บทที่ 3

วิธีการวิจัย

1. ประชากรและตัวอย่าง

1.1 โคนมที่มีปัญหาผสมซ้ำ เลือกจากฟาร์มเกษตรกร ในอำเภอต่าง ๆ 7 อำเภอ ของจังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 78 ตัว ดังนี้ (ตารางที่ 1)

1.1.1 อำเภอเมือง	4	ตัว
1.1.2 อำเภอเดิมบางนางบวช	4	ตัว
1.1.3 อำเภอบางปลาม้า	6	ตัว
1.1.4 อำเภอศรีประจันต์	26	ตัว
1.1.5 อำเภอดอนเจดีย์	10	ตัว
1.1.6 อำเภอสู่ทอง	16	ตัว
1.1.7 อำเภอหนองหญ้าไซ	12	ตัว
รวม	78	ตัว

2. เกณฑ์การเลือกตัวอย่าง

2.1 เลือกโคนมที่มีประวัติการผสมหลังคลอดมากกว่า 3 ครั้ง แล้วยังไม่ตั้งท้อง โดยพิจารณาจากรายละเอียดในใบสมัครโครงการแก้ไขปัญหาโคนมที่มีปัญหาการผสมติดยาก

2.2 โคที่ทำการศึกษา มีอายุระหว่าง 2-7 ปี เท่านั้น

2.3 ต้องเป็นโคที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง และได้รับการตรวจโลหิตทางห้องปฏิบัติการว่าไม่เป็นโรคแท้งติดต่อ (Brucellosis)

2.4 ต้องเป็นโคนมที่มีรังไข่ ลักษณะรูปทรงปกติทั้ง 2 ข้าง โดยการตรวจด้วยวิธีล้วงคลำผ่านทางช่องทวารหนัก (Rectal palpation)

3. ระยะเวลาในการศึกษา

ระยะที่ 1 เดือนตุลาคม 2537 - เดือนเมษายน 2538

ระยะที่ 2 เดือนตุลาคม 2539 - เดือนเมษายน 2540

ภาพที่ 1 ชุดชะล้างมดลูกโค

ภาพที่ 2 การใช้ชุดชะล้างมดลูกโค แสดงวิธีต่อ Foley catheter เมื่ออัดลมส่วน balloon (ศรชี้) ต่อกับ ท่อยาง Silicone

4. วิธีการศึกษา

4.1 จับคู่โค

แยกเป็นโคนมกลุ่มรักษา และกลุ่มควบคุมกลุ่มละ 39 ตัว โดยเลือกโคที่มีประวัติการผสมหลังคลอดมากกว่า 3 ครั้งแล้วยังไม่ตั้งท้อง ในทุกๆ ฟาร์มที่จะทำการศึกษา ต่อจากนั้นใช้วิธีจับฉลากว่าโคนมตัวใดจะได้อยู่ในกลุ่มรักษา หรือกลุ่มควบคุม โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

4.1.1 แยกจับฉลากเป็นแต่ละอำเภอ รวม 7 อำเภอ

4.1.2 ในฟาร์มที่มีโคนมที่จะทำการศึกษาเป็นเลขจำนวนคู่ จะทำการจับฉลากภายในฟาร์มนั้น ได้กลุ่มรักษา และกลุ่มกลุ่มควบคุม จำนวนเท่าๆ กัน

4.1.3 ในฟาร์มที่มีโคนมที่จะทำการศึกษาเป็นเลขจำนวนคี่ และมีจำนวน มากกว่า 1 ตัว จะทำการจับฉลากในฟาร์มนั้นก่อน ได้กลุ่มรักษา และกลุ่มควบคุม จำนวนเท่าๆ กัน และได้โคที่จะทำการศึกษาเหลืออีก 1 ตัว ซึ่งจะนำไปจับฉลากรวมกับฟาร์มที่มีโคที่จะทำการศึกษาเพียง 1 ตัว ต่อไป

