.3 แม่โคนมที่คลอดลูกมาประมาณ 30 วัน ที่มีประวัติให้ลูกมาแล้ว
1-7 ตัว

1.4 ตัวอย่างที่ศึกษาวิจัยคือ น้ำเมือกจากมดลูกโคนมที่พบลักษณะ
น้ำเมือกจากคอมดลูกขุนผิดปกติ จากฟาร์มขนาดใหญ่ 15 ตัว และฟาร์มขนาด
ย่อย 36 ตัว รวมทั้งหมด 51 ตัว (ตารางที่ 3)

2. ระยะเวลาศึกษาวิจัย (Duration)

6 เดือนเริ่มตั้งแต่ เดือนพฤษภาคม ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ.2536

3. การตรวจโคนม (Physical examination)

3.1 ตรวจโคนมและให้คะแนนรูปร่าง (body condition
score, BCS) ตามหลักเกณฑ์การให้คะแนน 0-5 (Patton et al.,
1988)

3.2 ตรวจช่องคลอด โดยทำความสะอาดบริเวณปากช่องคลอด
ด้วยน้ำและน้ำผสมน้ำยาฆ่าเชื้อ ใช้เครื่องส่องช่องคลอด (vaginal
speculum) ตรวจดูลักษณะ เยื่อเมือกช่องคลอดและน้ำเมือกจากบริเวณคอมดลูก

3.3 ตรวจจ้อวัยวะสืบพันธุ์ โดยการส่องคลำผ่านทางทวารหนัก เพื่อตรวจการกลับเข้าสู่ของมดลูก (uterine involution) และการทำงานของรังไข่ (ovary) รังไข่ทำงานจะตรวจพบ CL หรือฟอลลิเคิล ถ้ารังไข่ไม่ทำงานตรวจไม่พบ CL หรือฟอลลิเคิล หรือบางกรณีที่เกิดเป็นถุงน้ำที่รังไข่ (ovarian cyst)

4. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างมดลูกเพื่อทำการเพาะเชื้อ (Equipment)

4.1 เครื่องมือเก็บตัวอย่างจากมดลูกเพื่อทำการเพาะเชื้อ ทำด้วยท่ออลูมิเนียมขนาดความยาว 41.5 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 ซม. ปลายด้านหนึ่งปิดตัน และโค้งมนจากปลายด้านนี้ประมาณ 1.5 ซม. เจาะเป็นช่องขนาด 1.5 x 0.5 ซม. ปลายอีกด้านหนึ่งเจาะเป็นรูเล็ก ๆ ด้านเดียวกับที่เจาะช่อง เพื่อเป็นจุดสังเกตขณะเก็บตัวอย่าง (ภาพที่ 1, B)

4.2 ท่อพลาสติกสำหรับการผสมเทียม* (plastic breeding sheath) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ปลายด้านหนึ่งเจาะเป็นช่องขนาด 1.5 x 0.5 ซม. เช่นเดียวกับท่ออลูมิเนียม และปลายอีกด้านทำเครื่องหมายเพื่อเป็นจุดสังเกตขณะเก็บตัวอย่างเช่นกัน (ภาพที่ 1, C)

4.3 ก้านสำลี (cotton swab) ก้านทำด้วยไม้ยาว 45 ซม. ปลายด้านหนึ่งพันด้วยสำลีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 ซม. ซึ่งจะสอดอยู่ในท่อพลาสติกสำหรับการผสมเทียมและมีผิวด้านหนึ่งโผล่ตรงช่องที่เจาะได้ (ภาพที่ 1, D)

4.4 ช่องพลาสติก (sanitary sheath)** ใช้สำหรับสวมเครื่องมือทั้งหมด ขณะสอดผ่านช่องคลอดเข้าสู่คอมดลูกเข้ามดลูกเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจากช่องคลอด (ภาพที่ 1, A)

* IMV ประเทศฝรั่งเศส

** IMV ประเทศฝรั่งเศส

4.5 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (transport media) ใช้ stuart media *** เพื่อเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างนำส่งห้องปฏิบัติการ

4.6 กระจกน้ำแข็ง เพื่อใช้ใส่หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บตัวอย่างส่งตรวจห้องปฏิบัติการ

5. วิธีการเก็บตัวอย่าง (Sample collection technique)

