

รายงานการวิจัย

การศึกษานิวมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่และการตอบสนองต่อการทำวัคซีนในลูกสุนัข



คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งบประมาณเพื่อการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2543 และ ปีงบประมาณ 2545

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.รัตนาภรณ์ พรหมมาสา
รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.คณิตศักดิ์ อรวิระกุล
รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.รสมา ภูสุนทรธรรม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.พินิจ ภูสุนทรธรรม
นายสัตวแพทย์ อภิสิทธิ์ ปรากรกมานันท์
อาจารย์ น.สพ.ชัยยศ ชารัตนะ
นายสัตวแพทย์ วีระ เทพสุเมธานนท์
นายสัตวแพทย์ ชาญณรงค์ มิตรมูลพิทักษ์
นางผกามาส ขาวปลอด
นางสาวสุจิตรา ไทยทำนัส

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สภาวิชาชีพ
สภาวิชาชีพ
สภาวิชาชีพ
สภาวิชาชีพ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ ๑๗
๙๗/๑๕
เลขทะเบียน ๐๑๓๘๙๗
วัน, เดือน, ปี ๒๘ พ.ย. ๕๑

การศึกษากลุ่มก้อนต่อโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่ และ
การตอบสนองต่อการทำวัคซีนในลูกสุนัข

รัตนาภรณ์ พรหมมาสา¹, คณิศศักดิ์ อรวีระกุล¹, รสมา ภูสุนทรธรรม¹, พินิจ ภูสุนทรธรรม¹,
อภิสิทธิ์ ปรากฏภามานันท์¹, ชัยยศ ธารรัตน์¹, วีระ เทพสุเมธานนท์¹,
ชาญณรงค์ มิตรมูลพิทักษ์², ผกามาศ ขาวปลอด², สุธิตรา ไทยทำนัส²

บทคัดย่อ

ศึกษาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) แสดงระดับแอนติบอดีด้วยค่า International Units/ml. (I.U./ml.) หาค่าเฉลี่ยทางเรขาคณิต (Geometric Mean Titer, GMT) ในลูกสุนัขอายุ 1-3 เดือน จำนวนทั้งหมด 90 ตัว พบว่ามีค่า GMT ของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า เท่ากับ 0.63, 0.14 และ 0.04 I.U./ml. ตามลำดับ และพบว่าจำนวนสุนัขที่มีระดับแอนติบอดีสูงกว่า 0.5 I.U./ml. (ซึ่งเป็นระดับต่ำสุดที่คุ้มโรคได้ในคน) เท่ากับ 54.35%(25/46), 17.86%(5/28) และ 0% (0/16) ตามลำดับ ซึ่งในกลุ่มตัวอย่างดังกล่าวได้ทำการศึกษาอย่างต่อเนื่องในลูกสุนัขอายุ 1-3 เดือน จำนวน 16 ตัว พบว่าระดับแอนติบอดีเฉลี่ยต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่มีค่าเท่ากับ 0.62, 0.14 และ 0.04 I.U./ml. ซึ่งมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าหลังได้รับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเป็นเวลา 1 เดือน โดยได้รับวัคซีนเข็มแรกที่อายุ 3 เดือน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และศึกษาการตอบสนองต่อการทำวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในลูกสุนัข โดยศึกษาระดับแอนติบอดีในลูกสุนัขก่อนและหลังการฉีดวัคซีนเข็มแรกที่อายุ 2 เดือนและซ้ำที่อายุ 3 เดือน เปรียบเทียบกับลูกสุนัขที่ได้รับวัคซีนเข็มแรกที่อายุ 3 เดือน จำนวนทั้งสิ้น 22 ตัว พบว่าค่าเฉลี่ยทางเรขาคณิต (Geometric Mean Titers; GMT) ของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในลูกสุนัขก่อนได้รับวัคซีนทั้ง 2 กลุ่มมีค่าเท่ากับ 0.08 และ 0.07 I.U./ml. ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และพบว่าระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าหลังจากฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าครั้งแรก 1 เดือน มีค่าเท่ากับ 5.40 และ 4.99 I.U./ml. ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งสองกลุ่ม เมื่อทำการศึกษาอย่างต่อเนื่องที่อายุ 4, 5 และ 6 เดือน พบว่าระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในลูกสุนัขที่เริ่มฉีดวัคซีนที่อายุ 2 เดือน มีค่าเท่ากับ 23.04, 4.89 และ 0.72 I.U./ml. ตามลำดับและในลูกสุนัขที่เริ่มฉีดวัคซีนที่อายุ 3 เดือน มีค่าเท่ากับ 4.99, 1.83 และ 0.32 I.U./ml. ตามลำดับ ในทั้งสองกลุ่มระดับแอนติบอดีมีแนวโน้มลดต่ำลงมาอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกันเมื่ออายุ 6 เดือน ศึกษาการตอบสนองต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า 1 เดือนหลังได้รับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าซ้ำที่อายุ 6 เดือน พบว่าทั้งสองกลุ่มมี

การตอบสนองของระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นคือ 5.04 และ 8.24 I.U./ml. ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม เมื่ออายุ 11 เดือน สุนัขทั้ง 2 กลุ่ม มีระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าลดลง เมื่อเทียบกับที่อายุ 7 เดือน คือ 1.85 และ 2.64 I.U./ml. ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกับเมื่ออายุ 12 เดือน คือ 1.29 และ 2.74 I.U./ml. ตามลำดับ เมื่อได้รับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าซ้ำเมื่ออายุ 12 เดือน สุนัขทั้ง 2 กลุ่มมีระดับแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้น คือ 2.58 และ 4.84 I.U./ml. ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม



ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำสำคัญ วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า ระดับแอนติบอดี ลูกสุนัข

- 1 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2 สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

บทนำ

โรคพิษสุนัขบ้า (Rabies) มีชื่อพ้องคือ โรคกลัวน้ำ โรคหมาบ้า โรคหมาว้อ Hydrophobia, Lyssa, Rage, Tollwut เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย (ประวิทย์, 2532) เป็นโรคติดต่อในสัตว์และเป็นโรคติดต่อมาสู่คนที่ร้ายแรงที่สุด มีอัตราการตายสูงที่สุด โรคพิษสุนัขบ้าเป็นโรคของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ติดต่อมายังคนได้ การติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าในคนมักเกิดในเพศชายมากกว่าเพศหญิง 2 เท่า เช่นเดียวกับในสุนัขมีรายงานว่าพบในสุนัขเพศผู้มากกว่าสุนัขเพศเมีย 7 เท่า (อรรถสิทธิ, 2523) การติดต่อของโรคเกิดจากการที่ถูกสัตว์ หรือสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้ากัด โดยเชื้อจะถูกขับออกมาพร้อมกับน้ำลาย และเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าก็จะเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผลเปิด เชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าพบได้ในต่อมน้ำลายของสุนัขที่ตายด้วยโรคพิษสุนัขบ้า 54-90% (Tierkel, 1975) จนถึง 2 วันหลังจากที่สุนัขแสดงอาการของโรค (Vaughn et al., 1965 อ้างโดย สงคราม, 2523) แต่อาการจะสังเกตเห็นได้ยากในระยะแรก โดยเฉพาะระยะอาการนำ (Tierkel, 1975) และเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าจะขับออกมาพร้อมกับน้ำลายติดต่อกันจนกระทั่งสุนัขตาย (สงคราม, 2523 และ Tierkel, 1975) ในประเทศแถบเอเชีย รวมทั้งประเทศไทย พบว่าสุนัขเป็นพาหะที่สำคัญที่สุดที่นำโรคสู่มนุษย์ (สงคราม, 2523 และ Tierkel 1975) พบว่าอุบัติการณ์การติดเชื้อในคนจะลดลงเมื่อมีการรณรงค์การฉีดวัคซีนในสุนัข (Tierkel, 1975) ส่วนแมวเป็นพาหะที่สำคัญรองจากสุนัข ส่วนสัตว์อื่น ๆ นั้นยังไม่มีข้อมูลถึงความสำคัญในการเป็นพาหะนำโรคในประเทศไทยเท่าใดนัก (สงคราม, 2523) โดยพบการเกิดโรคในสุนัขประมาณ 95-96% แมวประมาณ 3-4% สัตว์เลี้ยงชนิดอื่น 0.02-0.04% สัตว์ป่า 0.02-0.03% (ประวิทย์, 2532)