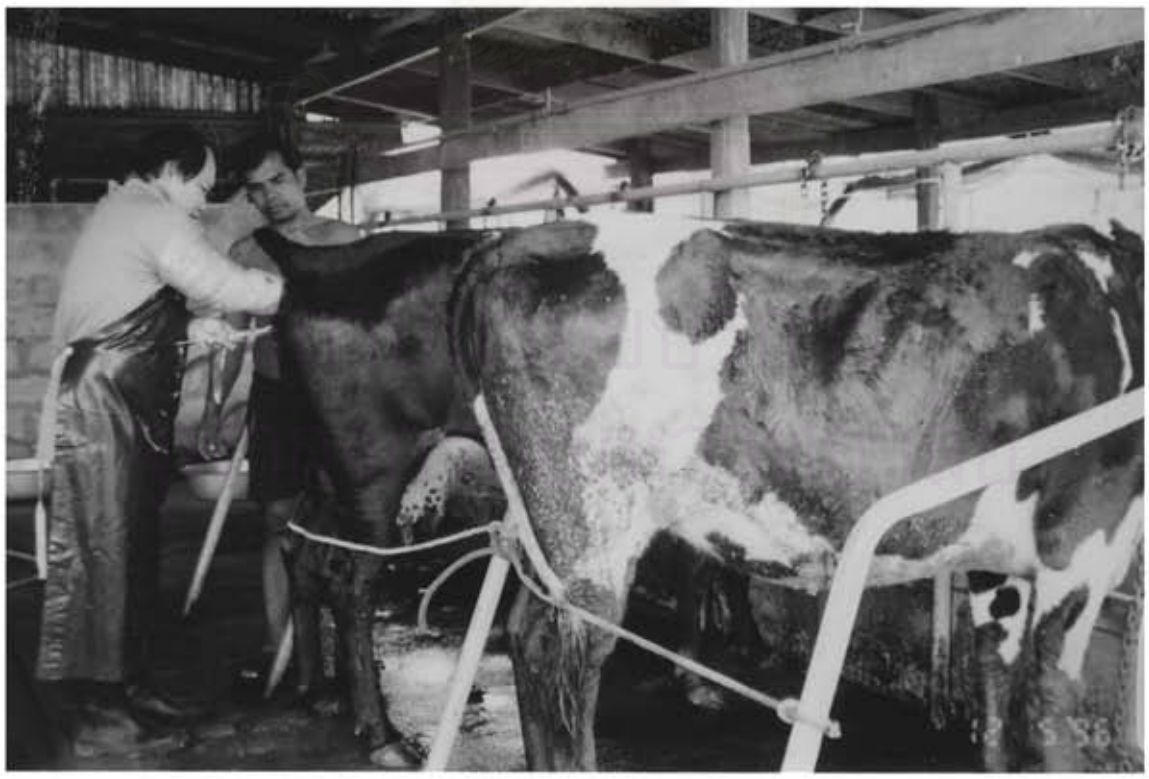
4.1.4 ในฟาร์มที่มีโคนมที่จะทำการศึกษา เพียง 1 ตัว จะนำมาจับฉลากรวมกัน ได้เป็นกลุ่มรักษา และกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกัน

4.2 โคนมกลุ่มรักษา

4.2.1 ทำการเก็บตัวอย่างจากมดลูกด้วย uterine swab ก่อนทำการรักษา และนำตัวอย่างที่ได้ส่งห้องปฏิบัติการ เพื่อเพาะหาเชื้อแบคทีเรีย ชนิดที่ต้องการอ๊อกซิเจนในการเจริญเติบโต และทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ (สาโรช งามขำ, 2537)

4.2.2 ชุดอุปกรณ์ใช้สำหรับชะล้างมดลูกโค แสดงไว้ในภาพที่ 1 ประกอบด้วยสายยางซิลิโคน (Dura®) 2 เส้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 10 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 7 มิลลิเมตร ยาว 1.0 และ 1.10 เมตร ตามลำดับ ต่อด้วย Y-connecter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร Folley catheter NO 18 ชุดขยายคอมดลูก (cervical dilater) K-Y jelly 1 หลอด ไซริ้งจพลาสติก ขนาด 20 มล. 1 อันสำหรับอัดลมในท่อ Foley catheter และforceps 3 อันสำหรับหนีบท่อสายยางซิลิโคน ชะล้างมดลูกโคด้วยน้ำเกลือ 0.9 % (NaCl 0.9 %) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 ลิตร ผสมด้วยยาปฏิชีวนะ Oxytetracycline Hydrochloride (ชนิดออกฤทธิ์ยาวนาน 20 %) ปริมาตร 5 มล. (1 กรัม) โดยวิธีสอดท่อ Foley catheter # 18 ผ่านคอมดลูก (cervix) โดยที่ให้ Balloon (ภาพที่ 2) อยู่ที่บริเวณ internal os ของคอมดลูก เพื่อทำการชะล้างพร้อมกันทีเดียวทั้งสองปีกมดลูก (ภาพที่ 5)