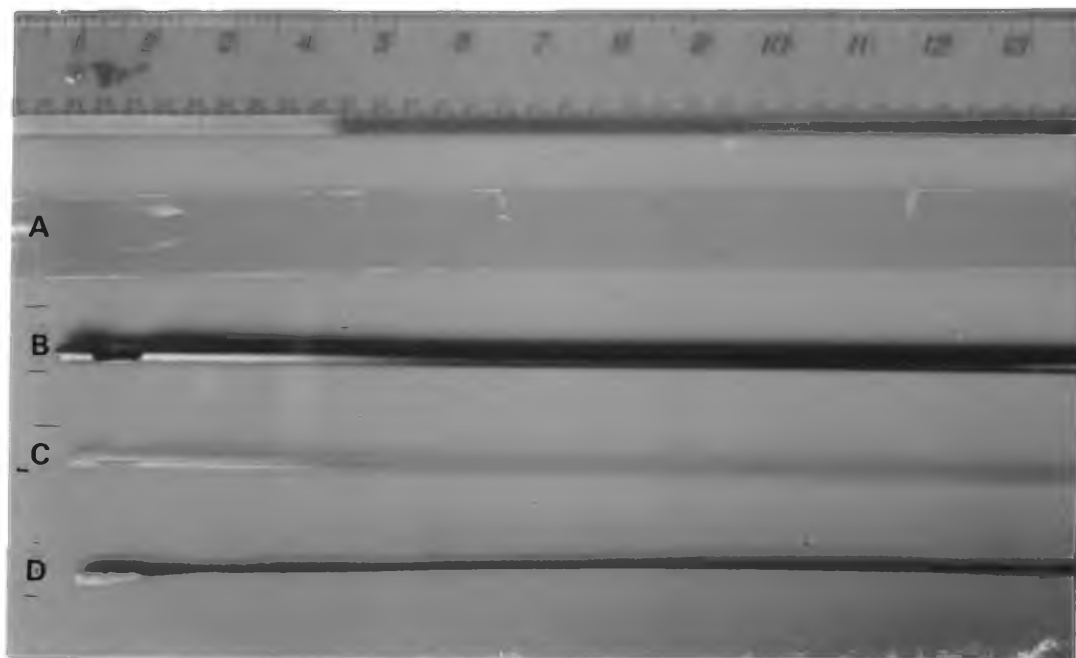
5.1 ทำความสะอาดบริเวณรอบ ๆ อยุ่วะสัปปันธุ์ภายนอก ด้วยน้ำและน้ำผสมน้ำยาฆ่าเชื้อและใช้กระดาษพางซับแห้ง

5.2 เตรียมเครื่องมือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ด้วยวิธี sterilization อุณหภูมิ 121°C. ความดัน 15 ปอนด์/ตร.ซม. นาน 20 นาที

5.3 การเก็บตัวอย่างจะใช้เทคนิคเช่นเดียวกับการผสมเทียมกล้ามเนื้อมือข้างหนึ่งจะสั้วผ่านทวารหนักเพื่อจับคอมดลูก และมืออีกข้างหนึ่งจับเครื่องมือสอดผ่านเข้าปากช่องคลอด และการเตรียมเครื่องมือก่อนการเก็บตัวอย่างให้ช่องที่เจาะที่ท่ออูมิเนียม และช่องที่เจาะที่ท่อพลาสติกอยู่ตรงข้ามกัน ดังนั้นผิวด้านหน้าของก้อนสำลีจะไม่ถูกสัมผัสกับภายนอก แต่เมื่อสอดเครื่องมือผ่านถึงตัวมดลูก แล้วจะหมุนท่อพลาสติกจากปลายด้านนอกที่ทำเครื่องหมายไว้ให้ตรงกับรูเล็กที่เจาะที่ท่ออูมิเนียม ดังนั้นช่องที่เจาะของท่ออูมิเนียมกับช่องเจาะของท่อพลาสติกก็จะตรงกัน ผิวด้านนอกของก้อนสำลีก็จะถูกสัมผัสกับผนังด้านในของมดลูก เครื่องมือจะสวมด้วยของพลาสติกเมื่อสอดผ่านช่องคลอดของพลาสติก จะช่วยป้องกันไม่ให้เครื่องมือปนเปื้อนจากช่องคลอดได้ เมื่อถึงปากมดลูกด้านนอก ดันเครื่องมือให้ทะลุผ่านช่องพลาสติกผ่านเข้าคอมดลูกจนถึงตัวมดลูกใช้มือที่สั้วผ่านทางทวารหนักจับตัวมดลูกให้สัมผัสกับเครื่องมือประมาณ 1 นาที จากนั้นหมุนปลายด้านนอกของท่อพลาสติกให้ตรงที่ทำเครื่องหมายอยู่ตรงข้ามกับรูที่เจาะที่ท่ออูมิเนียม ก็จะทำให้ช่องที่เจาะของท่ออูมิเนียมและช่องที่เจาะท่อพลาสติกอยู่ตรงข้ามกัน เวลาดึงเครื่องมือออกจากตัวโคก้อนสำลีจะไม่สัมผัสสอวัวยะอื่น (ภาพที่ 3)