โรคพิษสุนัขบ้ามีสาเหตุจากเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าหรือ Rabies Virus มีคุณสมบัติเป็น Neurotropic virus (พิไลพันธ์, 2523 และ Winkler, 1977 อ้างโดย สงคราม, 2523) เมื่ออยู่นอกร่างกายเชื้อจะถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน ความแห้ง แสงแดด แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเฉลี่ยของระยะฟักตัวในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้ามีระยะฟักตัว 3-8 สัปดาห์ (Tierkel, 1975) ระยะฟักตัวของโรคจะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับความรุนแรงของบาดแผลที่เชื้อเข้าสู่ร่างกาย หากบาดแผลรุนแรงหรืออยู่ใกล้สมอง ระยะฟักตัวของโรคมักจะสั้นกว่าเมื่อตำแหน่งของบาดแผลอยู่ที่อวัยวะส่วนปลาย และเมื่อผ่านระยะฟักตัว อาการก็จะปรากฏขึ้น จากการทดลองพบว่าเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง โดยผ่านทางประสาทส่วนปลาย ตามธรรมชาติพบว่าสุนัขมีความไวต่อโรคพิษสุนัขบ้าในระดับปานกลาง และมีความไวต่อโรค น้อยกว่าในสุนัขจิ้งจอก (Sikes, 1962 อ้างโดย Tierkel, 1975) ในสัตว์ทุกชนิด พบว่าสัตว์ที่มีอายุน้อยจะมีความไวต่อโรรมากกว่าสัตว์ที่มีอายุมาก

สุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าส่วนใหญ่จะแสดงอาการในระยะตื่นเดินเด่นชัด หรือเป็นบ้าแบบดุร้ายมากกว่าการแสดงอาการในระยะอัมพาตเด่นชัด หรือบ้าแบบซึม โดยสุนัขมักแสดงอาการนำ

คือมีการเปลี่ยนแปลงอุปนิสัยและพฤติกรรมจากปกติ 2-3 วัน ต่อมาจะแสดงอาการระยะตื่นเต้น เค้นซัด และมีความไม่สัมพันธ์ในการทำหน้าที่ของกล้ามเนื้อเกิดขึ้น โดยมีอาการขาอ่อนแรงมักจะ ล้มลง และตายภายใน 12-24 ชั่วโมง โดยระยะสุดท้ายของโรคจะมีอาการขาหลังอ่อนแรงอัมพาต ของระบบหายใจ เรียกระยะนี้ว่าอาการแบบซิม (Dumb Rabies) (สงคราม, 2523 ; Fekadu, 1991 ; Tierkel, 1975) สุนัขที่เริ่มแสดงอาการของโรคพิษสุนัขบ้าทั้ง 3 ระยะ จะอยู่ได้ไม่เกิน 10 วัน (Vaughn et al., 1965., อ้างโดย Tierkel, 1975)

การวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี Immunofluorescence ปัจจุบันเป็นวิธีการตรวจที่ มาตรฐาน มีความจำเพาะสูง ให้ผลแม่นยำ มีความไวร้อยละ 99.4 (Lennette and Emmons, 1971) โดยอาศัยหลักการจับกันระหว่างเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า (Antigen) กับแอนติบอดีที่เชื่อมด้วยสี Fluorescien isothiocyanate ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยากันจะนำไปตรวจโดยผ่านแสงอุลตราไวโอเลตของ กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Fluorescence microscope) และได้มีการประยุกต์เพื่อหาระดับแอนติบอดี ในซีรัม โดยการหานิวทรัลไลซิง แอนติบอดี ในหลอดทดลอง คือ วิธี Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) (สงคราม, 2523 และ Thomus, 1963 อ้างโดย ประเสริฐ, 2523)

ในปัจจุบันโรคพิษสุนัขบ้ายังไม่มียูธีการรักษาโรคให้หายได้ ดังนั้นการป้องกันโรคโดยการ ฉีดวัคซีนก่อนได้รับเชื้อจึงเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งวัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันเป็นวัคซีนเชื้อตาย (Inactivated vaccine) โดยมีการแนะนำให้ลูกสุนัขควรได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคครั้งแรกเมื่ออายุ 3 เดือน ขึ้นไป เนื่องจากระบบการสร้างภูมิคุ้มกันของสุนัขต่อวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้า จะสร้างได้ค่อนข้างดี หลังจากมีอายุ 11 สัปดาห์ขึ้นไป (Kaeberle, 1958 อ้างโดย สงคราม, 2523) และในสุนัขที่เกิดใหม่ไม่ สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าได้ จำเป็นต้องได้รับจากแม่ผ่านทางน้ำนมเหลือง (Colostrum) และรก โดยน้ำนมเหลืองที่ลูกสุนัขได้รับภายใน 48 ชั่วโมงแรกหลังคลอดจะพบว่า มี ระดับภูมิคุ้มกันสูงที่สุด (Winters, 1981) และเป็นช่วงเวลาที่ดีที่สุดของลูกสุนัขได้มากที่สุดจากนั้น จะค่อย ๆ ลดลงอย่างสม่ำเสมอ ในปี พ.ศ. 2541 สมาคมสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ แห่งประเทศไทย ได้กำหนดโปรแกรมการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า โดยเริ่มที่สุนัขอายุ 3 เดือน และฉีดกระตุ้นเมื่ออายุ 6 เดือนหลังจากนั้นฉีดกระตุ้นปีละครั้ง

Kasempimolporn และคณะ (1996) ได้ทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคพิษสุนัขบ้าในลูก สุนัข ก่อนได้รับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าครั้งแรกที่อายุ 3 เดือน จำนวน 32 ตัว พบว่ามีเพียง 5 ตัวที่ตรวจพบแอนติบอดีโดยวิธี ELISA แต่ทั้งหมดเมื่อตรวจด้วยวิธี Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) กลับไม่พบว่ามีแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า ซึ่งผลดังกล่าวคาดว่า เป็นแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับจากแม่ที่ลดลง ดังนั้นลูกสุนัขในวัยก่อนได้รับ วัคซีน หรืออายุน้อยกว่า 3 เดือน จึงเป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการได้รับและแพร่เชื้อโรคพิษสุนัขบ้า ซึ่งอาจ เป็นสาเหตุหนึ่งของความล้มเหลวในการควบคุมการระบาดของโรคพิษสุนัขบ้าได้