ภาพที่ 3 เครื่องมือเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 4 การเก็บตัวอย่างจากมดลูกแม่โค เพื่อส่งเพาะเชื้อแบคทีเรียและทดสอบหาความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

4.2.3 เหนี่ยวนำให้เป็นสัด ด้วยโปรสต้าแกลนดิน เอฟ ทู อัล ฟ่า (Lutalyse®) 25 มิลลิกรัม โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ในระยะที่รังไข่คลำพบก้อนเหลือง (corpus luteum)

4.2.4 ทำการเก็บตัวอย่างจากมดลูกด้วย uterine swab ก่อนทำการผสมเทียม (การทดลองที่ 2) และนำตัวอย่างที่ได้ส่งห้องปฏิบัติการ เพื่อเพาะหาเชื้อแบคทีเรีย ชนิดที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต และทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

4.2.5 ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ผลิตจากพ่อโคตัวเดียวกัน และใช้เจ้าหน้าที่ผสมเทียมคนเดียวกัน ในแต่ละคู่ (pair) ชั่วโมงที่ 72 และ 96 หลังฉีดฮอร์โมนโปรสต้าแกลนดิน เอฟ ทู อัลฟ่า น้ำเชื้อโคแช่แข็งที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ผลิตจากพ่อโคพันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเชี่ยนพันธุ์แท้ บรรจุในหลอด ขนาด 0.5 มล. การละลายน้ำเชื้อ ละลายในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 35° ซ นาน 30 วินาที น้ำเชื้อที่ละลายแล้วมี motility rate ไม่ต่ำกว่า 70% (วิชัย ชนาชินาถ, 2532)

4.2.6 ตรวจท้องแม่โคนม ที่ไม่แสดงอาการกลับสัด หลังผสมเทียม 60 วัน โดยวิธีล้วงคลำผ่านทางทวารหนัก (rectal palpation) ในกรณีที่แม่โคแสดงอาการกลับเป็นสัดตั้งแต่ผสมเทียมครั้งแรก จะทำการผสมเทียมครั้งต่อไป ในทุกรอบที่แม่โคแสดงอาการกลับสัดอีก อย่างน้อย 2 ครั้ง ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อโคตัวเดิม และใช้เจ้าหน้าผสมเทียมคนเดิม

4.3 โคนมกลุ่มควบคุม

4.3.1 เหนี่ยวนำให้เป็นสัด ด้วยโปรสต้าแกลนดิน เอฟ ทู อัลฟ่า (Lutalyse®) 25 มิลลิกรัม โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ในระยะที่รังไข่คลำพบก้อนเหลือง

4.3.2 ทำการเก็บตัวอย่างจากมดลูกด้วย Uterine swab ก่อนทำการผสมเทียม (การทดลองที่ 2) และนำตัวอย่างที่ได้ส่งห้องปฏิบัติการ ต่อจากนั้นดำเนินการเช่นเดียวกับ 4.2.4, 4.2.5 และ 4.2.6 ในโคกลุ่มรักษา

4.4 อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างมดลูกเพื่อทำการเพาะเชื้อ (ภาพที่ 3)

4.4.1 เครื่องมือเก็บตัวอย่างจากมดลูกเพื่อทำการเพาะเชื้อ ทำด้วยท่อเหล็กปลอดสนิม ขนาดความยาว 41.5 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ปลายด้านหนึ่งปิดตันและโค้งมน จากปลายด้านนี้ประมาณ 1.5 ซม. เจาะเป็นช่องขนาด 1.5 x 0.5 ซม. ปลายอีกด้านหนึ่งเจาะเป็นรูเล็ก ๆ ด้านเดียวกับด้านที่เจาะช่อง เพื่อเป็นจุดสังเกตขณะเก็บตัวอย่าง

4.4.2 ท่อพลาสติกสำหรับการผสมเทียม (Plastic breeding sheath) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ปลายด้านหนึ่งเจาะเป็นช่องขนาด 1.5 x 0.5 ซม. เช่นเดียวกับท่อเหล็กปลอดสนิม และปลายอีกด้านทำเครื่องหมายเพื่อเป็นจุดสังเกตขณะเก็บตัวอย่างเช่นกัน

4.4.3 ไม้พันสำลี (cotton swab) ใช้สำลีชนิดสำเร็จรูป ก้านทำด้วยพลาสติกยาว 7 ซม. ปลายด้านหนึ่งพันด้วยสำลีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 ซม. ซึ่งสอดอยู่ในท่อพลาสติกสำหรับการผสมเทียมและมีผิวด้านหนึ่งโผล่ตรงช่องที่เจาะได้