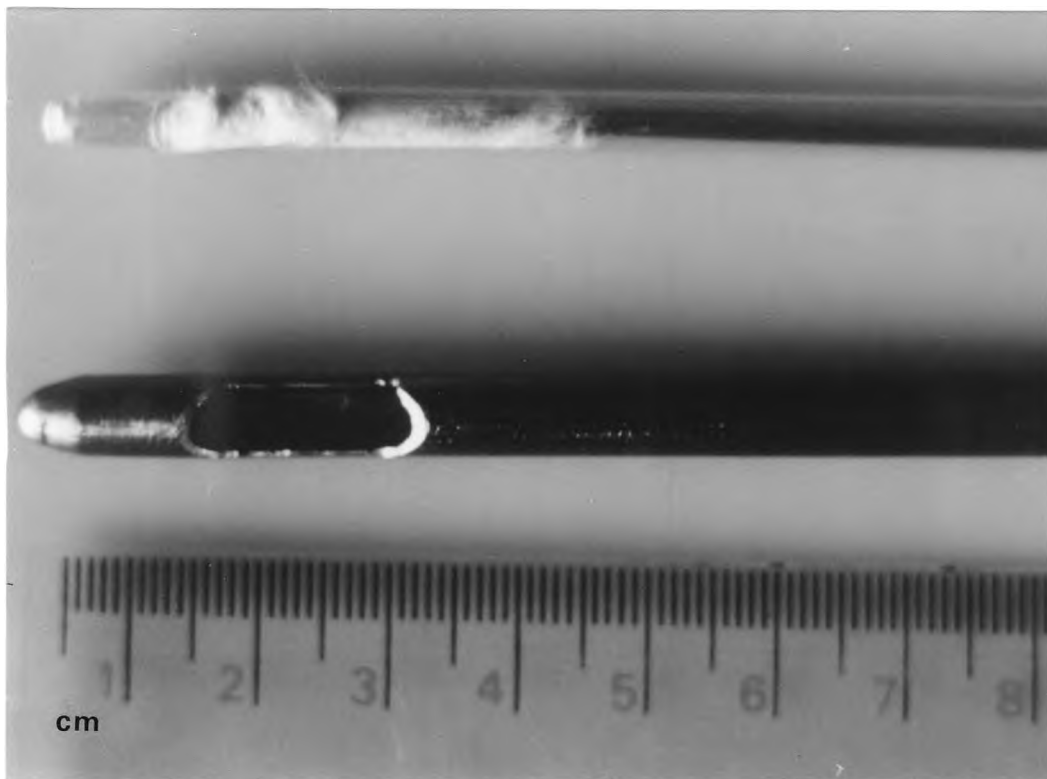
*** เคนคอลแกรมมาตอล ประเทศไทย

5.4 เมื่อนำเครื่องมือออกมา แล้วจึงดึงท่อพลาสติกออกจากท่อ
 อลูมิเนียม นำเอาก้านสำลีสื่อออกจากท่อพลาสติกใส่หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำ
 ใส่กระดิกน้ำแข็ง เพื่อนำไปเพาะเชื้อในห้องปฏิบัติการประมาณ 3-4 ชั่วโมง
 ภายหลังเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 1 อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเพาะเชื้อ

- A. ช่องพลาสติก
- B. เครื่องมือเก็บตัวอย่างเพาะเชื้อ
- C. ท่อพลาสติกสำหรับผสมเทียม
- D. ก้านสำลี



ภาพที่ 2 แสดงปลายเครื่องมือเก็บตัวอย่างและก้านสำลีสที่
สวมอยู่ในท่อพลาสติก



ภาพที่ 3 การเก็บตัวอย่างจากมดลูกโค สอดอุปกรณ์เก็บเชื้อ
ผ่านปากช่องคลอด



ภาพที่ 4 แสดงเครื่องมือที่เก็บตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว



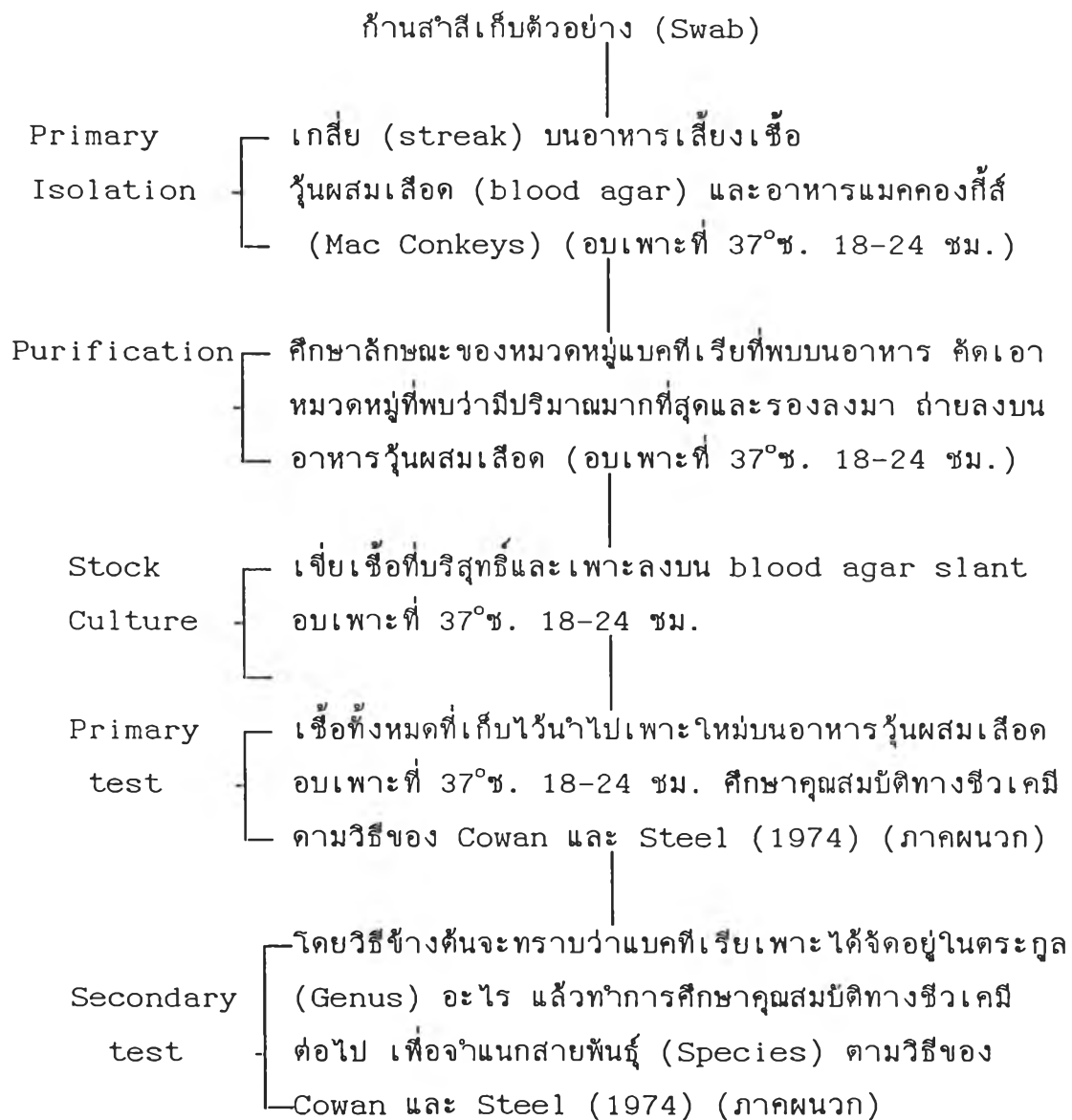
ภาพที่ 5 การเตรียมก้านสำลีที่เก็บตัวอย่าง เพื่อนำใส่หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 6 การนำก้านสำลีที่เก็บตัวอย่างใส่หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ

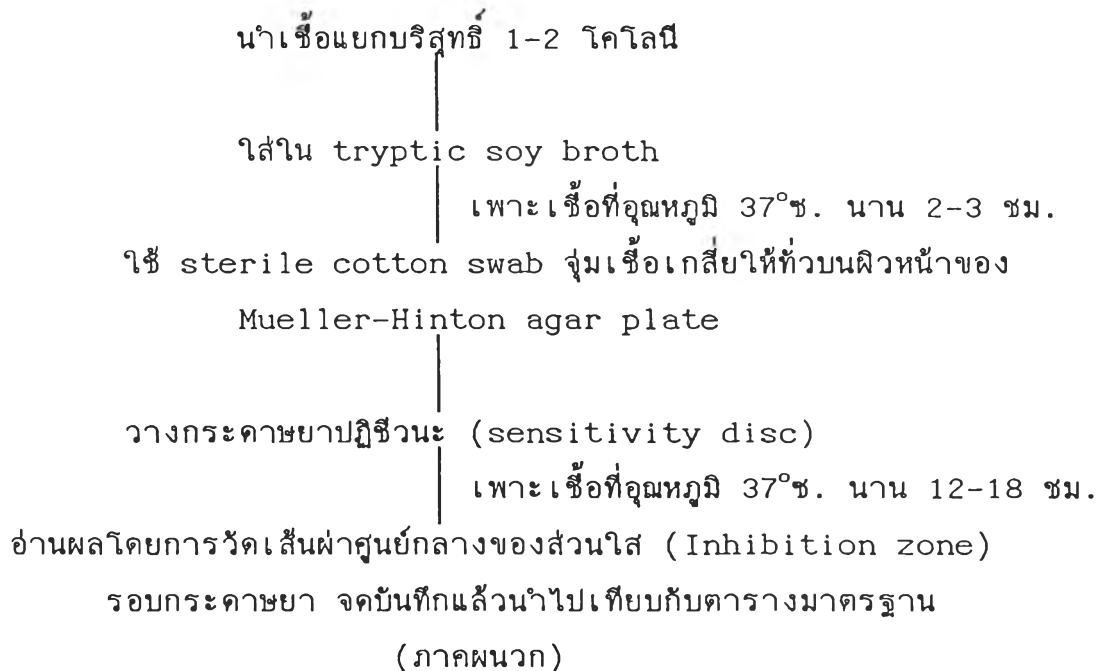
6. การเพาะเชื้อและการหาอัตราความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

6.1 การเพาะเชื้อ



Antibiotic Sensitivity Test

(ทำตามวิธีของ Kirby และ Bauer, 1966)



Standard Sensitivity discs* ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่

- | | |
|-------------------|----------|
| 1. Neomycin | 30 mcg |
| 2. Nitrofurantoin | 300 mcg |
| 3. Streptomycin | 10 mcg |
| 4. Gentamicin | 10 mcg |
| 5. Ampicillin | 10 mcg |
| 6. Erythromycin | 15 mcg |
| 7. Penicillin G | 10 units |
| 8. Tetracycline | 30 mcg |

9. Polymyxin-B	300 units
10. Kanamycin	30 mcg
11. Bacitracin	10 units
12. Colistin	10 units
13. Sulfamethoxazole	
Trimethoprim	125 mcg

1-11 เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จของ Difco Laboratories,
Detroit Michigan, USA

12-13 เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จของ B.B.L. (Becton &
Dickinson and Company), USA

นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดทุกสเตรน ทดสอบการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด การอ่านผลเชื้อแบคทีเรียที่ตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ คือ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนใสรอบกระดาษยาอยู่ในระยะ Susceptible เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ คือ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนใสรอบกระดาษยาอยู่ในระยะ Resistant และ Intermediate รวบรวมผลการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด แสดงผลเป็นร้อยละ