Mitmoonpitak และคณะ (1998) ได้ทำการสำรวจในปี พ.ศ. 2535-2539 พบว่าสุนัขที่เกิดโรคพิษสุนัขบ้าจำนวน 8-27% อยู่ในช่วงอายุตั้งแต่ 1 เดือนถึงสุนัขที่อายุน้อยกว่า 3 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของหน่วยชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้าของสถานเสาวภา สภากาชาดไทยในช่วงปี พ.ศ. 2537-2542 พบว่า จำนวนลูกสุนัขที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคพิษสุนัขบ้า จำนวน 9% ที่อยู่ในช่วงอายุน้อยกว่า 3 เดือน (ชาญณรงค์ และคณะ, 2542)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของลูกสุนัขที่มารับบริการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าก่อนหน้าและหลังการฉีดวัคซีนครั้งแรก โดยศึกษาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าก่อนการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเมื่อลูกสุนัขอายุ 1 เดือน, 2 เดือน; 3 เดือน และหลังการฉีดวัคซีนเข็มแรกประมาณ 1 เดือน และศึกษาการตอบสนองของระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า เมื่อฉีดวัคซีนครั้งแรกในลูกสุนัขอายุ 2 เดือน ทำการฉีดวัคซีนกระตุ้นที่อายุ 3 เดือน, 6 เดือน และ 12 เดือน เปรียบเทียบกับการเริ่มฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าครั้งแรกในลูกสุนัขอายุ 3 เดือน ทำการฉีดวัคซีนกระตุ้นที่อายุ 6 เดือน และ 12 เดือน โดยศึกษาต่อเนื่องจนสุนัขอายุ 13 เดือน

อุปกรณ์และวิธีการ

วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า

วัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่ใช้ในการศึกษานี้ มีชื่อทางการค้า Defensor™ 3 ผลิตโดยบริษัท ไฟเซอร์ อินเตอร์เนชันแนล จำกัด (Inactivated Rabies Virus, PV-Paris, SVR-289 Strain, Lot/Batch no. A124506B)

ซีรัมสุนัข

แบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วน คือ

- ก. ศึกษาาระดับแอนติบอดีต่อโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่และการตอบสนองต่อการทำวัคซีนครั้งแรก :
ทำการเก็บตัวอย่างเลือดสุนัขที่มารับบริการที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้
กลุ่มที่ ก. 1 ลูกสุนัขอายุ 1 เดือน จำนวน 46 ตัว
กลุ่มที่ ก. 2 ลูกสุนัขอายุ 2 เดือน จำนวน 28 ตัว
กลุ่มที่ ก. 3 ลูกสุนัขอายุ 3 เดือน จำนวน 16 ตัว และได้รับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในวันที่ทำการเก็บเลือด
กลุ่มที่ ก. 4 ลูกสุนัขอายุ 4 เดือน จำนวน 10 ตัว (หลังจากทำวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าครั้งแรก 1 เดือน)

ข. ศึกษาการตอบสนองของระดับแอนติบอดี ในลูกสุนัขจากศูนย์การสุนัขทหาร อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ ข. 2 ลูกสุนัขอายุ 2 เดือน จำนวน 11 ตัว ฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า เข้าบริเวณกล้ามเนื้อขาหลัง เมื่ออายุ 2, 3, 6 และ 12 เดือน

กลุ่มที่ ก. 2 ลูกสุนัขอายุ 2 เดือน จำนวน 11 ตัว ฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า เข้าบริเวณกล้ามเนื้อขาหลัง เมื่ออายุ 3, 6, และ 12 เดือน

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาณ 1-1.5 มิลลิลิตร ในหลอด Eppendorf และนำตัวอย่างเลือดมาปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที แยกซีรัมเก็บในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบหาแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) ที่สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ต่อไป

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยง BHK-21/S13 cell line เลี้ยงด้วย Glasgow Minimum Essential Medium supplement ด้วย 10% Fetal Bovine Serum (10%GMEM)

ไวรัส

CVS-11 Strain ได้รับการเอื้อเฟื้อจาก Pasteur Institute, France ทำการเพิ่มจำนวนและวัดความเข้มข้นของไวรัส ใน BHK cell line หน่วยเป็น TCID₅₀/50 ไมโครลิตร

Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)

นำตัวอย่างซีรัมมาหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า ด้วยวิธี RFFIT โดยดัดแปลงจากวิธีของ Smith และคณะ (1996) รายละเอียดพอสังเขปดังนี้

ทำการอุ่นซีรัมที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัด complement และทำการเจือจางซีรัมเป็น serial 2-fold dilution ใน 2% Fetal bovine serum GMEM เดิมไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า CVS-11 Strain ที่ความเข้มข้น 100 TCID₅₀/50 ไมโครลิตร โดยมี virus back titration control หนึ่งที่ 37 องศาเซลเซียส 5%CO₂ เป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา เติม Trypsinized BHK cell ปริมาณเซลล์ 10⁶ cell/ml. จำนวน 50 ไมโครลิตร ทำการอบที่ 37 องศาเซลเซียส 5%CO₂ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด เทน้ำเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ทำการตรึงเซลล์ด้วย 90%Acetone ก่อนย้อมด้วย Anti-Rabies Fluorescein Isothiocyanate conjugate เป็นเวลา 45 นาที อ่านผลโดยการนับเซลล์ที่เรืองแสงจากมีไวรัสแอนติเจนอยู่ในเซลล์ โดยนับ 8 filed ต่อหลุม ระดับแอนติบอดีได้จากส่วนกลับของ dilution ต่ำสุดที่ยับยั้งการเรืองแสงของเซลล์ได้ 50% และคำนวณเป็น international unit (I.U./ml.) เมื่อเปรียบเทียบกับ WHO Standard serum (Smith et al., 1996) นิเคราะห์ผลโดยการนำเสนอรระดับแอนติบอดีในรูปค่าเฉลี่ยทางเรขาคณิต (Geometric mean titers ;

GMT) ในแต่ละกลุ่มอายุ และทำการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าระหว่างกลุ่ม ด้วยวิธี Student's test ในกลุ่ม ก. และ Friedman Test และ Wilcoxon Signed Ranks Test ในกลุ่ม ข.

ผล

กลุ่ม ก. การศึกษาตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่ และหลังได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าครั้งแรก โดยแบ่งลูกสุนัขเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มอายุ 1 เดือน, 2 เดือน และ 3 เดือน จำนวนทั้งหมดของลูกสุนัขที่ทำการศึกษาในแต่ละเดือนเท่ากับ 46 ตัว, 28 ตัว และ 16 ตัว ตามลำดับ ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในลูกสุนัขแต่ละเดือนและค่าเฉลี่ยทางเรขาคณิต (GMT) มีค่าเท่ากับ 0.63, 0.14 และ 0.04 I.U./ml. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ในแต่ละกลุ่มอายุของลูกสุนัขเมื่อนำมาแบ่งกลุ่มตามระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มลูกสุนัขที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ่าน้อยกว่า 0.03 I.U./ml. กลุ่มลูกสุนัขที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าอยู่ในช่วง 0.03-0.5 I.U./ml. และกลุ่มลูกสุนัขที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้ามากกว่า 0.5 I.U./ml. จำนวนลูกสุนัขที่มีระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในแต่ละช่วง 3 ช่วงในลูกสุนัขกลุ่มอายุ 1 เดือน มีจำนวน 10.87% (5/46), 34.78% (16/46) และ 54.35% (25/46) ตามลำดับ ลูกสุนัขกลุ่มอายุ 2 เดือน มีจำนวน 32.14% (9/28), 50% (14/28) และ 17.86% (5/25) ตามลำดับ ลูกสุนัขกลุ่มอายุ 3 เดือน มีจำนวน 62.5% (10/16), 37.5% (6/16) และ 0% (0/16) ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

เมื่อทำการศึกษาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่ในลูกสุนัขอายุ 1 เดือน, 2 เดือน และ 3 เดือน โดยติดตามผลในลูกสุนัขแต่ละตัวอย่างต่อเนื่องจำนวน 16 ตัว พบว่าค่าเฉลี่ยทางเรขาคณิต (GMT) ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่ เท่ากับ 0.62, 0.14 และ 0.04 I.U./ml. ตามลำดับ (รูปที่ 1) ซึ่งระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่ในช่วงอายุ 1-3 เดือน มีแนวโน้มลดลง แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในช่วงอายุ 2 และ 3 เดือน

เมื่อทำการศึกษาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในลูกสุนัขก่อนฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า (อายุ 3 เดือน) และ 1 เดือนหลังฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าครั้งแรก (อายุ 4 เดือน) ในจำนวนลูกสุนัขทั้งหมด 10 ตัว ผลปรากฏว่า ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในลูกสุนัขก่อนฉีดวัคซีนที่วัดได้ มีค่าเฉลี่ยทางเรขาคณิต (GMT) เท่ากับ 0.03 I.U./ml. และระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในลูกสุนัขหลังฉีดวัคซีนครั้งแรกที่วัดได้มีค่าเฉลี่ยทางเรขาคณิต (GMT) เท่ากับ 15.85 I.U./ml. (ตารางที่ 2) พบว่าระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าหลังฉีดวัคซีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

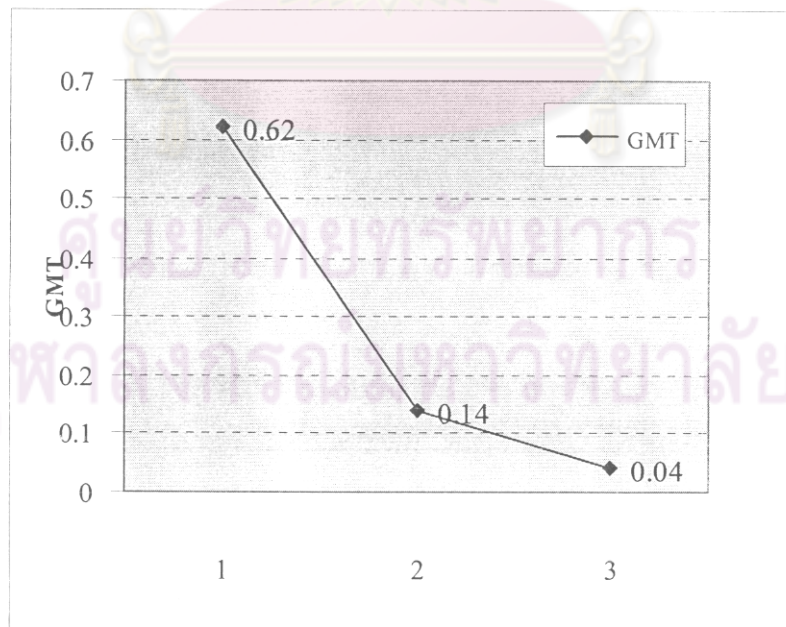
ตารางที่ 1 แสดงจำนวนลูกสุนัขในกลุ่มอายุ 1, 2 และ 3 เดือน ที่ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าระดับต่าง ๆ

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนลูกสุนัขในกลุ่มอายุ 1, 2 และ 3 เดือน ที่ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าระดับต่าง ๆ และค่าเฉลี่ยทางเรขาคณิต (GMT) ของระดับแอนติบอดีในกลุ่มอายุดังกล่าว

ระดับ Ab	เดือนที่ 1		เดือนที่ 2		เดือนที่ 3	
	จำนวน (ตัว)	%	จำนวน (ตัว)	%	จำนวน (ตัว)	%
<0.03	5	10.87	9	32.14	10	62.50
0.03<Ab<0.5	16	34.78	14	50.00	6	37.50
>0.5	25	54.35	5	17.86	0	0.00
รวม	46	100.00	28	100.00	16	100.00
GMT	0.63		0.14		0.04	

หมายเหตุ : Ab = ระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า

รูปที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยทางเรขาคณิต (GMT) ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่ในลูกสุนัขต่อเนื่องอายุ 1, 2 และ 3 เดือน (n=16)



ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในสุนัขแต่ละตัว ก่อน และหลังได้รับวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้า (ที่อายุ 3 และ 4 เดือน ตามลำดับ)

ลำดับที่	ระดับแอนติบอดีก่อนได้รับวัคซีน (I.U./ml.)	ระดับแอนติบอดีหลังได้รับวัคซีน (I.U./ml.)
1	<0.03*	15.52
2	<0.03*	33.86
3	<0.03*	3.83
4	<0.03*	31.05
5	<0.03*	8.35
6	<0.03*	3.83
7	<0.03*	52.21
8	0.11	33.86
9	0.14	16.21
10	0.25	17.45
GMT	0.03	15.85

* กำหนดให้ระดับแอนติบอดีที่ <0.03 มีค่าที่ 0.02 เพื่อการเปรียบเทียบ

กลุ่ม ข. การศึกษาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าก่อนได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าครั้งแรกที่อายุ 2 เดือน (กลุ่มที่ ข. 1) เปรียบเทียบกับลูกสุนัขที่ทำการฉีดวัคซีนครั้งแรกที่อายุ 3 เดือน (กลุ่มที่ ข. 2) โดยติดตามผลในลูกสุนัขแต่ละตัวอย่างต่อเนื่อง พบว่าค่าเฉลี่ยทางเรขาคณิต (GMT) ของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าก่อนทำการฉีดวัคซีนครั้งแรกในลูกสุนัขกลุ่มที่ ข.1 เท่ากับ 0.08 I.U./ml. และระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าก่อนทำการฉีดวัคซีนครั้งแรกในลูกสุนัขกลุ่มที่ ข.2 เท่ากับ 0.07 I.U./ml. (ตารางที่ 3) พบว่าในลูกสุนัขทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าก่อนได้รับวัคซีนและ 1 เดือนหลังจากได้รับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าครั้งแรกในกลุ่มที่ ข.1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.08 และ 5.40 I.U./ml. ตามลำดับ พบว่าระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าหลังฉีดวัคซีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองของระดับแอนติบอดีในสุนัขกลุ่มที่ได้รับวัคซีน ซึ่งแตกต่างจากสุนัขอายุเดียวกัน (3 เดือน) ที่ยังไม่ได้รับการฉีดวัคซีนในกลุ่มที่ ข. 2 คือมีระดับแอนติบอดีเท่ากับ 0.07 I.U./ml.

เมื่อทำการศึกษาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในลูกสุนัขกลุ่มที่ ข.1 พบว่ามีการตอบสนองของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดหลังจาก

ฉีดวัคซีนเข็มที่ 2 ที่อายุ 3 เดือน คือจาก 5.40 เป็น 23.04 I.U./ml. แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าระดับแอนติบอดีมีระดับที่ลดลงอย่างรวดเร็วในเดือนที่ 5 และ 6 คือ 4.89 และ 0.72 I.U./ml. ตามลำดับซึ่งการลดลงของระดับแอนติบอดีที่พบจะใกล้เคียงกับในลูกสุนัขกลุ่มที่ ข.2 ที่ทำการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าครั้งแรกที่ 3 เดือนเพียงครั้งเดียว คือ 1.83 และ 0.32 I.U./ml. ในเดือนที่ 5 และ 6 ตามลำดับ

เมื่อสุนัขอายุ 6 เดือนในลูกสุนัขทั้งสองกลุ่มจะได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าซ้ำ และติดตามผลการตอบสนองของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าหลังฉีดวัคซีน 1 เดือน พบว่าทั้งสองกลุ่มมีการตอบสนองของระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้น คือ 5.04 และ 8.24 I.U./ml. ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อสุนัขอายุ 11 เดือน พบว่าระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า ของสุนัขทั้งสองกลุ่ม ลดลงอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับอายุ 7 เดือน คือ 1.85 และ 2.64 I.U./ml. ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันกับระดับแอนติบอดีที่อายุ 12 เดือน คือ 1.29 และ 2.74 I.U./ml. ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

หลังจากฉีดวัคซีนซ้ำที่อายุ 12 เดือน และตรวจระดับแอนติบอดีหลังจากได้รับวัคซีน 1 เดือน พบว่าระดับแอนติบอดีของสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม เพิ่มขึ้น คือ 2.58 และ 4.84 I.U./ml. ตามลำดับซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเมื่อทั้งสองกลุ่มอายุ 12 เดือน (รูปที่ 2)

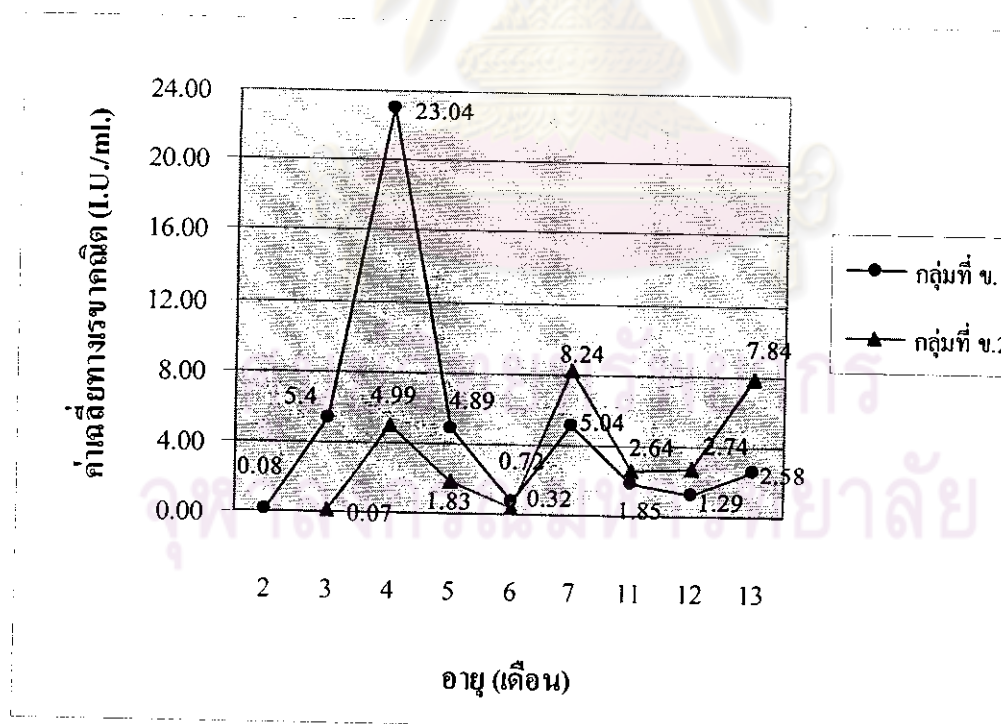
ตารางที่ 3 แสดงค่าระดับแอนติบอดีของลูกสุนัขแต่ละตัว และค่าเฉลี่ยทางเรขาคณิต (Geometric mean titers ; GMT) ในแต่ละเดือน

	No.	2 เดือน*	3 เดือน*	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน*	7 เดือน	11 เดือน	12 เดือน*	13 เดือน
กลุ่มที่ ข. 1 (2 เดือน) ฉีดวัคซีนซ้ำ ที่อายุ 3, 6 และ 12 เดือน	1	0.17	2.00	13.45	3.72	0.39	0.65	0.08	0.03	0.03
	2	0.06	9.11	37.61	9.23	1.83	11.01	2.0	2.38	5.42
	3	0.11	9.93	18.22	3.88	0.8	9.47	1.09	0.71	1.76
	4	0.07	2.38	63.25	21.02	4.18	59.56	4.97	2.71	5.66
	5	0.09	2.28	18.22	3.66	0.39	4.06	0.05	0.05	0.07
	6	0.14	3.67	39.74	8.84	1.04	5.03	1.35	0.8	2.83
	7	0.14	4.56	16.71	2.99	0.32	7.43	1.48	1.92	4.18
	8	0.05	14.05	32.00	2.52	0.57	2.03	0.84	0.48	1.83
	9	0.06	9.51	16.71	3.26	0.68	25.55	5.19	3.72	7.02
	10	0.05	8.35	5.45	2.63	0.57	1.68	0.11	0.01	0.04
	11	0.05	6.17	47.26	6.73	0.37	0.99	0.12	0.09	0.08
GMT (I.U./ml.)		0.08	5.40	23.04	4.89	0.72	5.04	1.85	1.29	2.58

	No.	3 เดือน*	4 เดือน*	5 เดือน	6 เดือน*	7 เดือน	11 เดือน	12 เดือน	13 เดือน
กลุ่มที่ ข. 2 (3เดือน) ฉีดวัคซีนซ้ำ ที่อายุ 6 และ 12 เดือน	1	0.07	5.91	2.95	0.35	21.95	ND	ND	ND
	2	0.10	2.28	2.71	0.19	21.95	ND	ND	ND
	3	0.08	5.42	1.24	0.23	2.41	0.42	0.54	0.37
	4	0.07	2.49	1.68	0.18	3.26	1.48	2.83	4.18
	5	0.11	5.00	0.51	0.59	21.09	ND	ND	ND
	6	0.10	19.03	1.83	0.65	5.59	ND	ND	ND
	7	0.05	2.18	14.05	0.18	13.97	6.17	5.26	10.83
	8	0.05	5.91	2.00	0.32	4	ND	ND	ND
	9	0.05	2.09	0.88	0.46	7.96	4.97	3.56	9.51
	10	0.07	4.36	1.41	0.3	4.52	0.68	ND	ND
	11	0.05	14.67	0.88	0.39	13.21	ND	ND	ND
GMT (I.U./ml.)		0.07	4.99	1.83	0.32	8.24	2.64	2.74	7.84

* ฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า

ND ไม่ได้ทำการตรวจ



รูปที่ 2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางเรขาคณิตของระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในกลุ่มลูกสุนัขที่ได้รับการฉีดวัคซีนที่ 2, 3, 6 และ 12 เดือน (กลุ่มที่ ข.1) และในกลุ่มลูกสุนัขที่ได้รับการฉีดวัคซีนที่ 3, 6 และ 12 เดือน (กลุ่มที่ ข.2)

วิจารณ์

จากการศึกษาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่ ในกลุ่มลูกสุนัขอายุ 1, 2 และ 3 เดือน ที่มารับบริการในโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าในกลุ่มลูกสุนัขเดือนที่ 1 ลูกสุนัขที่มีระดับแอนติบอดีสูง (>0.5 I.U./ml. ซึ่งเป็นระดับที่ป้องกันโรคในคน) มีจำนวนมากที่สุด 54.35% ซึ่งแสดงถึงระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่ยังคงอยู่จากการรับภูมิคุ้มกัน โรคที่ถ่ายทอดจากแม่ ในกลุ่มลูกสุนัขเดือนที่ 2 พบว่าลูกสุนัขที่มีระดับแอนติบอดีระหว่าง 0.03 ถึง 0.5 I.U./ml. มีจำนวน 50% และในกลุ่มลูกสุนัขเดือนที่ 3 พบว่าลูกสุนัขที่มีระดับแอนติบอดีในระดับน้อยกว่า 0.03 I.U./ml. มีถึง 62.50% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ระดับแอนติบอดีที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่เริ่มลดลงในระดับต่ำในช่วงอายุ เดือนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ จากการศึกษาลูกสุนัขแต่ละตัวที่ทำการศึกษาติดตามอย่างต่อเนื่องในช่วงอายุ 1 ถึง 3 เดือน มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ย 0.62, 0.14 และ 0.04 I.U./ml. ตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงภูมิคุ้มกันที่ถ่ายทอดจากแม่ในกลุ่มลูกสุนัขที่สำรวจนี้มีแนวโน้มลดลง ($p<0.05$) และยังคงพบว่ามีลูกสุนัขในช่วงอายุ 2 และ 3 เดือน มีระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในระดับต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้กล่าวมาแล้ว

ระดับแอนติบอดีของลูกสุนัข หลังทำวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่อายุ 3 เดือน พบว่าหลังทำวัคซีน 1 เดือน มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโรคพิษสุนัขบ้าซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tepsumethanon และคณะ (1991) ซึ่งได้ทำการศึกษา ระดับแอนติบอดีหลังจากฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า พบว่ามีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 ของการทำวัคซีนซึ่งสอดคล้องกับ Jayakumar และ Ramadass (1990)

จากการศึกษาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าก่อนฉีดวัคซีนครั้งแรกในลูกสุนัขที่ศูนย์การสุนัขทหาร อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งลูกสุนัขทุกตัวได้รับการเลี้ยงดูและได้รับอาหารชนิดเดียวกัน ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน พบว่าลูกสุนัข อายุ 2 เดือน มีระดับแอนติบอดีเท่ากับ 0.08 I.U./ml. และภายใน 1 เดือน หลังจากได้รับวัคซีนครั้งแรกมีการตอบสนองต่อวัคซีนคือมีระดับของแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าเพิ่มขึ้นเป็น 5.40 I.U./ml. ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับแอนติบอดีที่ได้รับการถ่ายทอดจากแม่ในช่วงอายุ 2 เดือน มีระดับลดต่ำลงแล้ว และไม่มีการรบกวนการสร้างแอนติบอดีจากวัคซีนในลูกสุนัข เนื่องจากลูกสุนัขสามารถตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่อายุ 2 เดือนได้ และจากการศึกษาลูกสุนัขแต่ละตัวโดยทำการติดตามอย่างต่อเนื่องในช่วงอายุ 2 ถึง 7 เดือน และช่วงอายุ 11 ถึง 13 เดือน มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ย 0.08, 5.40, 23.04, 4.89, 0.72, 5.04 และ 1.85, 1.29 และ 2.58 I.U./ml. ตามลำดับ ซึ่งลูกสุนัขจะได้รับการฉีดวัคซีนที่อายุ 2, 3, 6 และ 12 เดือน ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าหลังฉีดวัคซีนที่อายุ 2 และ 3 เดือน มีระดับที่เพิ่มขึ้น และพบว่าเมื่ออายุ 5 และ 6 เดือน ระดับแอนติบอดีจะมีแนวโน้มลดต่ำลง และจะตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนกระตุ้นที่อายุ 6 เดือน

โดยมีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นหลังได้รับวัคซีน 1 เดือน เมื่อลูกสุนัขอายุ 11 เดือน พบว่าระดับแอนติบอดีมีค่าลดลงจากเมื่ออายุ 7 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.003$) แต่ไม่แตกต่างจากเมื่ออายุ 12 เดือน และสามารถตอบสนองต่อการทำวัคซีนเมื่ออายุ 12 เดือนได้เช่นเดียวกับเมื่ออายุ 6 เดือน (Friedman test และ Wilcoxon Signed Ranks test)

ผลการศึกษาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าในกลุ่มที่เริ่มฉีดวัคซีนครั้งแรก ที่อายุ 3 เดือน และติดตามผลอย่างต่อเนื่องในช่วงอายุ 3 ถึง 7 เดือน และช่วงอายุ 11 ถึง 13 เดือน โดยได้รับวัคซีนที่อายุ 3 เดือน, 6 เดือน และ 12 เดือน มีระดับแอนติบอดีเฉลี่ยเท่ากับ 0.07, 4.99, 1.83, 0.32, 8.24 และ 2.64, 2.74, 4.84 I.U./ml. ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า มีการตอบสนองต่อการทำวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในตนเองเดียวกับกลุ่มที่เริ่มฉีดวัคซีนครั้งแรกที่อายุ 2 เดือน

Kasempimolporn และคณะ (1996) พบว่าภูมิคุ้มกันของแม่สุนัขที่ถ่ายทอดมายังลูกสุนัขไม่ได้คงอยู่จนลูกสุนัข อายุ 3 เดือน และลูกสุนัขในช่วงอายุดังกล่าว อาจไวต่อการติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้า และแสดงอาการของโรคพิษสุนัขบ้าได้ ข้อมูลทางสถิติของสุนัขที่ส่งตรวจในสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ในปี 1992-1996 ซึ่งรวบรวมโดย Mitmonnpitak และคณะ (1998) พบว่า 14% ของสุนัขที่ตรวจพบว่าเป็นโรคพิษสุนัขบ้า คือสุนัขที่มีอายุน้อยกว่า 3 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ในปี พ.ศ. 2537-2542 ซึ่งพบว่ามีลูกสุนัขอายุต่ำกว่า 3 เดือน ประมาณร้อยละ 9 เป็นโรคพิษสุนัขบ้า (ชาญณรงค์ และคณะ, 2544) การศึกษาครั้งนี้เมื่อทำการฉีดวัคซีนที่อายุ 2 เดือน พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีหลังการฉีดวัคซีน 1 เดือน มีค่าเท่ากับ 5.40 I.U./ml. ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงว่า แอนติบอดีที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่ไม่มีผลรบกวนการสร้างแอนติบอดีไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าจากการฉีดวัคซีน หากทำการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าครั้งแรกในลูกสุนัขอายุ 2 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับ Seghaier และคณะ (1999) ที่ได้ทำการศึกษาพบว่าลูกสุนัขที่อายุน้อยกว่า 3 เดือน สามารถตอบสนองการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า และไม่มีการรบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันจากแอนติบอดีต่อไวรัสที่ได้รับจากการถ่ายทอดจากแม่สู่ลูก

การทำวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าในลูกสุนัขที่อายุ 3 เดือน พบว่าหลังทำวัคซีน 1 เดือน มีระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้า สอดคล้องกับการศึกษาของ Tepsumethanon และคณะ (1991) และการศึกษาของ Jayakumar และ Ramadass (1990) ซึ่งได้ศึกษาระดับแอนติบอดีหลังจากฉีดวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าในสุนัขที่มีอายุ 3 เดือนขึ้นไป พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีในวันที่ 14 ของการทำวัคซีน

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าระดับแอนติบอดีมีแนวโน้มลดลงในช่วงอายุ 5-6 เดือน หรือ 60 วันหลังจากทำวัคซีน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Tepsumethanon และคณะ (1991) จากการทำวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าในสุนัขที่มีอายุ 3 เดือนขึ้นไป พบว่า 60 วันหลังทำวัคซีน (อายุ 5 เดือน) มี