4.4.4 ซองพลาสติก (sanitary sheath) ของบริษัทของ IMV ประเทศฝรั่งเศส ใช้สำหรับสวมเครื่องมือทั้งหมด ขณะสอดผ่านช่องคลอด ก่อนเข้าสู่คอมดลูก เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจากช่องคลอด

4.4.5 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (transport media) ใช้ Thioglycolate broth และ Transport media (Difco) เพื่อเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างนำส่งห้องปฏิบัติการ

4.4.6 กระติกน้ำแข็ง เพื่อใช้ใส่หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บตัวอย่างส่งตรวจห้องปฏิบัติการ

ภาพที่ 5 การปฏิบัติงานขณะชะล้างมดลูกโคที่มีปัญหาผสมซ้ำด้วยน้ำเกลือผสมยาปฏิชีวนะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 วิธีการเก็บตัวอย่าง

4.5.1 ทำความสะอาดบริเวณรอบ ๆ อวัยวะสืบพันธุ์ภายนอก ด้วยน้ำและน้ำผสมน้ำยาฆ่าเชื้อ (Savlon®) และเช็ดให้แห้งด้วยกระดาษฟาง

4.5.2 เตรียมเครื่องมือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ท่อเหล็กปลอดสนิม) ด้วยวิธี Sterilization อุณหภูมิ 121 ° ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร. ซม. นาน 20 นาที ส่วนท่อพลาสติกสำหรับผสมเทียม (4.4.2) และก้านสำลี (4.4.3.) ฆ่าเชื้อด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ต

4.5.3 การเก็บตัวอย่างด้วยวิธีการปลอดเชื้อ และใช้เทคนิคเช่นเดียวกับการผสมเทียม (ภาพที่ 4) กล่าวคือมือข้างหนึ่งจะถ่างผ่านทวารหนักเพื่อจับคอมดลูก และมืออีกข้างหนึ่งจับเครื่องมือสอดผ่านเข้าปากช่องคลอด และการเตรียมเครื่องมือก่อนการเก็บตัวอย่างให้ช่องที่เจาะที่ท่อเหล็กปลอดสนิม และช่องที่เจาะที่ท่อพลาสติกอยู่ตรงข้ามกัน ดังนั้นผิวด้านหน้าของก้อนสำลีจะไม่สัมผัสกับภายนอก เครื่องมือจะสวมด้วยซองพลาสติกเมื่อสอดผ่านช่องคลอด ซองพลาสติกจะช่วยป้องกันไม่ให้เครื่องมือปนเปื้อนจากช่องคลอดได้เมื่อถึงคอมดลูกด้านนอก (external cervical os) ดันเครื่องมือให้ทะลุผ่านซองพลาสติกผ่านเข้าคอมดลูก จนถึงตัวมดลูก แต่เมื่อสอดเครื่องมือผ่านถึงส่วนของตัวมดลูกแล้ว จะหมุนท่อพลาสติกจากปลายด้านนอกที่ทำเครื่องหมายไว้ให้ตรงกับช่องที่เจาะที่ท่อเหล็กปลอดสนิม ดังนั้นช่องที่เจาะของท่อเหล็กปลอดสนิมกับช่องที่เจาะของท่อพลาสติกก็จะตรงกัน ผิวด้านนอกของก้อนสำลีก็จะสัมผัสกับผนังด้านในของมดลูก ใช้มือที่ถ่างคลำผ่านทางทวารหนักจับตัวมดลูกให้สัมผัสกับเครื่องมือประมาณ 1 นาที จากนั้นหมุนปลายด้านนอกของท่อพลาสติกให้ตรงที่ทำเครื่องหมายอยู่ตรงข้ามกับรูที่เจาะที่ท่อเหล็กปลอดสนิม ก็จะทำให้ช่องที่เจาะของท่อเหล็กปลอดสนิมและช่องที่เจาะท่อพลาสติกอยู่ตรงข้ามกัน เวลาดึงเครื่องมือออกจากช่องคลอดโค ก้านสำลีก็จะไม่สัมผัสอวัยวะส่วนอื่น