สุนัขจำนวน 12% มีระดับแอนติบอดีต่ำกว่า 0.5 I.U./ml. ซึ่งเป็นระดับที่องค์การอนามัยโลก (WHO) กำหนดให้เป็นระดับที่ยอมรับว่าสามารถป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าได้ในคน เช่นเดียวกับ การศึกษาของ Sage และคณะ (1993) ซึ่งทำการศึกษากการตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนในสุนัขที่มี อายุ 3 เดือนขึ้นไป และ Sihvonen และคณะ (1995) ซึ่งทำการศึกษากการตอบสนองต่อการฉีด วัคซีนในสุนัขอายุน้อยกว่าและมากกว่า 1 ปีขึ้นไป ที่ไม่เคยทำวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้ามาก่อน พบว่า มีจำนวน 27% และ 3.1% ตามลำดับ ที่มีแอนติบอดีในระดับต่ำกว่า 0.5 I.U./ml. หลังทำวัคซีน 60 วัน จากผลดังกล่าวจึงพบว่าระดับแอนติบอดีจากการทำวัคซีน 1 ครั้ง ไม่เพียงพอต่อการป้องกันโรค พิษสุนัขบ้าโดยเฉพาะในขวบปีแรกของลูกสุนัข

การตอบสนองของแอนติบอดีต่อไวรัสหรือวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าที่มีแนวโน้มลดลงในช่วง อายุดังกล่าว อาจเป็นผลจากอิทธิพลของโครงสร้างไวรัสเอง (Bachmann and Zinkernagel, 1996) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง G.protein ซึ่งเป็น enveloped glycoprotein ของกลุ่ม Rhabdovirus ที่กระตุ้นให้ เกิด neutralizing antibody นั้น มีโครงสร้างจัดเรียงตัวเป็นระเบียบและมีแบบแผนซ้ำ ๆ ที่เอื้อต่อการ กระตุ้นการตอบสนองแอนติบอดีชนิดไม่พึ่งพา T-cell (T-cell independent antibody) โดยผ่านการ cross-linking ของ B-cell receptor โดยทั่วไป TI antibody (TI) มักมีอายุสั้น โดยเฉพาะ IgM ซึ่งต้อง อาศัยการกระตุ้นซ้ำให้เกิด T-cell dependent B-cell response ให้เกิดการ Isotype switching และ กระตุ้นการจดจำของ B-cell (Bachmann and Zinkernagel, 1996) อย่างไรก็ตาม การลดลงของ แอนติบอดีดังกล่าว อาจมีผลกระทบมาจากการฉีดวัคซีนป้องกันโรคไข้หัดสุนัข และวัคซีนป้องกัน โรคไข้ส่าอีกเสบติดต่อในช่วงระยะเวลาเดียวกันทั้งโดยตรงและโดยอ้อม ซึ่งผลกระทบดังกล่าว ควรได้มีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

จากการศึกษาติดตามเมื่อสุนัขอายุ 11 และ 12 เดือน พบว่าสุนัขทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยระดับ แอนติบอดีลดลง คือ 1.85 และ 1.29 I.U./ml. ตามลำดับ ในกลุ่มที่เริ่มฉีดวัคซีนที่อายุ 2 เดือน และ 2.64 และ 2.74 I.U./ml. ตามลำดับ ในกลุ่มที่เริ่มฉีดวัคซีนที่อายุ 3 เดือน แสดงถึงระดับแอนติบอดีที่ ลดลงต่ำกว่าเมื่ออายุ 7 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่เมื่อได้รับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า ที่อายุ 12 เดือน สุนัขทั้ง 2 กลุ่ม มีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้น คือ 2.58 และ 4.84 I.U./ml. ตามลำดับ

สมาคมสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์แห่งประเทศไทย ได้แนะนำโปรแกรมการ ฉีดวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าว่าควรทำวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าครั้งแรกเมื่ออายุ 3 เดือน ซึ่ง สอดคล้องกับ Kuwert และคณะ (1985) ส่วน Songsri และคณะ (1966) พบว่าช่วงอายุ 11-16 สัปดาห์ ลูกสุนัขสามารถตอบสนองต่อการทำวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าได้ดีและไม่มีการรบกวนการ สร้างภูมิคุ้มกันของลูกสุนัข ส่วนการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ลูกสุนัขอายุ 2 เดือนสามารถตอบสนองต่อ การทำวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าได้

การศึกษาถึงช่วงอายุที่เหมาะสมสำหรับการทำวัคซีนครั้งแรกในลูกสุนัขเป็นสิ่งสำคัญใน ประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยยังเป็นแหล่งแพร่ระบาดของไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่สำคัญ และ

จากข้อมูลที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แสดงให้เห็นว่าในสุนัขเล็กวัยก่อนเกณฑ์การฉีดวัคซีนตามที่สมาคมสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์แห่งประเทศไทย ได้กำหนดไว้นั้น เป็นกลุ่มสุนัขที่มีความเสี่ยงต่อการรับและแพร่เชื้อได้ ดังนั้นน่าจะมีการประเมินผลการทำวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในลูกสุนัขที่อายุน้อยกว่า 2 เดือน เพื่อกำหนดอายุลูกสุนัขที่ควรได้รับการทำวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า และหาช่วงระยะเวลาที่แอนติบอดีมีการลดลงจนถึงระดับต่ำที่สุดในการป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า เพื่อกำหนดระยะเวลาในการทำวัคซีนกระตุ้นหลังจากการทำวัคซีนครั้งแรกต่อไป และควรมีการทบทวนกำหนดอายุลูกสุนัขในการวัคซีนครั้งแรกเพื่อให้เหมาะสมกับปัญหาการแพร่ระบาดของโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาติดตามในลูกสุนัขจรจัดอายุ 1-2 เดือน ซึ่งเกิดจากแม่ที่ไม่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าอาจจะช่วยควบคุมและลดอัตราการระบาดของโรคนี้ในประเทศไทยได้ดียิ่งขึ้น

สรุป

จากการศึกษาระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่และการตอบสนองต่อการทำวัคซีนครั้งแรกในลูกสุนัขที่มารับการบริการในโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เดือนที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 0.63, 0.14 และ 0.04 IU./ml ตามลำดับ แสดงถึงระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่จะเริ่มลดลงในระดับต่ำในช่วงอายุเดือนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ และน่าจะมีผลรบกวนการสร้างภูมิคุ้มกันจากวัคซีนน้อย สอดคล้องกับการศึกษาอย่างต่อเนื่องในช่วงอายุ 1-3 เดือน และลูกสุนัขที่อายุ 2 และ 3 เดือน ที่ศูนย์การสุนัขทหาร อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา มีระดับแอนติบอดีต่อโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่อยู่ในระดับต่ำ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า 1 เดือนหลังจากฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าครั้งแรกในลูกสุนัขที่อายุ 2 เดือน พบว่ามีระดับที่เพิ่มขึ้น ไม่แตกต่างจากการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าครั้งแรกในลูกสุนัขที่อายุ 3 เดือน ระดับแอนติบอดีหลังจากฉีดวัคซีนซ้ำที่อายุ 3 เดือนไปแล้ว 1 เดือนในกลุ่มแรกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ระดับแอนติบอดีในลูกสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม ได้ลดลงมาอยู่ในระดับเดียวกันเมื่อลูกสุนัขอายุ 6 เดือน และสามารถตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนซ้ำที่อายุดังกล่าวในอีก 1 เดือนถัดมา และเมื่อสุนัขอายุ 11 และ 12 เดือน ระดับแอนติบอดีในลูกสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม ยังคงลดมาอยู่ในระดับเดียวกันและสามารถตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนซ้ำที่อายุดังกล่าวได้เช่นเดิม ดังนั้นจึงน่าจะเริ่มทำการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าเข็มแรกตั้งแต่ลูกสุนัขอายุ 2 เดือนได้

เอกสารอ้างอิง

- ชาญณรงค์ มิตรมูลพิทักษ์ และ วีระ เทพสุเมธานนท์. 2540. สถานการณ์โรคพิษสุนัขบ้าในประเทศไทย. วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ฯ 9:1-2, หน้า 15-23.
- ชาญณรงค์ มิตรมูลพิทักษ์ และ วีระ เทพสุเมธานนท์. 2543. การสำรวจเรื่องแนวทางปฏิบัติเกี่ยวกับการป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าของผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ในประเทศไทย. วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ฯ 12:3-4, หน้า 11-20.
- ชาญณรงค์ มิตรมูลพิทักษ์ และ วีระ เทพสุเมธานนท์. 2544. การศึกษาย้อนหลังถึงสถานการณ์โรคพิษสุนัขบ้าที่ตรวจพบในสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2537-2542. วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ฯ 13:1, หน้า 61-70.
- ทรงศรี เกษมพิมลพร, ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร และ วิศิษฎ์ สิตปรีชา. 2540. ลูกสุนัขมีแอนติบอดีต่อไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าจากแม่จริงหรือ? วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ฯ 9:3-4, หน้า 105-110.
- ประวิทย์ ชุมเกษียร. 2532. สถานะภาพโรคพิษสุนัขบ้าในประเทศไทยและปัญหาการควบคุมป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าในประเทศไทยการปรับเปลี่ยนเพื่ออนาคต. พิมพ์ครั้งที่ 1. บรรณาธิการ : ศุภวัฒน์ ชูติวงศ์. โรงพิมพ์สามเสนการพิมพ์. กรุงเทพฯ. หน้า 17-22.
- ประเสริฐ ทองเจริญ. 2523. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ. โรคพิษสุนัขบ้า. พิมพ์ครั้งที่ 1. บรรณาธิการ : ประเสริฐ ทองเจริญ. โรงพิมพ์อักษรสมัย. กรุงเทพฯ. หน้า 113.
- พิไลพันธ์ พุระวัฒน์. 2523. ชีวิตวิทยาของไวรัสโรคพิษสุนัขบ้า. โรคพิษสุนัขบ้า. พิมพ์ครั้งที่ 1. บรรณาธิการ : ประเสริฐ ทองเจริญ. โรงพิมพ์อักษรสมัย. กรุงเทพฯ. หน้า 16.
- สงคราม เหลืองทองคำ. 2523. โรคพิษสุนัขบ้า. โรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ. หน้า 29.
- อรรถสิทธิ์ เวชชาชีวะ. 2523 บทนำ. โรคพิษสุนัขบ้า. พิมพ์ครั้งที่ 1. บรรณาธิการ : ประเสริฐ ทองเจริญ. โรงพิมพ์อักษรสมัย. กรุงเทพฯ. หน้า 2.
- Bachman M.F. and Zinkernagel R.M. 1996. The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. Immunology Today. 17(12):553-558.
- Fekadu, M. 1990. Canine rabies. In: The Natural History of Rabies. 2nd ed. Baer G.M.(editor). Boca Raton: CRC press, 367-387.
- Jayakumar, R. and Ramadass, P. 1990. Studies on cell-mediated immune response to rabies virus immunization in dogs. Vaccine. 8(4):304-305.
- Kasempimolporn, S., Chaiyabutr, N., Brahmasa, R., Mitmoonpitak, C., Supakorn, K. and Sitprija, V. 1996. Maternal Antibodies Against Rabies in Thai Puppies. A Preliminary Study. J. Med. Assoc. Thai. 79(1):36-39.

- Kuwert, E., Merieux, C., Horowski, S. And B'ogel, K. 1985. Rabies in the tropics. Springer-Verlag berlin : Heidelberg, 225.
- Lennette, E.H. and Emmons, R.W. 1971. The Laboratory Diagnosis of Rabies. Review and Prospective. In: Rabies. 77-90.
- Mitmoonpitak, C., Tepsumethanon, W. and Wilde, H. 1998. Rabies in Thailand. Epidemiol. Infect. 120: 165-169.
- Sage, G., Khawplod, P., Wilde, H., Lobaugh, C., Hemachudha, T., Tepsumethanon, W. and Lumlertdaecha, B. 1993. Immune response to rabies vaccine in Alaskan dogs: failure to achieve a consistently protective antibody response. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87:593-595.
- Seghaier, C., Cilquet, F., Hammami, S., Aouina, T., Tlati, A. And Aubert, M. 1999. Rabies mass vaccination campaigns in Tunisia : are vaccinated dogs correctly immunized. Am. J. Trop. Med. Hyg. 61(6):879-884.
- Sihvonen, L., Kulonen, K., Neuvonen, E. and Pekkanen, K. 1995. Rabies antibodies in vaccinated dogs, Acta. Vet. Scand. 36(1):87-91.
- Smith, J.S., Yager, P.A. and Baer, G.M. 1973. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Bull. WHO. 48:535-541.
- Smith, J.S., Yager, P.A. and Baer, G.M. 1973. A rapid tissue culture test for determining rabies neutralizing antibody. In: Laboratory techniques in Rabies. 3rd ed. Kaplan, M.M.(ed.) Geneva : WHO. 23:354-357.
- Smith, J.S., Yager, P.A. and Baer, G.M. 1996. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody, Bull, WHO, 181-189.
- Tepsumethanon, W., Polsuwan, C., Lumlertdaecha, B., Khawplod, P., Hemachudha, T., Chutivonges, S., Wilde, H., Chiewbamrunkiat, M. and Phanuphak, P. 1991. Immune response to rabies vaccine in Thai dogs : a preliminary report. Vaccine. 9:627-630.
- Tierkel E.S. 1975. Canine Rabies. In: The Natural History of Rabies. 2:123-136.
- Winters W.D. 1981. Time dependent decrease of maternal canine virus antibodies in newborn pups. Veterinary Record. 108:295-299.

สรุปยอดค่าใช้จ่ายโครงการวิจัย เรื่อง การศึกษาภูมิคุ้มกันต่อโรคพิษสุนัขบ้าที่ได้รับถ่ายทอดจากแม่
และการตอบสนองต่อการทำวัคซีนในลูกสุนัข

งบประมาณ	รายการ	รายรับ (บาท)	รายจ่าย (บาท)	คงเหลือ (บาท)	หมายเหตุ
<u>2543</u>	ได้รับงบประมาณ	195,000.00	-	195,000.00	
	ค่าวัสดุ		6,404.41		
	ค่าวัสดุ		40,936.49		
	ค่าจ้างผู้ช่วยวิเคราะห์		3,000.00		
	ค่าจ้างเจ้าหน้าที่คนงาน เก็บตัวอย่าง		3,100.00	<u>53,440.90</u>	
	<u>เหลือเงินคืนคลัง</u>			141,559.10	
<u>2545</u>	ได้รับงบประมาณ	33,900.00		33,900.00	
	ค่าวัสดุ (คุณภาพมาศ)		10,000.00		
	ค่าตรวจ		20,000.00		
	ค่าจ้างผู้ช่วยวิเคราะห์		3,000.00		
	ค่าจ้างเจ้าหน้าที่คนงาน เก็บตัวอย่าง		900.00	<u>33,900.00</u>	
	<u>ไม่มีเงินคืนคลัง</u>			0	

ดังนั้น เงินเหลือไม่ได้ใช้ต้องคืนคลัง 141,559.10 บาท

ภาควิชาอายุรศาสตร์
24 มกราคม 2551