4.5.4 ดึงท่อเหล็กปลอดสนิม ออกจากท่อพลาสติกผสมเทียม และใช้กรรไกรตัดท่อพลาสติก เพื่อดึงก้านสำลีออกมา เก็บในหลอดเก็บเชื้อ Thioglycolate broth และ Transport media นำหลอดเก็บเชื้อทั้ง 2 หลอด แช่ในกระติกบรรจุน้ำแข็ง และนำไปเก็บในตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ 2-8 ° ซ นำตัวอย่างที่เก็บไว้แล้ว ส่งห้องปฏิบัติการ ภายใน 24 ชั่วโมง เพื่อเพาะหาเชื้อแบคทีเรียชนิดต้องการอ็อกซิเจนในการเจริญเติบโต และทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

4.6 การเพาะเชื้อแบคทีเรียและทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ

4.6.1 การเพาะเชื้อ

ก้านสำลีเก็บตัวอย่าง (swab)

↓

Primary Isolation — เกลี่ย (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อรุ้นผสมเลือด (blood agar) และอาหารแมคคองกี้ส์ (Mac Conkeys) (อบเพาะที่ 37 ° ซ. 18-24 ชม.)

↓

Purification — ศึกษาลักษณะของหมวดหมู่แบคทีเรียที่พบบนอาหาร คัดเอาหมวดหมู่ที่พบว่ามีปริมาณมากที่สุดและรองลงมาถ่ายลงบนอาหารรุ้นผสมเลือด (อบเพาะที่ 37 ° ซ. 18-24 ชม.)

↓

Stock Culture — เขี่ยเชื้อที่บริสุทธิ์และเพาะลงบน blood agar slant (อบเพาะที่ 37 ° ซ. 18-24 ชม.)

↓

Primary test — เชื้อทั้งหมดที่เก็บไว้นำไปเพาะใหม่บนอาหารรุ้นผสมเลือด (อบเพาะที่ 37 ° ซ. 18-24 ชม.) ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีของ Cowan และ Steel (1974)

↓

Secondary test — โดยวิธีข้างต้นจะทราบว่าแบคทีเรียเพาะได้จัดอยู่ในตระกูล (Genus) อะไร แล้วทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีต่อไป เพื่อจำแนกสายพันธุ์ (Species) ตามวิธีของ Cowan และ Steel (1974)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6.2 การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะ

(ทำตามวิธีของ Kirby and Bauer, 1966)

นำเชื้อแยกบริสุทธิ์ 1-2 โคโลนี

↓

ใส่ใน Tryptic soy broth

↓ เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 2-3 ชม.

ใช้ sterile cotton swab จุ่มเชื้อเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของ Muerller - Hinton agar plate

↓

วางกระดาษยาปฏิชีวนะ (sensitivity disc)

↓ เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 12-18 ชม.

อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนใส (Inhibition zone) รอบกระดาษยา จดบันทึกแล้วนำไปเทียบกับตารางมาตรฐาน

Standard Sensitivity discs ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่

1.	Ampicillin	10	mcg
2.	Bacitracin	10	mcg
3.	Colistin	10	mcg
4.	Erytrhomycin	15	mcg
5.	Gentamycin	10	mcg
6.	Kanamycin	30	mcg
7.	Neomycin	30	mcg
8.	Nitrofuratoin	300	mcg
9.	Oxytetracycline	30	mcg
10.	Penicillin	10	mcg
11.	Polymyxin - B	300	mcg
12.	Streptomycin	10	mcg
13.	Sulfamethoxazole - Trimethoprim	125	mcg
14.	Tetracycline	30	mcg

1-14 เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปของ Oxoid (Unipath Limited company) England.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดสเตรน ทดสอบการดอบสนองต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด การอ่านผลเชื้อแบคทีเรียที่ดอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ คือวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนใสรอบกระดาษยาอยู่ในระดะ susceptible เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ดอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ คือ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนใสรอบกระดาษยาในระดะ resistant และ intermidiate รวบรวมผลการดอบสนองต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแต่ละชนิด ต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดแสดงผลเป็นร้อยละ

5. การรักษา

ดูระยะเวลาหลังการรักษาถึงผลมดิดในโดนมกลุ่มรักษาและโดนมกลุ่มควบคุมดิดเป็นอัตราการผลมดิด (%) ภายใน 60 วัน หลังการรักษา

6. วิเคราะห์ผลการทดลอง

โดยเปรียบเทียบอัตราการผลมดิด 60 วัน หลังการรักษา ในโดนมกลุ่มรักษา และโดนมกลุ่มควบคุม โดยใช้ Chi-Square test

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย