

การศึกษาการแพร่กระจายแอนติเจนของเชื้อพิษสุนัขบ้า และการอักเสบ
ในระบบประสาทส่วนกลางในระยะแรกของสุนัขบ้าที่มีอาการคลุ้มคลั่งและอ่อนแรง

นางสาวนิศาชล เทพา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Distribution of rabies antigen and inflammatory response in the central nervous system of
canine furious and paralytic rabies

Miss Nisachol Thepa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine Chulalongkorn University
Academic Year 2010
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการแพร่กระจายแอนติเจนของเชื้อพิษสุนัขบ้า และการอักเสบ ในระบบประสาทส่วนกลางในระยะแรกของสุนัขบ้าที่มีอาการคลุ้มคลั่งและอ่อนแรง
โดย	นางสาวนิศาชล เทพา
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชนพ ช่างโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ อติศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ชนพ ช่างโชติ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.ชัชฌา สอนกระต่าย)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พูลลาภ ชีพสุนทร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(นายสัตวแพทย์วีระ เทพสุเมธานนท์)

นิตาชาล เทพา: การศึกษาการแพร่กระจายแอนติเจนของเชื้อพิษสุนัขบ้า และการอักเสบในระบบประสาทส่วนกลางในระยะแรกของสุนัขบ้าที่มีอาการคลุ้มคลั่งและอ่อนแรง. (Distribution of rabies antigen and inflammatory response in the central nervous system of canine furious and paralytic rabies) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ.นพ.ชนพ ช่วงโชติ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุธา, 63 หน้า.

โรคพิษสุนัขบ้า มีลักษณะอาการทางคลินิกแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือชนิดคลุ้มคลั่ง (furious หรือ encephalitic rabies) และอ่อนแรง (dumb หรือ paralytic rabies) สำหรับกลไกการเกิดอาการแสดงทางคลินิกที่แตกต่างกันของโรคพิษสุนัขบ้านี้ ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จากการตรวจศพผู้ป่วยที่เสียชีวิตไม่พบความแตกต่างของการกระจายตัวของเชื้อไวรัสและการอักเสบของสมอง และจากการศึกษาสมองคนไข้ก่อนเสียชีวิตด้วยเครื่องสแกนแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) ก็ไม่พบความแตกต่าง ต่อมาได้มีการศึกษาในสุนัขที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้าในระยะแรกของโรคด้วยเครื่อง MRI พบสัญญาณความผิดปกติในสุนัขบ้าชนิดอ่อนแรง มากกว่าชนิดคลุ้มคลั่ง และเมื่อทำการตรวจสุนัขบ้าที่ตายแล้ว พบว่าสมองของสุนัขที่มีอาการแบบคลุ้มคลั่ง มีปริมาณไวรัสสูงกว่าในกลุ่มอาการอ่อนแรง ในทางตรงกันข้าม สมองของสุนัขที่มีอาการแบบอ่อนแรง มีระดับ cytokine ที่สูงกว่า ผลการศึกษาดังกล่าวในสุนัข จึงแตกต่างจากผลที่ได้จากการศึกษาในคน ซึ่งความแตกต่างนี้ น่าจะเกิดมาจากการศึกษาโรค ในระยะเวลาของการดำเนินโรคที่แตกต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษากการกระจายตัวของแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าและการอักเสบของระบบประสาท เพื่อศึกษาว่าจะมีความแตกต่างกันหรือไม่ ในโรคพิษสุนัขบ้าทั้ง 2 แบบอาการ โดยศึกษาในระยะแรกของโรค และทำศึกษาจากสมองและไขสันหลังระดับคอของสุนัขที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาติชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดอ่อนแรง อย่างละ 5 ตัวอย่าง นำมาศึกษาการกระจายตัวของแอนติเจนเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า และลักษณะการอักเสบในตำแหน่งต่าง ๆ ของระบบประสาทส่วนกลาง ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี Immunohistochemistry (IHC) และ Image analysis การศึกษานี้พบว่าเซลล์ประสาทที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้าเป็นจำนวนมาก ในก้านสมองและไขสันหลังระดับคอ ในสุนัขบ้าทั้ง 2 กลุ่มอาการ เซลล์ประสาทที่ติดเชื้อในสมองใหญ่มีปริมาณมากกว่าในสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่ง และพบการอักเสบรุนแรงที่ก้านสมองของสุนัขบ้าชนิดอ่อนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับสุนัขบ้าแบบคลุ้มคลั่ง ส่วนการอักเสบในสมองใหญ่ พบเพียงเล็กน้อยในทั้ง 2 กลุ่มอาการ การพบการกระจายของแอนติเจนไวรัสพิษสุนัขบ้าและการอักเสบ มีความแตกต่างกันในสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดอ่อนแรงในระยะแรกของโรค การอักเสบรุนแรงที่ก้านสมองของสุนัขบ้าชนิดอ่อนแรงอาจช่วยชะลอไม่ให้เชื้อไวรัสเข้าสู่สมองได้สะดวก การอักเสบที่ต่างกันนี้ อาจเกิดจากความแตกต่างของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า หรือความแตกต่างในการตอบสนองต่อเชื้อของสัตว์ที่เป็นโรค

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์..... ลายมือชื่อนิติ.....
ปีการศึกษา 2553..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

#5074791330 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : RABIES / FURIOUS RABIES / PARALYTIC RABIES / RABIES ANTIGEN / ENCEPHALITIS

NISACHOL THEPA: DISTRIBUTION OF RABIES ANTIGEN AND INFLAMMATORY RESPONSE IN NERVOUS SYSTEM OF CANINE FURIOUS AND PARALYTIC RABIES AT THE EARLY STAGE.

ADVISOR : PROF.SHANOP SHUANGSHOTI,M.D., CO-ADVISOR: PROF.THIRAVAT HEMACHUDHA,M.D.,63 pp.

Furious and paralytic rabies are two distinct clinical entities. We have previously reported that there was no specific pattern of antigen and inflammation distribution in the central nervous system (CNS) of rabies patients. Further analysis in rabies infected dogs during early stage using magnetic resonance imaging showed similar lesion localization in the brains with more pronounced abnormal CNS signal intensities in paralytic rabies infected dogs. This was in accord with greater brain innate immunity responses in paralytic rabies. Although a significantly greater amount of viral load was found in the brains of furious rabies infected dogs, there was no quantitative data on viral amount in the spinal cord as well as data on the inflammation distribution of the whole CNS. Postmortem examination of brains and spinal cords from furious and paralytic rabid dogs (5 of each) was performed. These animals were sacrificed early after the biting incident for rabies examination. Quantitative image analysis revealed larger amount of rabies antigen in the brain of furious dogs than in the paralytic counterpart whereas it was comparable at all levels of spinal cord in both forms. Viral quantities were discrepant between those in the brain and spinal cord of paralytic rabid dogs. Two of 5 paralytic dogs had none or nearly absence of rabies antigen in the brains. Inflammatory response was barely seen except at the brainstem of paralytic dogs. We suggest that brainstem region may be the barricade in preventing viral spread to the cerebral hemispheres.

Field of Study : Medical Science..... Student's Signature

Academic Year : 2010..... Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความอนุเคราะห์ของท่านอาจารย์ที่ปรึกษาศาสตราจารย์นายแพทย์ ชนพ ช่างโชติ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ท่านอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศาสตราจารย์นายแพทย์ธีระวัฒน์ เหมะจุธา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผศ.ดร.พรชัย พุกษ์ภัทรา นนท์ ภาควิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะและความช่วยเหลือในหลายสิ่งหลายอย่างจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ ชูษณา สวณกระต่าย รองศาสตราจารย์ ดร.พูลลาภ ชีพสุนทร และนายสัตวแพทย์วีระ เทพสุเมธานนท์ กรรมการวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ ดร.สุภาภรณ์ วัชรพุกษาดิ หัวหน้าห้องปฏิบัติการโรคทางสมอง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย คุณปริษา เรืองเวชวรชัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาทุกคน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ เอื้อเฟื้อชิ้นเนื้อและสอนวิธีปฏิบัติการ ทั้งให้คำแนะนำ คำปรึกษาการใช้อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์แพทย์หญิง พรรณมณฑน อุษชิน ฝ่ายเวชศาสตร์ชั้นสูง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ผู้ให้การสนับสนุนผู้วิจัยในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พระน้องชาย และเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือทั้งกาย ใจ อีกทั้งความรักและกำลังใจที่ติดใจจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และย่อ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
คำถามงานวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
สมมติฐานของงานวิจัย.....	3
รูปแบบงานวิจัย.....	3
ขอบเขตงานวิจัย.....	4
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	5
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	7
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า.....	8
ลักษณะอาการทางคลินิก.....	10

	หน้า
บทที่	
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	13
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	15
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	18
วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	21
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	24
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	40.....
อภิปรายผล.....	40
สรุปผลการวิจัย.....	42
รายการอ้างอิง.....	43
ภาคผนวก.....	46
ภาคผนวก ก.....	47
ภาคผนวก ข.....	48
ภาคผนวก ค.....	49
ภาคผนวก ง.....	50
ภาคผนวก จ.....	53
ภาคผนวก ฉ.....	54.....
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	63

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงผลการวิเคราะห์หาแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าเชิงปริมาณและการให้ระดับ ความรุนแรงการอักเสบของระบบประสาทในสุนัขบ้าชนิดอ่อนแรง.....	31
2. แสดงผลการวิเคราะห์หาแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าเชิงปริมาณและการให้ระดับ ความรุนแรงการอักเสบของระบบประสาทในสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่ง.....	35
3. แสดงการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีทดสอบ Man-Whitney test ในสมองส่วนต่างๆ และไขสันหลังของสุนัขบ้า 2 ชนิดอาการ.....	40

สารบัญภาพ

ภาพประกอบที่	หน้า
1. แบบจำลองเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า.....	10
2. ลักษณะการวิเคราะห์หาแอนติเจนของเชื้อพิษสุนัขบ้าเชิงปริมาณ (Quantitative rabies antigen analysis for all regions except hippocampal dentate fascia).....	22
3. แสดงการวิเคราะห์เชิงปริมาณในการตรวจหาเชื้อพิษสุนัขบ้าในบริเวณระบบประสาทส่วน hippocampus (Quantitative rabies antigen analysis for hippocampal dentate fascia).....	23
4. แสดงผลจากการย้อมแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี Immnohistochemical (IHC) จากกล้องจุลทรรศน์ ขนาดขยาย 400 เท่า.....	25
5. แสดงผลการวิเคราะห์หาเชื้อพิษสุนัขบ้าเชิงปริมาณ ด้วยเทคนิค Image analysis โดยใช้โปรแกรม MATLAB R2007a.....	26
6. แสดงผลการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายขนาด 400 เท่า.....	27
7. แสดงการวิเคราะห์ที่เปรียบเทียบการให้ระดับความรุนแรงของการอักเสบในสมอง และไขสันหลังของสุนัขบ้าชนิดอาการคั่งคั่งและอ่อนแรง.....	39

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
ABLV	Australiaon Bat Lyssavirus
AchR	Ncotinic Aetylcholine Rceptor
AHC	Anterior Horn Cell
°C	Degree celsius
CNS	Central Nervous System
DAB	3,3 Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
DNA	Deoxyribonucleic acid
DUV	Duvenhage virus
EBL-1	European Bat Lyssavirus type1
EBL-2	European Bat Lyssavirus type2
<i>et al.</i>	Et. Alii(Latin), and other.
FBS	Fetal Bovine Serum
G protein	Glycoprotein
IHC	Immunohistochemistry
L protein	Viral RNA Plymerase
LBV	Lagos Bat Virus
M	Molar
M protein	Matrix protein
ml	Mililiter
mM	Milimolar
MOKV	Mokola Virus
MRI	Magnetic Resonance Imaging
ng	nanogram
nM	nanomolar
N protein	Nucleoprotein
PBS	Phosphate Buffer Saline

P protein	Phosphoprotein
RNA	Ribonucleic acid
TBS buffer	Tris base EDTA buffer
μ l	Microliter
μ g	Microgram
μ M	Micromolar

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพิษสุนัขบ้า เป็นโรคติดต่อจากสัตว์มาสู่คนที่รู้จักกันมาช้านานและมีความรุนแรงมาก ผู้ติดเชื้อเมื่อแสดงอาการจะเสียชีวิตทุกราย ในแต่ละปีองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้มีรายงานการเสียชีวิตของผู้ป่วยจากโรคพิษสุนัขบ้าทั่วโลกประมาณ 55,000 ราย^(1,2,3) ซึ่งนับได้ว่ามีจำนวนสูงกว่าผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากไข้เหลือง ไข้เลือดออก และสมองอักเสบจากเชื้อ Japanese encephalitis รวมกัน โดยเฉพาะประเทศแถบทวีปเอเชีย เช่นอินเดีย มีรายงานการเสียชีวิตจากโรคนี้ถึง 30,000 รายต่อปี ปากีสถานประมาณ 5,000 รายต่อปี และในประเทศจีนพบรายงาน 5,000-7,000 รายต่อปี

สำหรับประเทศไทย มีรายงานผู้เสียชีวิตจากโรคพิษสุนัขบ้าเฉลี่ย 20 รายต่อปี หรือคิดเป็นอัตราส่วน 0.03 ต่อจำนวนประชากร 100,000 คน⁽⁴⁾ จากข้อมูลการศึกษาเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้าทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าทั่วประเทศรวม 38 จังหวัด จำนวน 106 ตัวอย่าง ผลการตรวจพบว่าสัตว์ที่เป็นพาหะนำโรคพิษสุนัขบ้าส่วนใหญ่ ได้แก่ สุนัข พบว่า 82% ของจำนวนตัวอย่าง 106 ตัวอย่าง พบว่าคนติดเชื้อพิษสุนัขบ้าถูกสุนัขกัด ส่วนแมวพบเพียง 5% และส่วนใหญ่เชื้อพิษสุนัขบ้ามักมีเจ้าของสุนัข และสุนัขไม่ได้รับวัคซีน คิดเป็นร้อยละ 61 จะเห็นว่าสถานการณ์โรคพิษสุนัขบ้าของประเทศไทยมีสาเหตุหลักมาจากสุนัขบ้ากัด⁽⁴⁾ จากการรายงานนี้ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลในปี 2546-2550

โรคพิษสุนัขบ้า มีเชื้อต้นเหตุมาจากไวรัสพิษสุนัขบ้า (Rabies virus) ซึ่งจัดอยู่ใน Family Rhabdoviridae ใน Genus Lyssavirus^(1,5,6,7) เมื่อผู้ป่วยได้รับเชื้อพิษสุนัขบ้าแล้วไวรัสจะมีการแบ่งตัวและเพิ่มปริมาณในสมองโดยมักจะพบไวรัสมากในบริเวณ spinal cord, brainstem และ basal ganglia⁽⁶⁾ ผู้ป่วยมีอาการทางคลินิกจำแนกได้เป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ Furious หรือ Encephalitis rabies ผู้ป่วยจะมีอาการคลุ้มคลั่ง กลัวลม กลัวน้ำ หรือมีอาการทางสมองเป็น

อาการสำคัญ และ Dumb หรือ Paralytic rabies ผู้ป่วยจะมีอาการอัมพาตหรือมีอาการอ่อนแรงของแขน ขา เป็นสำคัญ

จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่ทราบพยาธิกำเนิดของอาการคลุ้มคลั่งและอ่อนแรง ว่าเกิดจากสาเหตุใด ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการกระจายตัวของแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าและการอักเสบของระบบประสาท ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ ในโรคพิษสุนัขบ้า ทั้ง 2 แบบอาการ และในระยะต่าง ๆ ของโรค

คำถามงานวิจัย (Research Questions)

การกระจายตัวของแอนติเจนไวรัสพิษสุนัขบ้าและการอักเสบของระบบประสาทส่วนกลางแตกต่างกันหรือไม่ในสุนัขบ้าที่แสดงอาการชนิดคลุ้มคลั่งและอ่อนแรงในระยะแรกของโรค

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการกระจายตัวของแอนติเจนไวรัสพิษสุนัขบ้าและการอักเสบของระบบประสาทส่วนกลางในสุนัขบ้าที่แสดงอาการชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดอ่อนแรงในระยะแรกของโรค

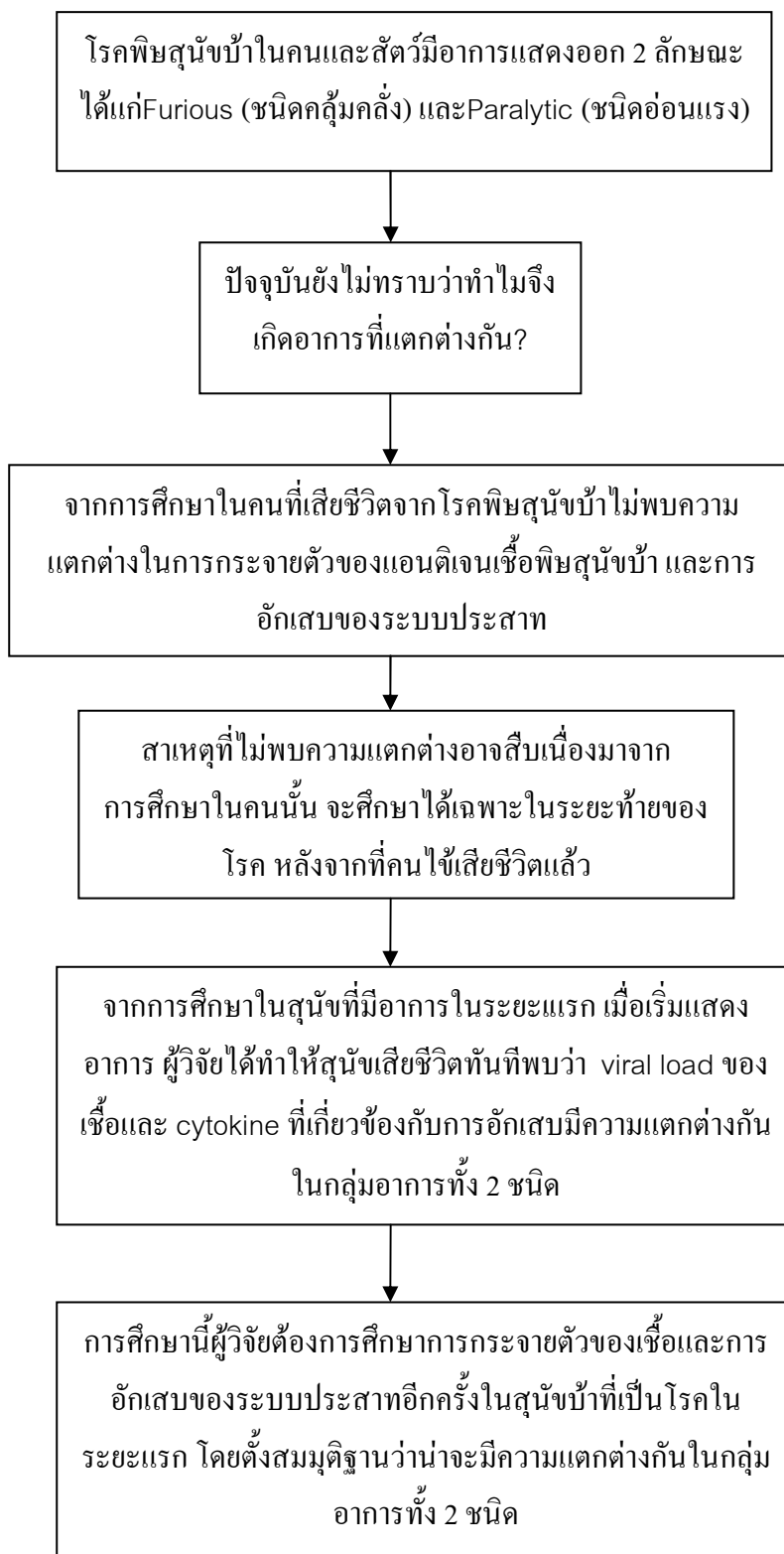
สมมติฐานของการวิจัย

การกระจายตัวของแอนติเจนไวรัสพิษสุนัขบ้าและการอักเสบของระบบประสาทส่วนกลางในสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดอ่อนแรงน่าจะมีความแตกต่างกัน ในระยะแรกของโรค

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นงานวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive study)

ขอบเขตของการวิจัย



ข้อตกลงเบื้องต้น

1. สุนัขทุกตัวได้รับการตรวจวินิจฉัยยืนยันว่าเป็นโรคพิษสุนัขบ้าจากหน่วยชั้นสูตรโรคพิษสุนัขบ้า สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
2. การแยกลักษณะอาการคลุ้มคลั่ง (Furious) และ อาการอ่อนแรง (Paralytic) กระทำโดยสัตวแพทย์จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ซึ่งอาศัยการวินิจฉัยจากการแสดงออกของสุนัข บ้างตั้งแต่ติดเชื้อจนกระทั่งมีการพัฒนาของโรค หากพบว่าแสดงอาการกระวนกระวาย ดุร้าย เข้ากัด ทำร้าย ตื่นเต้น ไวต่อสิ่งกระตุ้น จัดเป็นชนิดคลุ้มคลั่ง(Furious) และหากพบอาการคางห้อย ปากอ้า เหา เสียงแหบ น้ำลายไหล ขาหลังอ่อนแรง จัดเป็นชนิดอ่อนแรง (Paralytic)
3. การติดเชื้อในระยะแรกของโรค (Early stage) จะวินิจฉัยโดยอาศัยเกณฑ์จากระยะเวลาที่สุนัขบ้าติดเชื้อและแสดงอาการในระยะแรกของโรค โดยอาศัยการวินิจฉัยจากสัตวแพทย์จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย
4. ตัวอย่างสมองและไขสันหลัง ได้จากสุนัขบ้าที่ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาติ ซึ่งจะเก็บตัวอย่างในระยะแรกของการติดเชื้อ (Early stage) หลังแสดงอาการโดยทำให้สุนัขเสียชีวิตอย่างสงบภายใน 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ได้รับการควบคุมดูแลจากสัตวแพทย์

ข้อจำกัดของการวิจัย

ไม่มี

คำสำคัญ

Rabies
Antigen
Furious rabies
Paralytic rabies
Rabies antigen
Encephalitis

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

ระยะ Early stage คือ ระยะเวลาหลังจากสุนัขเป็นโรคพิษสุนัขบ้าโดยติดเชื้อตามธรรมชาติ แล้วเริ่มแสดงอาการของโรคในระยะแรกๆ และสุนัขบ้าที่ได้รับเชื้อมีการดำเนินโรคไปจนกระทั่งเริ่มเข้าสู่ระยะสุดท้าย (early to late) ได้แก่ อาการไข้ สุนัขมีอุปนิสัยเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม กระวนกระวาย แสดงอาการคลุ้มคลั่ง ไวต่อสิ่งกระตุ้นเช่น แสง เสียง เข้ากัด ทำร้าย กลัวลม กลัวน้ำ หรือมีอาการคางห้อย ปากอ้า เห่า เสียงแหบ น้ำลายไหล

ระยะ Late stage คือ ระยะเวลาที่สุนัขเป็นโรคพิษสุนัขบ้าโดยติดเชื้อพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาติ หลังจากแสดงอาการแล้วมีการดำเนินโรคไปจนกระทั่งสุนัขแสดงอาการอัมพาตขาหลังอ่อนแรง เชื่องซึม กลืนน้ำลำบาก ยืนลำบากไม่ได้ ล้มตัวนอน ไม่ดุ ไม่กัด จนกระทั่งเสียชีวิต

Immunohistochemistry Technique คือ เทคนิควิธีที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนภายในเซลล์ โดยโครงสร้างและเนื้อเยื่อไม่ถูกทำลาย หลักการของเทคนิควิธี Immunohistochemistry Technique (IHC) จะอาศัยปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจนหรือสิ่งที่ต้องการตรวจหาและแอนติบอดีหรือภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะต่อสิ่งที่ต้องการตรวจหา นั้นและทำการตรวจหาปฏิกิริยาการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น

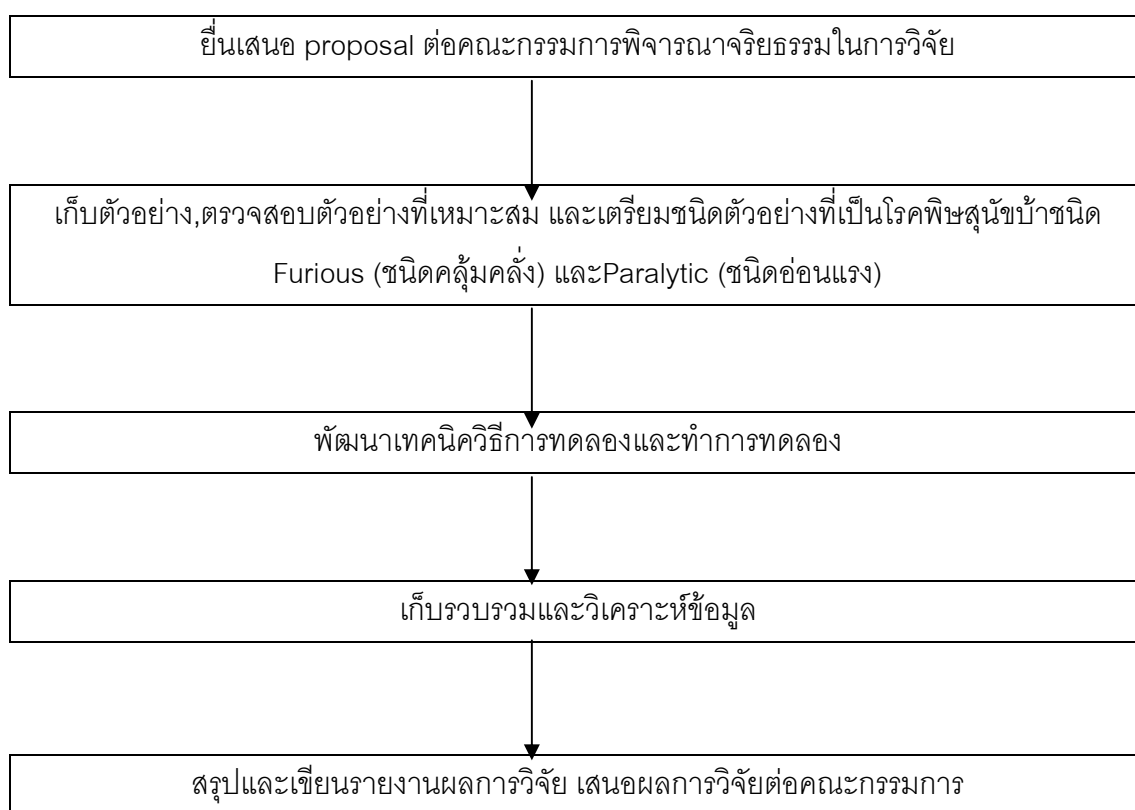
Imaging analysis คือ เทคนิควิธีการประมวลผลภาพโดยการนำเอาภาพมาประมวลผล หรือคิดคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เราต้องการในเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยอาศัยหลักการการแยกชนิดของเซลล์ต่างๆด้วยสี ขนาด รูปร่าง การคำนวณผลและประมวลผลทำให้สามารถแยกชนิดของเซลล์และสิ่งที่เราต้องการที่มีความแตกต่างกันได้อย่างมีประสิทธิภาพและใช้ระยะเวลาอันสั้น

Semi-quantitative assessment inflammation คือ การประเมินความรุนแรงของการอักเสบ โดยจัดลำดับจากน้อยไปมาก โดยใช้การประมาณ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เข้าใจกลไกการเกิดอาการคลุ้มคลั่งและอ่อนแรงในโรคพิษสุนัขบ้ามากยิ่งขึ้น

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย



บทที่ 2

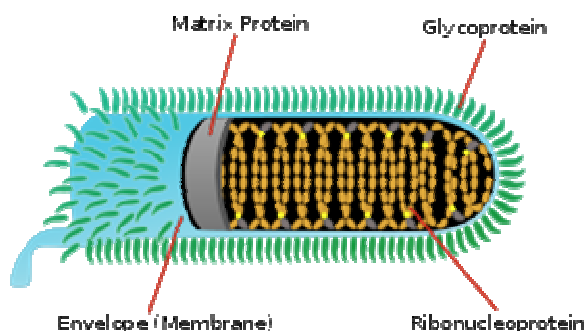
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การติดเชื้อพิษสุนัขบ้าในคนนั้นโดยส่วนมากมักเกิดจากการถูกสัตว์กัดโดยเฉพาะอย่างยิ่ง การได้รับเชื้อจากการถูกสุนัขกัด ซึ่งระดับความรุนแรงของโรคนั้นจะขึ้นอยู่กับบาดแผลที่ได้รับ, ตำแหน่งบริเวณที่ถูกกัด, ปริมาณและคุณภาพของน้ำลายที่มีเชื้อพิษสุนัขบ้าจากสัตว์ที่เข้าสู่ บาดแผล และชนิดของไวรัส⁽⁵⁾ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับตำแหน่งบริเวณที่ถูกกัดโดยตำแหน่งที่ถูกกัด จะมี nicotinic acetylcholine receptor (AChR) สูง เช่นบริเวณศีรษะหรือใบหน้า, บริเวณที่มี เลือดออกง่าย ผู้ป่วยจะมีความเสี่ยงในการเสียชีวิตสูงกว่าการถูกกัดบริเวณอื่นๆ และจะมีระยะพัก ตัวของโรคเป็นระยะเวลาที่สั้นกว่า เนื่องจากอยู่ใกล้ระบบประสาทส่วนกลาง หากไม่ได้มีการ รักษาหลังการสัมผัสโรคที่ถูกวิธี พบว่าการถูกกัดในบริเวณศีรษะหรือใบหน้ามีความเสี่ยงในการ เสียชีวิตสูงมากกว่าร้อยละ 80 ในขณะที่ผู้ป่วยที่ถูกกัดในบริเวณมือหรือแขนจะมีอัตราเสี่ยงในการ เสียชีวิตร้อยละ 15-40 และที่น้อยที่สุดได้แก่ส่วนลำตัวหรือขา ร้อยละ 5-10 และเมื่อถูกกัดผ่าน เสื้อผ้า น้อยกว่าร้อยละ 5%

เชื้อสาเหตุ (Causative agent)

โรคพิษสุนัขบ้า เกิดจากเชื้อไวรัสที่มีชื่อว่า Rabies virus จัดอยู่ใน Family Rhabdoviridae อยู่ใน Genus Lyssavirus⁽⁶⁾ ประกอบด้วย 7 Genotype ซึ่งไวรัสพิษสุนัขบ้าจัดอยู่ใน genotype 1 ส่วนอีก 6 genotype ได้แก่ Lagos bat virus (LBV, genotype 2), Mokola virus (MOKV, genotype 3), DUV (genotype 4), European bat lyssavirus type 1 (EBL-1, genotype 5), European bat lyssavirus type 2 (EBL-2, genotype 6) และ Australian bat lyssavirus (ABLV, genotype 7)⁽⁹⁾

Rabies virus มีรูปร่างคล้ายกระสุนปืน (Bullet shape) ปลายด้านหนึ่งโค้งมน อีกด้าน หนึ่งตัดตรงซึ่งตรงกลางจะเว้าเข้าด้านในทำให้เป็นช่องกลวง ขนาดประมาณ 180 x 75 นาโนเมตร โครงสร้างของไวรัสอาจแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน ได้แก่ envelope และ nucleocapsid



รูปที่ 1. แบบจำลองเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า

(รูปจาก : <http://en.wikipedia.org/wiki/Rabies>)

Envelope มีองค์ประกอบที่สำคัญคือ glycoprotein G และ ไขมันหรือ lipid bilayer ถัดมาเป็นชั้นของโปรตีนที่เรียกว่า Matrix หรือ M protein ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมโยงระหว่าง envelope กับ nucleocapsid ของไวรัส

Nucleocapsid มีลักษณะของ capsid เรียงตัวเป็นรูปบันไดวน (Helical symmetry) ประกอบด้วย genome ของไวรัส และโปรตีนเช่น phosphoprotein (P), nucleoprotein (N), และ RNA transcriptase (L) เป็นต้น Genome ของ rabies virus เป็น RNA สายเดี่ยวและเป็นสายลบ ประกอบด้วย nucleotide ประมาณ 11,932 nucleotides โดยจะมี leader sequence ที่ 3' end และ gene ที่ได้ ประกอบด้วย 5 monocistronic gene ได้แก่ nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrixprotein (M), glycoprotein (G) และ RNA transcriptase (L)⁽⁹⁾

ไวรัสพิษสุนัขบ้านี้มักก่อให้เกิด inclusion body ในเซลล์ที่ติดเชื้อหรือที่เรียกว่า 'Negri body' ซึ่งก็คือ intracellular matrix form ของ RNA protein complex ของ rabies virus และเป็นลักษณะสำคัญในการตรวจหาเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า⁽¹⁰⁾

ระยะฟักตัวของโรค (Incubation period)

คุณลักษณะหนึ่งของโรคพิษสุนัขบ้าคือจะมีระยะฟักตัวที่หลากหลายแตกต่างกันไปอาจใช้ระยะเวลาสั้นน้อยกว่า 7 วัน หรืออาจยาวนานไปจนถึง 6 ปี⁽¹⁰⁾ ซึ่งระยะฟักตัวจะสั้นหรือยาวขึ้นอยู่กับปัจจัยบางประการ ได้แก่ ความรุนแรงของบาดแผล บริเวณของปลายประสาทที่ตำแหน่งของแผล และระยะทางของบาดแผลไปยังสมอง ยิ่งใกล้ยิ่งทำให้ระยะฟักตัวของโรคสั้นเนื่องจากเชื้อสามารถเดินทางเข้าสู่สมองได้อย่างรวดเร็ว พบว่าผู้ป่วยที่เสียชีวิตภายใน 1 สัปดาห์โดยทั่วไปมัก

ได้รับเชื้อพิษสุนัขบ้าจากสุนัขกัดและเชื้อสามารถเข้าสู่ระบบประสาทหรือแขนงประสาทได้โดยตรง จึงทำให้มีระยะฟักตัวสั้นและผู้ป่วยเสียชีวิตโดยง่าย

ลักษณะอาการทางคลินิก (Clinical Feature)

โรคพิษสุนัขบ้ามักจะก่อให้เกิดภาวะสมองอักเสบ ซึ่งสามารถแบ่งระยะของโรคออกได้เป็น 5 ระยะ ได้แก่ Incubation period , Prodrome, Acute neurological phase, Coma และ Death หรือ Recovery ^(5,7,10) ชนิดอาการของโรคพิษสุนัขบ้าในผู้ป่วยติดเชื้อมักแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดดังนี้

1. Furious rabies หรือ Encephalitic rabies (อาการแบบคลุ้มคลั่ง)

พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อมักจะก่อให้เกิดภาวะสมองอักเสบ ซึ่งสามารถแบ่งระยะของโรคออกได้เป็น 5 ระยะ ได้แก่ Incubation period , Prodrome, Acute neurological phase, Coma และ Death หรือ Recovery ^(5,7,10) ชนิดอาการของโรคพิษสุนัขบ้าในผู้ป่วยติดเชื้อมักแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดดังนี้

พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อมักจะก่อให้เกิดภาวะสมองอักเสบ ซึ่งสามารถแบ่งระยะของโรคออกได้เป็น 5 ระยะ ได้แก่ Incubation period , Prodrome, Acute neurological phase, Coma และ Death หรือ Recovery ^(5,7,10) ชนิดอาการของโรคพิษสุนัขบ้าในผู้ป่วยติดเชื้อมักแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดดังนี้

พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อมักจะก่อให้เกิดภาวะสมองอักเสบ ซึ่งสามารถแบ่งระยะของโรคออกได้เป็น 5 ระยะ ได้แก่ Incubation period , Prodrome, Acute neurological phase, Coma และ Death หรือ Recovery ^(5,7,10) ชนิดอาการของโรคพิษสุนัขบ้าในผู้ป่วยติดเชื้อมักแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดดังนี้

1.1 Fluctuation of consciousness

ผู้ป่วยจะมีอาการตื่นเต้น กระวนกระวายต่อสิ่งเร้าเช่น แสง เสียง เป็นต้น และจะสลับกับสภาวะรู้สึกตัวปกติ ซึ่งจะทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อยๆจนผู้ป่วยอาจจะอาละวาด และผุดลุกผุดนั่งระหว่างที่ผู้ป่วยกลับสู่ภาวะปกติจะสามารถพูดคุย ได้ตอบเรื่องต่างๆได้ทุกอย่าง แต่บางครั้งจะจำไม่ได้หรือไม่เข้าใจตนเองขณะที่แสดงอาการผิดปกติ สภาพเช่นนี้จะดำเนินไปประมาณ 2-3 วันแล้วผู้ป่วยจะเริ่มซึม และไม่รู้สึกตัวในระยะ 24 ชั่วโมง สุดท้ายจะเริ่มมีความดันต่ำ ช็อก และอาจมีอาเจียนเป็นเลือด

1.2 Phobic spasms

ได้แก่อาการกรล้นน้ำ กลั้วลม ลักษณะทั้ง 2 ประการอาจไม่พบร่วมกัน และไม่จำเป็นที่จะต้องมีภาวะเกร็งตัวของกล่องเสียง (laryngeal spasms) อาการกรล้นน้ำ กลั้วลม จะเห็นได้ชัดเจนผู้ป่วยรู้สึกตัวเท่านั้น เมื่อผู้ป่วยเริ่มซึมอาการเหล่านี้จะหายไป แต่ผู้ป่วยจะมีอาการถอนหายใจเป็นพักๆ (inspiratory spasms) ซึ่งเกิดขึ้นเองและเป็นอาการสำคัญ ซึ่งช่วยในการวินิจฉัย

1.3 Autonomic stimulation

ได้แก่อาการขนลุกเป็นบางส่วนหรือทั้งตัว รุ่มาตามีสภาพไม่ตอบสนองต่อแสง และอาจขยายเต็มที่หรือห่อตัวเต็มที่ เป็นระยะสั้นๆ และที่สำคัญคือจะมี น้ำลายมากผิดปกติ จะต้องบ้วนหรือถ่มเป็นระยะ นอกจากนั้นจะมีอาการคันเฉพาะที่บริเวณถูก สัตว์กัด (local neuropathic symptoms) อาจคันปวดแสบปวดร้อน ปวดลึกๆ ซึ่งจะแพร่กระจายไปทั่วแขน ขา หรือหน้าซีก ซึ่งอาจช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยได้

2. Dumb หรือ Paralytic rabies (อาการแบบอัมพาต หรืออาการอ่อนแรง)

ระยะการดำเนินโรคช้า โดยเฉลี่ยจะเสียชีวิตในเวลา 11.5- 13 วัน ผู้ป่วยจะมีอาการแขน ขา อ่อนแรงเป็นอาการสำคัญรวมทั้งมีลักษณะของการตรวจคลื่นไฟฟ้าของกล้ามเนื้อและกระแสประสาท จะคล้ายคลึงกับผู้ป่วยที่มีเส้นประสาทอักเสบชนิด Guillian Barre Syndrome^(11,12) กล่าวคือ มีกล้ามเนื้ออ่อนแรงบริเวณต้นแขน ขา ทั้งซีกขวาและซ้ายพร้อมๆกัน และพบใบหน้าอ่อนแรงทั้ง 2 ด้าน (facial palsy) ร่วมกับ deep tendon reflex หายไป⁽¹²⁾ เมื่อมีอาการมากขึ้นจะ หายใจไม่ได้ ผู้ป่วย paralytic rabies จะไม่มีความแปรปรวนในการรับรู้ หรือมีสติสัมปชัญญะที่ ค่อนข้างปกติ โดยบางครั้งอาจมีอาการมึนงง ร่าเริงไม่เข้ากับสภาพเจ็บป่วยของตนและพบ อาการกลั้วน้ำ กลั้วลมน้อยมาก และอาจพบอาการถอนหายใจ (inspiratory spasms) แต่ไม่เห็น ชัดเจนเนื่องจากมีกล้ามเนื้อคอ กระบังลม และแขน ขา อ่อนแรงค่อนข้างมาก อาการคันเฉพาะที่ พบเช่นเดียวกับ furious rabies แต่พบได้ประมาณ 1 ใน 3 ของผู้ป่วย rabies

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีความพยายามที่จะค้นหาสาเหตุที่ทำให้เกิดความแตกต่างของ อาการ (furious และ paralytic) ในโรคพิษสุนัขบ้า ได้มีการศึกษาลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากสมองผู้เสียชีวิต ที่ยื่น 3 ตำแหน่ง คือ glycolprotein gene, phosphoprotein gene, nucleoprotein gene⁽¹³⁾ ซึ่งก็ไม่พบความแตกต่างในพันธุกรรมของไวรัส การศึกษาการ กระจายตัวของแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าและการอักเสบ ในแต่ละส่วนต่าง ๆ ของระบบประสาท ส่วนกลางในผู้ป่วยที่เสียชีวิตแล้ว และ การศึกษาภาพสมองและไขสันหลัง ขณะที่ยังมีชีวิต อยู่ ด้วยเครื่องสแกนแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) ก็ไม่พบว่าแตกต่างกันในผู้ป่วย 2 กลุ่ม^(6,14)

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษา serial electrophysiology ของเส้นประสาทส่วนปลาย พบว่าผู้ป่วยชนิดอาการคัมคั่ง มีความผิดปกติของ anterior horn cell ในไขสันหลัง ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางพยาธิวิทยาที่พบว่า anterior horn cell เกิด central chromatolysis ส่วนในกลุ่ม paralytic มีลักษณะทาง electrophysiology เข้าได้กับภาวะ demyelination^(15,16)

การศึกษาวิจัยเมื่อเร็ว ๆ นี้ ได้มีการรายงานการศึกษาโรคพิษสุนัขบ้าในระยะเริ่มแรกของโรค โดย MRI ร่วมกับการวัดปริมาณไวรัส (viral load) และ cytokine ชนิดต่าง ๆ⁽¹⁷⁾ เป็นที่น่าสนใจว่า สมอของสุนัขที่มีอาการแบบคัมคั่ง มีปริมาณไวรัสสูงกว่า กลุ่มอาการอ่อนแรง ในทางตรงกันข้าม สมอของสุนัขที่มีอาการแบบอ่อนแรง มี cytokine สูงกว่า ผลการศึกษาดังกล่าว จึงแตกต่างจากที่พบในการศึกษาในคน ที่ได้รายงานก่อนหน้านี้ เหตุที่ทำให้ผลการศึกษาแตกต่างกัน อาจเกิดมาจากการศึกษาโรคในระยะเวลาของการเป็นโรคที่แตกต่างกันในการศึกษาในสุนัขที่เป็นโรคจะถูกทำให้เสียชีวิตทันทีหลังจากที่ได้ทำการตรวจด้วยเครื่องสแกนแม่เหล็กไฟฟ้า(MRI) ในขณะที่การศึกษาในคนไม่สามารถทำเช่นนั้นได้ จึงเป็นไปได้ว่าการกระจายตัวของไวรัสและการอักเสบ มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มอาการคัมคั่งและอ่อนแรง ในระยะเริ่มแรกจริง ๆ ของโรค และในระยะท้ายของโรค ความแตกต่างนั้นหมดไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population) คือ สุนัขที่ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาติ
2. ประชากรตัวอย่าง (Population to be sample) คือ Brain และ Spinal cord จากสุนัขบ้าที่ตรวจพบแอนติเจนของไวรัสพิษสุนัขบ้า ชนิดอาการคลุ้มคลั่ง (Furious) และชนิดอ่อนแรง (Paralytic) ในระยะแรกของโรค (Early stage)
3. ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample size) ขนาดตัวอย่างศึกษาในสุนัข 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน (Two independent group) โดยศึกษาการแพร่กระจายของแอนติเจนของเชื้อพิษสุนัขบ้า เปรียบเทียบใน 2 ชนิดอาการ ได้แก่ ชนิดคลุ้มคลั่ง(furious) และชนิดอ่อนแรง (paralytic) ซึ่งจากการรายการการศึกษาการทำ Pilot Survey กำหนดให้

n_1 = ขนาดตัวอย่างชนิดคลุ้มคลั่ง(furious)

n_2 = ขนาดตัวอย่างชนิดอ่อนแรง(paralytic)

\bar{X}_1 = ค่าเฉลี่ยของแอนติเจนที่พบในชนิดคลุ้มคลั่ง(furious)

\bar{X}_2 = ค่าเฉลี่ยของแอนติเจนที่พบในชนิดอ่อนแรง(paralytic)

S_1 = SD ของตัวอย่างชนิดคลุ้มคลั่ง(furious)

S_2 = SD ของตัวอย่างชนิดชนิดอ่อนแรง(paralytic)

σ^2 = ค่าแปรปรวนของประชากร

Z = ค่าปกติมาตรฐานที่ได้จากตารางการแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน
ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% = 1.96

พบว่า

n ₁	= 4	\bar{X}_1	= 26.5	S ₁	= 6.69
n ₂	= 4	\bar{X}_2	= 20	S ₂	= 0.71

$$\text{สูตร } n/\text{group} = 2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \frac{\sigma^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

$$\sigma^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า} &= \frac{(4-1)^2 (6.69)^2 + (4-1)(0.71)^2}{4+4-2} \\ &= \frac{3(44.76) + 3(1.51)}{6} \\ &= 23.13 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่าจากสูตร } n/\text{group} &= 2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \frac{\sigma^2}{(X_1 - X_2)^2} \\ &= \frac{2(1.96 + 1.28)^2 (23.13)}{(26.5 - 20)^2} \\ &= 11.49 \end{aligned}$$

ดังนั้นจะต้องศึกษาในสุนัขแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 12 ตัว

4. Sample Collection (การเก็บตัวอย่าง)

เก็บตัวอย่างจากสุนัขที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้าตามธรรมชาติซึ่งได้รับการวินิจฉัยและนำมาแยกเอาตัวอย่างเนื้อเยื่อ Brain และ Spinal cord โดยสัตวแพทย์

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

- 1.1 Freezer -20°C
- 1.2 Hot air oven
- 1.3 Image analyzer
- 1.4 Incubator 37°C
- 1.5 Light microscope
- 1.6 Microtome
- 1.7 Microwave
- 1.8 Multi-block heater
- 1.9 Nikon Eclipse TE2000 microscope
- 1.10 Refrigerator
- 1.11 Rotary microtome
- 1.12 Software MATLAB
- 1.13 Vortex mixer

2. วัสดุอุปกรณ์

- 2.1 Automatic adjustable micropipette: 0.5-10 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l
- 2.2 Multi-block
- 2.3 Calculator
- 2.4 Coplin staining jar
- 2.5 DAKO Pen
- 2.6 Digital timer
- 2.7 Disposable gloves
- 2.8 Forceps
- 2.9 Glass slide
- 2.10 Ground edge slide
- 2.11 Microscope glass cover slip
- 2.12 Microcentrifuge tube: 1.5 ml.
- 2.13 Parafilm
- 2.14 Paraffin block
- 2.15 Permanent marker
- 2.16 Pipette Tip: 10 μ l, 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l
- 2.17 Sanitary tissue paper
- 2.18 Slide superfrost plus

2.19 Staining jar

2.20 Slide rack

2.21 Test tube rack

2.22 Timer

3. สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

3.1 Absolute ethanol

3.2 70% Alcohol

3.3 90% Acetone

3.4 Citrate buffer pH 6

3.5 DAKO diluents

3.6 Distilled Water (DW)

3.7 Detection ultra view™ universal DAB detection kit

3.8 Eosin solution

3.9 95% Ethanol

3.10 Hematoxyline solution

3.11 3% H₂O₂

3.12 Lithium

3.13 Mounting media

3.14 10% Neutral buffer formaline

- 3.15 3% Normal Horse serum
- 3.16 Phosphate Buffer Saline (PBS)
- 3.17 Primary antibody : anti-rabies monoclonal globulin
- 3.18 Secondary antibody DAKO EnVision
- 3.19 TBE buffer
- 3.20 Xylene solution

การเก็บรวบรวมข้อมูล

เมื่อสุนัขบ้าเสียชีวิตลงด้วยโรคพิษสุนัขบ้าที่ติดเชื้อตามธรรมชาติแล้ว และได้รับการวินิจฉัยแยกชนิดจากอาการทางคลินิกโดยสัตวแพทย์แล้ว นำตัวอย่างสมองและไขสันหลังส่วนคอ จำนวน 10 ตัว แบ่งเป็นชนิดคลุ้มคลั่งและอ่อนแรงอย่างละ 5 ตัว หลังจากผ่านการแช่ในน้ำยา 10% formalin ทำการตัดแยกส่วนต่าง ๆ ของสมองออกเป็น 12 ตำแหน่งต่อไปนี้คือ 1.) Frontal cortex, 2.) Parietal cortex, 3.) Temporal cortex, 4.) Occipital cortex, 5.) Hippocampus, 6.) Caudate, 7.) Thalamus, 8.) Cerebellum, 9.) Midbrain, 10.) Pons, 11.) Medulla และ 12.) Cervical cord

สมองและไขสันหลังส่วนต่างๆ จะถูกนำมาตรวจสอบและเก็บรวบรวมข้อมูลด้วย 3 วิธีดังนี้

1. ปริมาณแอนติเจนของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า, รูปแบบการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ทั้ง 2 ชนิดอาการจะถูกเก็บรวบรวมข้อมูลด้วยวิธี Indirect Immunohistochemistry
2. ข้อมูลเชิงปริมาณของเชื้อพิษสุนัขบ้า ได้แก่ จำนวนเชื้อแอนติเจนของทั้ง 2 อาการ, เปอร์เซ็นต์พื้นที่ของแอนติเจนทั้งภายในและภายนอกเซลล์ จะถูกเก็บรวบรวมด้วยวิธี Image analysis
3. การประเมินลักษณะการตอบสนองการอักเสบของทั้ง 2 ชนิดอาการ และทำการ score ระดับความรุนแรงของการอักเสบถูกเก็บข้อมูลด้วยวิธีการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. Detection of Rabies antigen ด้วยเทคนิค Immunohistochemical technique

1.1 ขั้นตอนการเตรียมสไลด์ (Slide Preparation)

เนื้อเยื่อที่ได้ นำเข้าสู่กระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อและฝังใน paraffin หลังจากนั้น ทำการตัดเป็นแผ่นบางหนาประมาณ 3 ไมครอน หลังจากได้ตัวอย่างเนื้อเยื่อ brain และ spinal cord จากสุนัข บ้าที่ติดเชื้อตามธรรมชาติแล้วนำมา fixed ด้วย 10% neutral buffer formalin จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ tissue processing และ embedded specimen จนกระทั่งได้ block เนื้อเยื่อ นำมาตัด tissue section หนาประมาณ 2-3 ไมครอน ลอยในอ่างน้ำอุณหภูมิ ประมาณ 43 องศาเซลเซียส ตัด section ลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยสาร superfrost plus นำไปอบที่ 60 °C ใน Hot air oven 10 นาที จากนั้น deparaffinized ด้วย Xylene และ rehydrate ด้วยน้ำกลั่น

1.2 ขั้นตอนเทคนิค Immunohistochemical (IHC)

เมื่อได้สไลด์ที่ผ่านการ deparaffinized แล้ว นำมาทำ antigen retrieval ด้วยเทคนิค microwave method โดยใช้ citrate buffer pH 6 เป็น target retrieval solution จากนั้นนำเข้า microwave และทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาทีแล้ว block endogenous peroxidase ด้วย 3% H₂O₂ 5 นาทีแล้วล้าง phosphate buffer saline (PBS) 5 นาที จากนั้นหยด 3% normal horse serum ลงไปเพื่อ block nonspecific background แล้วหยด primary antibody หรือ rabbit anti-rabies virus (anti-rabies nucleocapsid polyclonal antibody จาก Bio-Rad Marnes-la-Coquette ประเทศฝรั่งเศส ที่ความเข้มข้น 1: 100) จากนั้นหยด secondary antibody หรือ visualization reagent ลงไปทำปฏิกิริยากันและเพื่อให้เกิดสีของปฏิกิริยานี้ หยด DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) ซึ่งเป็น substrate ลงไปแล้วนำสไลด์ไปย้อมสี counter stain ด้วย hematoxylin solution จะได้สไลด์ที่สามารถนำไปตรวจหาแอนติเจนของเชื้อพิษสุนัขบ้า ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

2. Image analysis

ถ่ายภาพสมองและไขสันหลังส่วนต่าง ๆ จากสไลด์ที่ย้อมด้วยเทคนิค Immunohistochemical (IHC) ข้างต้น ในแต่ละส่วนของสมองและไขสันหลัง เลือกภาพจากบริเวณที่มีแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้ามากที่สุด ถ่ายภาพบริเวณนั้นด้วยกำลังขยาย 400 เท่า โดยดูให้ทั่วสไลด์ทุก fields (พื้นที่ 0.71-1.41 ตารางมิลลิเมตร) ต่อ 1 section ของสมอง ทำการถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิทัลรุ่น Nikon ECLIPSE 80i (Nikon Instech Co., Ltd., Japan) และบันทึกไฟล์ภาพขนาด 2560x3200 jpg. จากนั้นนำไปคำนวณหาร้อยละของเซลล์ประสาทที่มีแอนติเจน, ปริมาณแอนติเจนที่มีอยู่ภายในเซลล์ และนอกตัวเซลล์ประสาท โดยใช้โปรแกรม MATLAB R2007a ในการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ได้รับการพัฒนาโปรแกรมจากภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

ยกเว้นในส่วนของสมองบริเวณ Dentate fascia ของ hippocampus ใช้วิธีการถ่ายภาพเช่นเดียวกับข้างต้น แต่นำมาเข้าโปรแกรม Adobe Photoshop ด้วยวิธี manual ก่อนเพื่อทำการเลือกบริเวณที่ต้องการวิเคราะห์หาแอนติเจนและเซลล์ neuron แล้วจึงนำไป run ในโปรแกรม MATLAB R2007a เพื่อใช้คำนวณหาร้อยละของพื้นที่เซลล์และแอนติเจนอีกครั้งหนึ่ง และนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาเปรียบเทียบความแตกต่างกันของทั้ง 2 ชนิดอาการโดยอาศัยหลักการทางสถิติ

3. Semi-quantitative assessment of inflammatory response

ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้จากขบวนการ tissue processing และฝังใน paraffin นำตัดเป็นแผ่นบางหนาประมาณ 3 ไมครอน นำมาย้อมสี Hematoxylin และ Eosin ให้ระดับความรุนแรงของการอักเสบในสมองส่วนต่าง ๆ จากน้อยไปมาก โดย 0 คือ การไม่พบลักษณะของการอักเสบ และ 1+ จนถึง 3+ ตามลำดับ

4. Statistic analysis

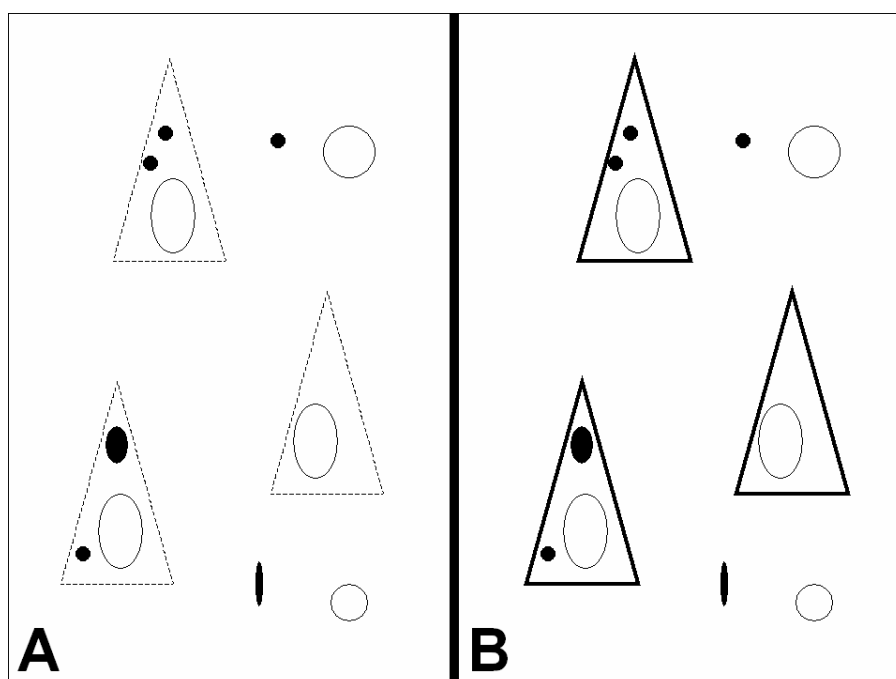
นำเอาข้อมูลดิบที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีข้างต้น นำมาทดสอบว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ระหว่างสุนัขบ้าทั้ง 2 ชนิดอาการ ด้วยหลักการทางสถิติและใช้วิธีการทดสอบ Man-whitney U test (asymptotic significance, 1 tailed) จากโปรแกรม SPSS software version 18.0 (IBM corporation, Somer, USA). ซึ่งค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ $p \text{ value} < 0.05$

การวิเคราะห์ข้อมูล

จากผลการวิจัยทำให้ได้ข้อมูล 2 แบบ โดยจะนำมาวิเคราะห์ ดังนี้

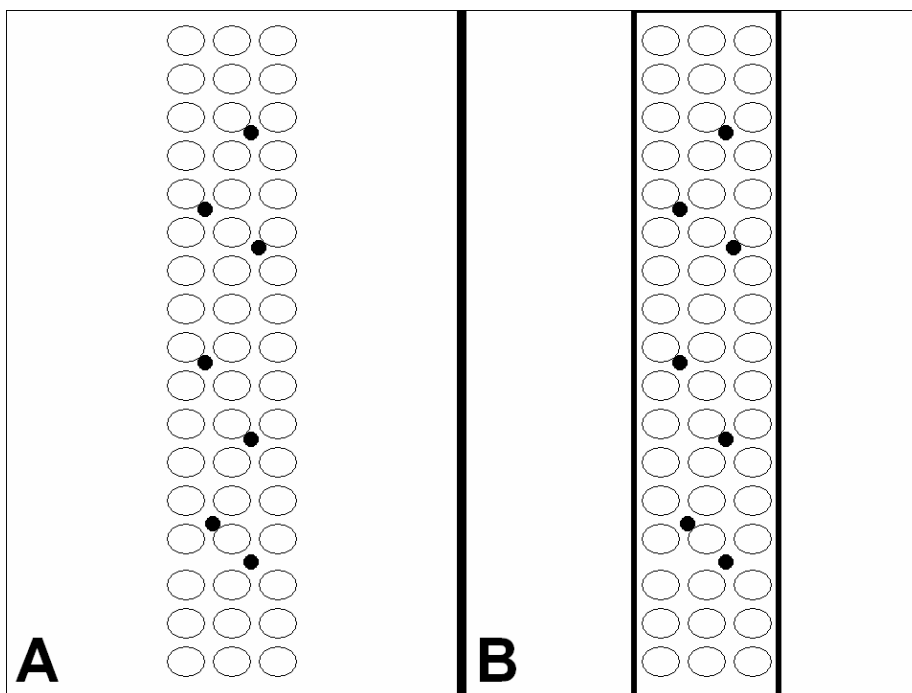
1. วิเคราะห์จากภาพถ่ายที่ได้จากการย้อมแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี

Immunohistochemical (IHC) นำมาตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี Image analysis โดยอาศัยโปรแกรม MATLAB R2007a นำมาวิเคราะห์ดังนี้



รูปที่ 2. ลักษณะการวิเคราะห์หาแอนติเจนของเชื้อพิษสุนัขบ้าเชิงปริมาณ (Quantitative rabies antigen analysis for all regions except hippocampal dentate fascia)

ลักษณะสามเหลี่ยม : ได้แก่จำนวนเซลล์ neuron ภายใน 2 neurons ประกอบด้วย เซลล์แอนติเจนที่มีลักษณะเป็นวงกลมสีดำบรรจุอยู่ภายในเรียกเซลล์นี้ว่า Positive neuron และ 1 เซลล์ neuron ที่ไม่มีแอนติเจนภายใน เรียกว่า Negative neuron ส่วนแอนติเจนที่เป็นจุดสีดำภายนอกเซลล์ เรียกว่า antigen outside cell ดังแสดงในภาพ A. เมื่อนำเข้าสู่โปรแกรม MATLAB R 2007a แล้วโปรแกรมจะสามารถนับจำนวนแอนติเจนทั้งภายในและภายนอกเซลล์ดังแสดงในภาพ B. ได้แก่จำนวนแอนติเจนทั้งหมด 6 จุด แอนติเจนภายใน positive neuron นับจำนวนได้ 4 จุด และ antigen outside cell จำนวน 2 จุด หรือ dot ของแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้า และมี Negative neuron จำนวน 1 เซลล์



รูปที่ 3. แสดงการวิเคราะห์เชิงปริมาณในการตรวจหาเชื้อพิษสุนัขบ้าในบริเวณระบบประสาทส่วน hippocampus (Quantitative rabies antigen analysis for hippocampal dentate fascia)

ภาพ A. วงกลมสีขาว แทนลักษณะ granular neurons ของ dentate fascia และจุดสีดำ ได้แก่ แอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าเมื่อนำไปผ่านกระบวนการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์แล้วจะแสดงดังในภาพ B. สามารถนำไปวิเคราะห์คำนวณหาพื้นที่แอนติเจน ต่อ พื้นที่ dentate ทั้งหมดได้

2. สไลด์ที่ได้จากการย้อมสี hematoxylin and eosin แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ลักษณะการตอบสนองการอักเสบภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการให้ระดับความรุนแรงของการอักเสบจากน้อยไปมากตามลำดับจาก 1+ ถึง 3+ ด้วยเกณฑ์การวินิจฉัยต่อไปนี้

- 0 คือ ไม่พบการอักเสบ (no inflammatory)
- 1+ คือ เริ่มพบ microglia และ/หรือ lymphocyte (mild inflammation : mild microglial activation without formation of microglia nodule and/or mild perivascular lymphatic cuffing)
- 2+ คือ พบ microglia และ/หรือ lymphocyte รอบหลอดเลือดเล็กน้อย (moderate inflammation : microglial activation with formation of microglial nodule and moderate lymphocytic perivascular cuffing)
- 3+ คือ พบ microglial nodule และ microglia กระจายตัวทั่วไป และ lymphocyte รอบหลอดเลือดจำนวนมาก (marked inflammation : microglial activation with formation of microglial nodule with extension of microglial aggregates outside)

นำมาวิเคราะห์ลักษณะการตอบสนองการอักเสบโดยเปรียบเทียบจากทั้ง 2 ชนิดอาการ ในแต่ละส่วนของสมองและไขสันหลัง

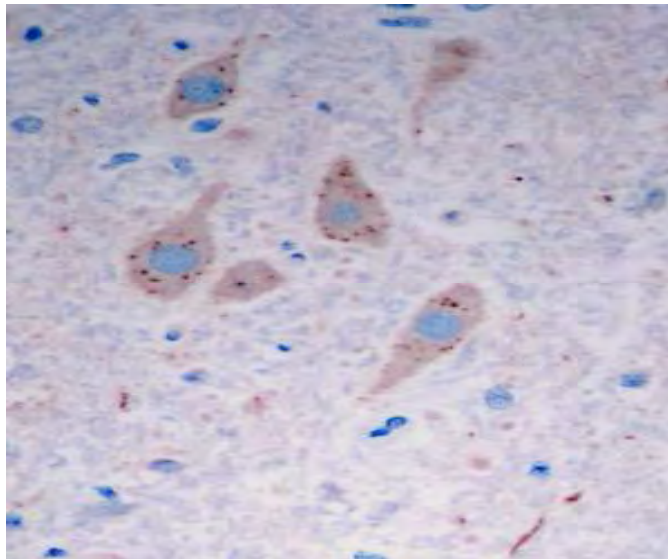
3. นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณวิเคราะห์หาปริมาณแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าโดยเปรียบเทียบจากทั้ง 2 ชนิดอาการ และศึกษารูปแบบการแพร่กระจายของเชื้อพิษสุนัขบ้าในชนิดกลุ่มคลังและอ่อนแรง โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลจากหลักการทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

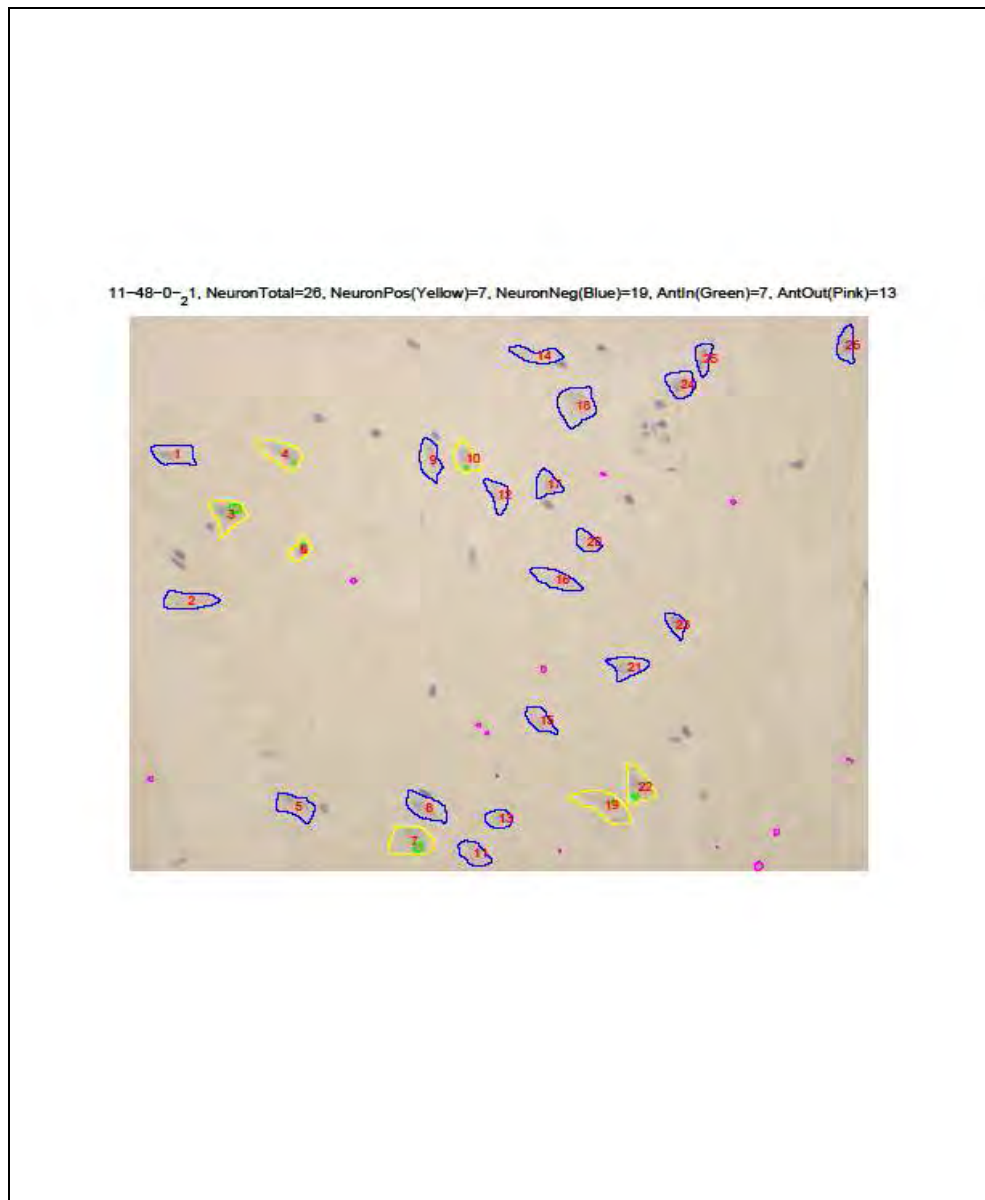
ผลการวิเคราะห์

1. ลักษณะการกระจายของเชื้อแอนติเจนในสุนัขบ้าทั้งชนิดคลุ้มคลั่ง Furious rabies หรือ Encephalitic rabies (อาการแบบคลุ้มคลั่ง) และอ่อนแรง (Dumb หรือ Paralytic rabies (อาการแบบอัมพาต หรืออาการอ่อนแรง)



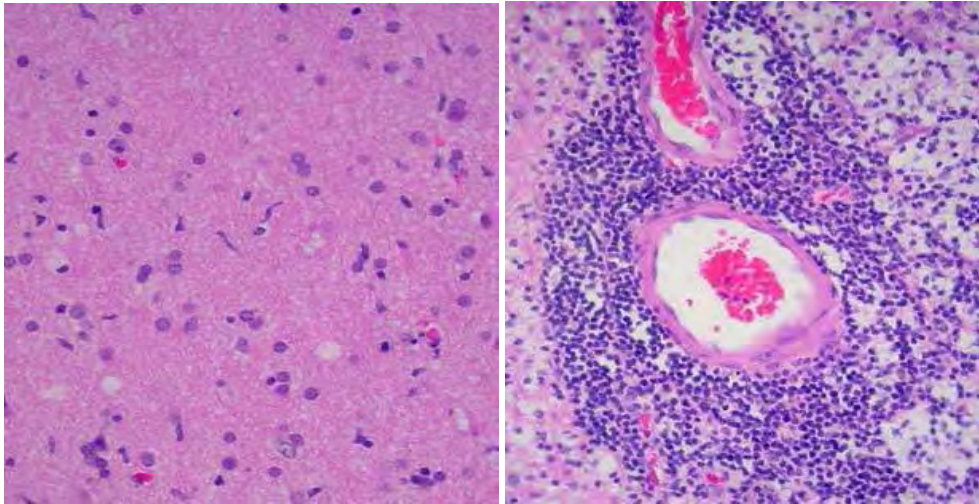
รูปที่4. แสดงผลจากการย้อมแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี Immunohistochemical (IHC) จากกล้องจุลทรรศน์ ขนาดขยาย 400 เท่า

2. การวิเคราะห์ผลจากภาพถ่ายที่ได้จากการย้อมแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าด้วยวิธี
Immunohistochemical (IHC) เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี Image
analysis โดยใช้โปรแกรม MATLAB R2007a



รูปที่ 5. แสดงผลการวิเคราะห์หาเชื้อพิษสุนัขบ้าเชิงปริมาณ ด้วยเทคนิค Image analysis โดยใช้โปรแกรม MATLAB R2007a

3. ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้จากขบวนการ tissue processing และ นำมาย้อมสี Hematoxylin และ Eosin



รูปที่6. แสดงผลการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin จากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายขนาด 400 เท่า

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลจากสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดอ่อนแรง

Pattern of rabies antigen

1. Rabies antigen-positive neurons

ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้พบว่าในบริเวณ cerebral neocortices ของสมองสุนัขบ้ามีปริมาณ positive neurons ของชนิดคลุ้มคลั่งมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดอ่อนแรงด้วยสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในบริเวณ frontal และ occipital lobe ($p=0.038$, $p=0.029$ ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 3 และเมื่อนำข้อมูลดิบที่ได้ (ตารางที่ 1 และ 2) มาหาค่าเฉลี่ย ซึ่งดูได้จากตารางภาคผนวก ข. พบว่าในบริเวณ frontal มีปริมาณเปอร์เซ็นต์ rabies antigen-positive neurons (ชนิดคลุ้มคลั่ง 38.2%, ชนิดอ่อนแรง 13.6%) และ บริเวณ occipital lobe (ชนิดคลุ้มคลั่งมี 37.2%, ชนิดอ่อนแรงมี 8.4%) สำหรับบริเวณ Parietal และ temporal lobe ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้บริเวณไขสันหลัง(spinal cord) ของสุนัขบ้าพบว่ามีปริมาณเปอร์เซ็นต์ rabies antigen-positive neurons ในชนิดคลุ้มคลั่งจำนวนมากกว่าชนิดอ่อนแรงซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญได้แก่ C-cord (ชนิดคลุ้มคลั่ง 97.3%, ชนิดอ่อนแรง 84.3% $p=0.025$) L-cord (ชนิดคลุ้มคลั่ง 98.4%, ชนิดอ่อนแรง 79.23% $p=0.025$) และ S-cord (ชนิดคลุ้มคลั่ง 97.1%, ชนิดอ่อนแรง 60.13% $p=0.025$) ยกเว้นส่วน T-cord ของ spinal cord ที่มีปริมาณ rabies antigen-positive neurons จำนวนมากแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับบริเวณ thalamus, hippocampal cornu ammonis และ cerebellum ที่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อนำมาเปรียบเทียบจากทั้ง 2 ชนิดอาการ

2. Rabies antigen dot per positive neuron

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าจำนวนจุดของ antigen ต่อ positive neuron ทั้งหมดในส่วนต่างๆของสมอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกันทั้ง 2 ชนิด ยกเว้นในบริเวณ spinal cord ส่วน (C-cord) พบว่ามีจำนวน dot ของ antigen ต่อ positive neuron มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.025$) ดังแสดงในตารางที่ 3

3. Rabies antigen area per positive neuron and hippocampal dentate fascia

ผลจากการวิเคราะห์พบว่าค่าเฉลี่ยพื้นที่แอนติเจน ต่อ พื้นที่ positive neuron มีปริมาณมาก ในหลายๆส่วนของสมองสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งมากกว่าชนิดอ่อนแรง ที่มีความแตกต่างกันอย่าง นัยสำคัญ ได้แก่บริเวณ occipital (ชนิดคลุ้มคลั่ง 3.8% ชนิดอ่อนแรง 1.44%, $p = 0.038$) hippocampal cornu ammonis (ชนิดคลุ้มคลั่ง 3.57% ชนิดอ่อนแรง 1.55%, $p = 0.023$) caudate (ชนิดคลุ้มคลั่ง 2.566 ชนิดอ่อนแรง 1.3%, $p = 0.038$) midbrain (ชนิดคลุ้มคลั่ง 9.384% ชนิดอ่อนแรง 3.42%, $p = 0.014$) medulla (ชนิดคลุ้มคลั่ง 7.495% ชนิดอ่อนแรง 3.066%, $p = 0.043$) และ thalamus (ชนิดคลุ้มคลั่ง 2.76 ชนิดอ่อนแรง 1.34%, $p = 0.025$) และ ในบริเวณที่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ neocortex, cerebellum, brainstem และ spinal cord ยกเว้นบริเวณ cervical cord ($p=0.025$) ดังแสดงในตารางที่ 3 สำหรับพื้นที่ rabies antigen ต่อ positive neuron ที่บริเวณ hippocampal dentate fascia พบว่ามีความ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งมีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับชนิดอ่อนแรง (ชนิดคลุ้มคลั่ง 0.43 ชนิดอ่อนแรง 0.01%, $p = 0.0423$)

4. Percentage of antigen area outside neuronal cell body

ผลจากการวิเคราะห์พบว่าพื้นที่ antigen ภายนอกเซลล์มีปริมาณมากในชนิดคลุ้มคลั่ง มากกว่าชนิดอ่อนแรงที่พบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญพบได้หลายส่วนของสมอง ได้แก่ บริเวณ frontal (ชนิดคลุ้มคลั่ง 1.626% ชนิดอ่อนแรง 0.2478% $p = 0.023$) temporal (ชนิดคลุ้ม คลั่ง 1.93 % ชนิดอ่อนแรง 0.4324% $p = 0.038$) occipital (ชนิดคลุ้มคลั่ง 1.96% ชนิดอ่อนแรง 0.2042% $p = 0.024$) hippocampal cornu ammonis (ชนิดคลุ้มคลั่ง 2.29 % ชนิดอ่อนแรง 0.4944% $p = 0.024$) midbrain (ชนิดคลุ้มคลั่ง 6.158% ชนิดอ่อนแรง 0.6938% $p = 0.008$) pons (ชนิดคลุ้มคลั่ง 3.196% ชนิดอ่อนแรง 0.472%, $p = 0.014$) medulla (ชนิดคลุ้มคลั่ง 5.9% ชนิด อ่อนแรง 0.8312%, $p = 0.025$) upper cervical cord (C-cord)(ชนิดคลุ้มคลั่ง 4.643 % ชนิด อ่อนแรง 1.3783% $p = 0.025$) และบริเวณ T-cord (ชนิดคลุ้มคลั่ง 3.0267% ชนิดอ่อนแรง 1.013% , $P = 0.025$) สำหรับบริเวณอื่นๆในสมองนอกจากนี้การตรวจวิเคราะห์ไม่พบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งบริเวณ lower levels ของ spinal cord

Pattern of inflammation

ผลการวิเคราะห์การตอบสนองต่อการอักเสบในส่วนต่างๆของสมองและไขสันหลังของสุนัขพบว่ามึ่ระดับความรุนแรงของการอักเสบในชนิดอ่อนแรงมากกว่าชนิดอาการคั่งคั่งเมื่อเปรียบเทียบทั้ง 2 ชนิด และพบมากในบริเวณ brainstem ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ midbrain ($p = 0.0022$) pons ($p=0.0069$) และ Medulla ($p=0.01$) นอกจากนี้พบว่า การอักเสบจะลดระดับความรุนแรงลง เมื่อเข้าสู่บริเวณไขสันหลัง (spinal cord)

ผลการเปรียบเทียบ

Paralytic Rabies

	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
40048	Frontal		0						1
40048	Parietal		0						1
40048	Occipital		0						1
40048	Temporal		0						1
40048	Hippo (CA)		0						1
40048	Caudate		0						1
40048	Thalamus		0						1
40048	Cerebellum		0						0
40048	Midbrain		0						4
40048	Pons		0						4
40048	Medulla		0						4
40048-3D	Hippo (Dentate)				0	0.00	0		
40048-S01	Spinal cord	51	36	71	141	3.92	0.83	0.46	4
40048-S02	Spinal cord	46	21	46	42	2.00	1.93	0.81	3
40048-S03	Spinal cord	42	32	76	253	7.91	5.95	3.36	3
40048-S04	Spinal cord	54	28	52	312	11.14	7.13	2.28	3
40048-S05	Spinal cord	37	7	19	21	3.00	2.04	0.6	2
40048-S06	Spinal cord	44	23	52	200	8.70	3.07	1.25	2
40048-S07	Spinal cord	28	14	50	276	19.71	3.3	1.48	1
40048-S08	Spinal cord	32	22	69	276	12.55	9.68	1.25	1
40048-S09	Spinal cord	48	30	63	373	12.43	6.05	1.33	1
40048-S10	Spinal cord	47	36	77	909	25.25	12.78	4.41	1

	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
R148-48sp-01	Spinal cord	39	39	100	94.33	2.42	10.05	0.91	
R148-48sp-02	Spinal cord	29	28	97	77.75	2.78	2.83	0.20	
R148-48sp-03	Spinal cord	26	22	85	66.38	3.02	1.81	0.26	
R148-48sp-04	Spinal cord	40	38	95	108.33	2.85	5.18	0.37	
R148-48sp-05	Spinal cord	57	53	93	96.44	1.82	7.60	0.58	
R148-48sp-06	Spinal cord	38	30	79	79.33	2.64	12.48	1.51	
R148-48sp-07	Spinal cord	85	50	59	46.50	0.93	2.55	0.08	
R148-48sp-08	Spinal cord	44	27	61	16.75	0.62	0.94	0.44	
R148-48sp-09	Spinal cord	59	32	54	13.67	0.43	0.82	0.52	
R148-48sp-10	Spinal cord	54	22	41	69.92	3.18	0.95	0.04	
	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
R148-48-01	Frontal	315	7	2	8	1.14	0.72	0.03	1
R148-48-04	Parietal	196	11	6	15	1.36	1.46	0.02	1
R148-48-05	Occipital	277	1	0	1	1.00	0.05	0.06	1
R148-48-02	Temporal	166	2	1	2	1.00	0.45	0.01	1
R148-48-03	Hippo (CA)	66	0	0	0	0.00	0	0.01	1
R148-48-12	Caudate	271	15	6	16	1.07	1.3	0.03	1
R148-48-10	Thalamus	108	32	30	54	1.69	0.77	0.38	1
R148-48-09	Cerebellum	44	31	70	66	2.13	2.12	0.45	2
R148-48-06	Midbrain	72	47	65	145	3.09	1.69	0	4
R148-48-07	Pons	175	138	79	481	3.49	4	0.12	3
R148-48-08	Medulla	50	34	68	174	5.12	4.13	0.25	4
R148-48-3D	Hippo (Dentate)				0	0	0		
	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
457-48-01	Frontal	372	74	20	119	1.61	1.9	0.039	1
457-48-04	Parietal	481	253	53	468	1.85	3.35	0.075	1
457-48-05	Occipital	258	4	2	5	1.25	1.44	0.001	1
457-48-02	Temporal	312	45	14	90	2.00	4.29	0.022	1
457-48-03	Hippo (CA)	307	74	24	128	1.73	2.05	0.022	1
457-48-12	Caudate	230	10	4	14	1.40	0.4	0.001	1

	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
457-48-06	Midbrain	48	37	77	100	2.70	2.86	0.129	4
457-48-07	Pons	20	5	25	13	2.60	0.83	0.02	4
457-48-08	Medulla	22	12	55	34	2.83	1.84	0.076	4
457-48-3D	Hippo (Dentate)				0	0.00	0		
	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
153-50-01	Frontal	479	89	19	148	1.66	1.92	0.41	1
153-50-04	Parietal	346	200	58	418	2.09	4.61	2.01	1
153-50-05	Occipital	555	141	25	235	1.67	3.55	0.93	1
153-50-02	Temporal	251	112	45	168	1.50	3.14	0.99	1
153-50-03	Hippo (CA)	261	188	72	480	2.55	2.16	1.82	1
153-50-12	Caudate	259	48	19	72	1.50	2.15	0.28	1
153-50-10	Thalamus	206	142	69	345	2.43	1.66	0.25	1
153-50-09	Cerebellum	59	43	72	112	2.60	2.26	0.04	1
153-50-06	Midbrain	132	111	84	448	4.04	4.11	0.67	3
153-50-07	Pons	132	105	80	889	8.47	6.47	0.78	3
153-50-08	Medulla	137	106	77	479	4.52	3.28	0.81	3
153-50-3D	Hippo (Dentate)				15	0.88	0.01		
153-50-S01	Spinal cord	46	42	91	370	8.81	5.38	2.46	3
153-50-S02	Spinal cord	59	57	97	460	8.07	5.01	1.81	2
153-50-S03	Spinal cord	47	46	98	421	9.15	6.99	1.15	2
153-50-S04	Spinal cord	72	66	92	693	10.50	3.53	1.24	2
153-50-S05	Spinal cord	76	74	97	626	8.46	7.6	4.52	2
	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
153-50-S09	Spinal cord	10	8	80	31	3.88	2.32	0.06	1
153-50-S10	Spinal cord	32	22	69	89	4.05	1.09	0.12	1
153-50-S11	Spinal cord	49	24	49	131	5.46	1.57	0.38	1

	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
211-01	Frontal	286	78	27	136	1.74	2.29	0.76	2
211-04	Parietal	378	133	35	416	3.13	5.3	2.79	0
211-05	Occipital	352	53	15	108	2.04	2.16	0.03	0
211-02	Temporal	193	110	57	317	2.88	5.15	1.14	2
211-03	Hippo (CA)	82	75	91	289	3.85	3.55	0.62	1
211-12	Caudate	279	180	65	344	1.91	2.65	1.15	1
211-10	Thalamus	138	71	51	153	2.15	2.53	0.68	2
211-09	Cerebellum	64	44	69	143	3.25	2.53	1.01	1
211-06	Midbrain	89	88	99	1088	12.36	8.44	2.67	3
211-07	Pons	191	172	90	1038	6.03	5.7	1.44	3
211-08	Medulla	42	41	98	455	11.10	6.08	3.02	3
211-12-3D	Hippo (Dentate)				76	9.50	0.042		

ตารางที่ 1. แสดงผลการวิเคราะห์หาแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าเชิงปริมาณและการให้ระดับความรุนแรงการอักเสบของระบบประสาทในสุนัขบ้าชนิดอ่อนแรง

Furious Rabies

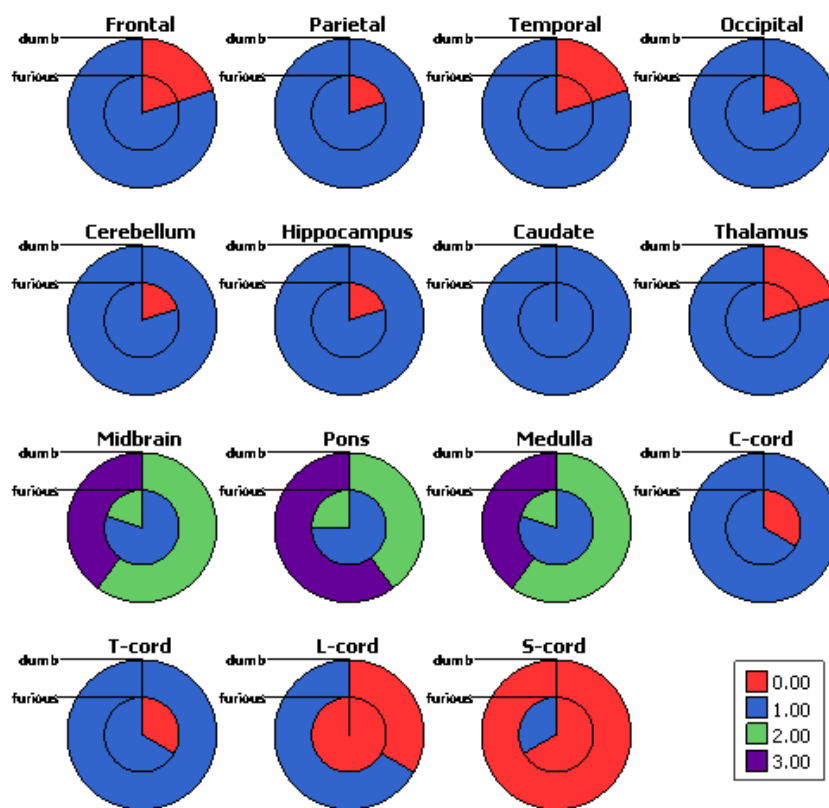
	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
212-01	Frontal	385	69	18	99	1.43	1.83	0.17	1
212-04	Parietal	326	37	11	53	1.43	2.04	0.03	1
212-05	Occipital	302	17	6	21	1.24	2.57	0.04	1
212-02	Temporal	472	108	23	128	1.19	2.32	0.51	1
212-03	Hippo (CA)	381	213	56	353	1.66	2.78	0.97	1
212-12	Caudate	269	73	27	109	1.49	3.29	0.15	1
212-10	Thalamus	125	19	15	27	1.42	1.82	0.02	1
212-09	Cerebellum	44	22	50	30	1.36	2.97	0.03	0
212-06	Midbrain	102	78	76	314	4.03	11.22	4.29	1
212-07	Pons	58	24	41	61	2.54	3.05	0.97	1
212-08	Medulla	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
212-3D	Hippo (Dentate)				0	0	0		
	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
392-48-01	Frontal	510	238	47	353	1.48	4.38	1.28	1
392-48-04	Parietal	663	251	38	360	1.43	3.29	0.8	1
392-48-05	Occipital	453	68	15	78	1.15	1.52	0.15	1
392-48-02	Temporal	399	127	32	170	1.34	6.01	1.76	1
392-48-03	Hippo (CA)	390	141	36	227	1.61	2.52	0.87	1
392-48-12	Caudate	395	174	44	233	1.34	2.37	0.38	1
392-48-10	Thalamus	405	333	82	1229	3.69	3.68	1.63	1
392-48-09	Cerebellum	106	64	60	97	1.52	1.904	0.54	1
392-48-06	Midbrain	182	167	92	634	3.80	13.54	6.25	2
392-48-07	Pons	251	192	76	593	3.09	8.29	2.03	3
392-48-08	Medulla	99	82	83	700	8.54	8.78	1.95	3
392-48-3D	Hippo (Dentate)				50	3.846	0.023		
392-48-S01	Spinal cord	49	49	100	554	11.31	18.01	6.03	2
392-48-S02	Spinal cord	32	32	100	352	11.00	10.67	2.31	2

392-48-S05	Spinal cord Region	47 Total Neu	47 Positive Neu	100 % positive Neu	902 Total Ag dots in Neu	19.19 Aver Ag dots in positive Neu	12.61 Average Ag area in positive Neu	6.02 % Ag area outside cells	2 Inflam Score (0-4)
392-48-S06	Spinal cord	74	74	100	527	7.12	11.07	2.55	2
392-48-S07	Spinal cord	59	59	100	524	8.88	8.41	2.68	1
392-48-S08	Spinal cord	52	52	100	597	11.48	11.21	3.44	1
392-48-S09	Spinal cord	54	52	96	440	8.46	4.76	1.36	1
392-48-S10	Spinal cord	49	43	88	643	14.95	8.89	3.14	1
392-48-S11	Spinal cord	48	48	100	852	17.75	7.05	4.84	1
392-48-S12	Spinal cord	38	38	100	993	26	10.05	5.38	1
	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
228-01	Frontal	841	194	23	329	1.70	1.6	0.66	0
228-04	Parietal	672	210	31	311	1.48	1.82	2.38	0
228-05	Occipital	846	427	50	706	1.65	2.98	2.65	0
228-02	Temporal	930	42	5	44	1.05	2.04	0.47	0
228-03	Hippo (CA)	526	356	68	955	2.68	3.27	5.51	0
228-12	Caudate	613	213	35	420	1.97	2.18	2.71	0
228-10	Thalamus	378	171	45	415	2.43	2.47	1.77	1
228-09	Cerebellum	66	44	66	105	2.39	0.77	2.21	1
228-06	Midbrain	238	168	71	1199	7.14	6.03	12.01	1
228-07	Pons	474	341	72	1156	3.39	9.06	9.3	1
228-08	Medulla	380	276	73	1615	5.85	8.46	12.09	1
228-12-3D	Hippo (Dentate)				212	26.00	0.516		
	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
1148-01	Frontal	332	131	39	166	1.27	4.1	1.17	2
1148-04	Parietal	470	237	50	373	1.57	4.88	2.07	2
1148-05	Occipital	425	205	48	293	1.43	6.24	3.16	1
1148-02	Temporal	316	118	37	149	1.26	6.66	2.02	2
1148-03	Hippo (CA)	155	88	57	169	1.92	4.07	1.63	1
1148-09	Cerebellum	25	21	84	42	2.00	7.54	0.52	1

	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
1148-06	Midbrain	131	71	54	189	2.66	4.37	0.74	1
1148-07	Pons	423	120	28	155	1.29	3.48	0.91	1
1148-08	Medulla	112	97	87	366	3.77	3.24	2.3	1
1148-3D	Hippo (Dentate)				120	40	0.8		
1148-S01	Spinal cord	60	56	93	633	11.30	4.49	3.79	1
1148-S02	Spinal cord	45	42	93	416	9.90	11.35	6.68	1
1148-S03	Spinal cord	39	39	100	590	15.13	12.17	6.14	1
1148-S04	Spinal cord	28	28	100	484	17.29	16.1	6.39	1
1148-S05	Spinal cord	32	27	84	413	15.30	3.79	1.33	1
1148-S06	Spinal cord	41	40	98	549	13.73	6.35	3.22	2
1148-S07	Spinal cord	52	52	100	903	17.37	12.29	3.83	1
1148-S08	Spinal cord	40	40	100	636	15.90	8.09	5.19	1
1148-S09	Spinal cord	39	39	100	657	16.85	13.15	7.38	1
1148-S10	Spinal cord	67	66	99	766	11.61	13.6	7.68	1
1148-S11	Spinal cord	45	43	96	452	10.51	8.09	3.81	1
	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Average Ag area in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
443-49-01	Frontal	507	322	64	718	2.23	5	4.85	2
443-49-04	Parietal	638	439	69	1053	2.40	4.69	3.96	1
443-49-05	Occipital	615	410	67	786	1.92	5.7	3.8	1
443-49-02	Temporal	589	366	62	673	1.84	5.82	4.89	1
443-49-03	Hippo (CA)	287	247	86	865	3.50	5.23	2.48	1
443-49-12	Caudate	92	58	63	125	2.16	2.43	0.45	2
443-49-10	Thalamus	145	119	82	282	2.37	3.08	0.67	1
443-49-09	Cerebellum	69	55	80	133	2.42	1.65	0.49	1
443-49-06	Midbrain	145	124	86	429	3.46	11.76	7.5	1
443-49-07	Pons	225	208	92	957	4.60	6.43	2.77	2
443-49-08	Medulla	166	154	93	912	5.92	9.5	7.26	1
443-49-3D	Hippo (Dentate)				208	41.6	0.83	0	
443-49-S03	Spinal cord	49	46	94	347	7.54	4.61	1.68	1

	Region	Total Neu	Positive Neu	% positive Neu	Total Ag dots in Neu	Aver Ag dots in positive Neu	Aver Ag dots in positive Neu	% Ag area outside cells	Inflam Score (0-4)
443-49-S04	Spinal cord	71	67	94	570	8.51	3.02	1.89	2
443-49-S05	Spinal cord	74	71	96	407	5.73	3.96	1.62	2
443-49-S06	Spinal cord	41	39	95	274	7.03	3.38	1.42	2
443-49-S07	Spinal cord	52	52	100	519	9.98	4.99	1.89	1
443-49-S08	Spinal cord	70	69	99	830	12.03	7.36	3.33	2
443-49-S09	Spinal cord	98	91	93	809	8.89	6.22	3.71	1
443-49-S10	Spinal cord	58	57	98	541	9.49	4.03	2.42	2
443-49-S11	Spinal cord	79	78	99	525	6.73	5.76	3.06	2
443-49-S12	Spinal cord	40	39	98	211	5.41	5.68	1.23	1

ตารางที่ 2. แสดงผลการวิเคราะห์หาแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าเชิงปริมาณและการให้ระดับความรุนแรงการอักเสบของระบบประสาทในสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่ง



Pies show counts

รูปที่ 7. แสดงการวิเคราะห์เปรียบเทียบการให้ระดับความรุนแรงของการอักเสบ ในสมองและไขสันหลังของสุนัขบ้าชนิดอาการคลุ้มคลั่งและอ่อนแรง

กำหนดให้

สีแดง หมายถึง การให้ระดับความรุนแรงของการอักเสบ 0 (เมื่อไม่พบการอักเสบ)

สีน้ำเงิน หมายถึง การให้ระดับความรุนแรงของการอักเสบ 1+

สีเขียว หมายถึง การให้ระดับความรุนแรงของการอักเสบ 2+

สีม่วง หมายถึง การให้ระดับความรุนแรงของการอักเสบ 3+

จากผลการวิเคราะห์ พบการอักเสบเกิดรุนแรงที่ก้านสมองของสุนัขบ้าชนิดอ่อนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับสุนัขบ้าแบบคลุ้มคลั่ง ส่วนการอักเสบในสมองใหญ่ พบเพียงเล็กน้อยในทั้ง 2 กลุ่มอาการ และพบว่า มีระดับความรุนแรงของการอักเสบลดลงหรือไม่พบการอักเสบในบริเวณไขสันหลัง

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติ

Locations	% RVA-positive neurons (Mean ± SD)			Number of RVA spots per positive neuron (Mean ± SD)			% RVA-positive areas per positive neuron (Mean ± SD)			% RVA areas outside cell body (Mean ± SD)		
	Dumb Rabies	Furious Rabies	P	Dumb Rabies	Furious Rabies	P	Dumb Rabies	Furious Rabies	P	Dumb Rabies	Furious Rabies	P
Frontal lobe	13.6 ± 11.93	38.2 ± 18.59	<u>0.038</u>	1.23 ± 0.73	1.62 ± 0.37	0.300	1.37 ± 0.96	3.38 ± 1.56	0.087	0.25 ± 0.33	1.63 ± 1.96	<u>0.023</u>
Parietal lobe	30.4 ± 26.52	39.8 ± 21.6	0.301	1.68 ± 1.14	1.56 ± 0.42	0.458	2.94 ± 2.2	3.34 ± 1.43	0.377	0.98 ± 1.33	1.85 ± 1.52	0.125
Temporal lobe	23.4 ± 26.14	31.8 ± 20.82	0.239	1.48 ± 1.08	1.34 ± 0.3	0.377	2.61 ± 2.29	4.57 ± 2.21	0.087	0.43 ± 0.58	1.93 ± 1.79	<u>0.038</u>
Occipital lobe	8.4 ± 11.18	37.2 ± 25.56	<u>0.028</u>	1.18 ± 0.78	1.48 ± 0.31	0.377	1.44 ± 1.49	3.8 ± 2.06	<u>0.038</u>	0.2 ± 0.41	1.95 ± 1.75	<u>0.024</u>
Hippocampus	37.4 ± 41.97	60.6 ± 18.29	0.232	1.63 ± 1.67	2.27 ± 0.81	0.300	1.55 ± 1.53	3.57 ± 1.09	<u>0.023</u>	0.49 ± 0.79	2.29 ± 1.91	<u>0.024</u>
Caudate	18.8 ± 26.79	39.8 ± 14.48	0.068	1.18 ± 0.72	1.55 ± 0.39	0.174	1.3 ± 1.12	2.57 ± 0.43	<u>0.038</u>	0.29 ± 0.49	0.82 ± 1.06	0.058
Thalamus	32.4 ± 28.08	56 ± 32.42	0.109	1.59 ± 0.94	2.48 ± 0.93	0.134	1.34 ± 0.97	2.75 ± 0.79	<u>0.025</u>	0.25 ± 0.28	1.02 ± 0.83	0.071
Cerebellum	50.9 ± 30.78	69 ± 14.07	0.232	2.05 ± 1.22	1.94 ± 0.49	0.232	1.87 ± 1.05	2.97 ± 2.67	0.458	0.3 ± 0.44	0.75 ± 0.84	0.087
Midbrain	65 ± 38.36	75.8 ± 14.7	0.458	4.44 ± 4.68	4.22 ± 1.71	0.377	3.42 ± 3.19	9.38 ± 3.96	<u>0.014</u>	0.69 ± 1.14	6.16 ± 4.15	<u>0.008</u>
Pons	54.8 ± 39.85	61.8 ± 26.42	0.458	4.12 ± 3.25	2.98 ± 1.21	0.232	3.4 ± 2.88	6.06 ± 2.73	0.125	0.47 ± 0.63	3.19 ± 3.49	<u>0.014</u>
Medulla	59.5 ± 35.91	84 ± 8.41	0.110	4.71 ± 4.08	5.02 ± 1.95	0.163	3.07 ± 2.3	7.49 ± 2.87	<u>0.043</u>	0.83 ± 1.25	5.9 ± 4.79	<u>0.025</u>
Cervical cord	84.33 ± 17.6	97.37 ± 2.47	<u>0.025</u>	5.28 ± 2.83	10.87 ± 1.01	<u>0.025</u>	4.5 ± 1.5	9.84 ± 3.65	<u>0.025</u>	1.39 ± 0.85	4.54 ± 0.75	<u>0.025</u>
Thoracic cord	77.08 ± 29.6	96.4 ± 3.17	0.138	7.18 ± 4.29	11.57 ± 4.31	0.138	5.48 ± 0.97	7.46 ± 3.57	0.256	1.01 ± 0.48	3.03 ± 1.2	<u>0.025</u>
Lumbar cord	79.23 ± 17.72	98.4 ± 1.83	<u>0.025</u>	8.25 ± 7.09	12.07 ± 4.04	0.138	6.47 ± 0.65	8.56 ± 2.51	0.063	1.89 ± 1.09	3.54 ± 1.59	0.063
Sacral cord	60.13 ± 8.98	97.1 ± 1.51	<u>0.025</u>	8.25 ± 9.53	12.9 ± 5.85	0.138	4.02 ± 4.92	8.34 ± 3.2	0.138	1.13 ± 1.512	4.31 ± 1.5	0.063

ตารางที่ 3 แสดงการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีทดสอบ Man-Whitney test ในสมองส่วนต่างๆและใช้สันหลังของสุนัขบ้า 2 ชนิดโดยการ

หมายเหตุ: * คือเส้นนี้ชี้ หมายถึง ตัวเลขที่แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Significant) กำหนดให้ RVA คือ Rabies viral antigen และ SD คือ standard deviation

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

โรคพิษสุนัขบ้าทั้งที่พบในคน และสัตว์ เช่นสุนัขและแมว มีลักษณะอาการ 2 แบบ ได้แก่ แบบคลุ้มคลั่งและแบบอ่อนแรง⁽³⁻⁷⁾ ซึ่งพยาธิกำเนิดของลักษณะอาการ 2 แบบนี้ ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเกิดจากสาเหตุใด^(4,10) เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าที่เข้าสู่ร่างกายคนที่ได้รับเชื้อมีลักษณะการตอบสนองที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของไวรัส ทำให้ผู้ติดเชื้อแสดงลักษณะอาการทางคลินิกที่แตกต่างกัน สมมุติฐานนี้ถูกสนับสนุนด้วยการศึกษาวิจัยลักษณะของไวรัสพิษสุนัขบ้าเพื่อหาความแตกต่างกันของ gene ชนิด glycoprotein(G), nucleotide และ phosphoprotein gene ที่สกัดจากสมองของผู้ป่วยที่เป็นโรคและสุนัขที่ติดเชื้อพิษสุนัขบ้า ชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดอ่อนแรง แต่ไม่พบลักษณะจำเพาะของทั้ง 2 ชนิดที่แตกต่างกัน และไม่สามารถอธิบายอาการทางคลินิกที่แตกต่างกันนี้ได้⁽¹³⁾

จากการศึกษาการกระจายของเชื้อพิษสุนัขบ้าในส่วนต่าง ๆ ของสมองสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งจำนวน 10 ตัว เมื่อไม่นานมานี้ พบการกระจายตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในลักษณะที่คล้ายคลึงกันทั้งหมดในทุกตัวที่ทำการทดสอบโดยพบการกระจายของเชื้อมากในบริเวณก้านสมองแอนติเจนของไวรัสพิษสุนัขบ้าเป็นจำนวนมากที่ก้านสมอง (brain stem) เมื่อเปรียบเทียบกับสมองใหญ่⁽¹⁸⁾ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาดังกล่าว สอดคล้องกับข้อมูลที่พบในสมองสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งที่ได้จากการศึกษาปัจจุบัน^(14,17) อย่างไรก็ตามการศึกษาข้างต้นได้ทำการทดสอบเฉพาะในสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบได้อย่างชัดเจนจากทั้ง 2 ชนิดอาการ การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในสมองของสุนัขบ้าทั้ง 2 ชนิดอาการและไขสันหลัง โดยอาศัยเทคนิคการย้อมหาเชื้อแอนติเจนด้วยวิธี immunohistochemistry technique (IHC) และนำเอาเทคนิคที่ได้จากการประยุกต์โปรแกรม image analysis มาตรวจหาเชื้อในเชิงปริมาณโดยสามารถตรวจหา ปริมาณเชื้อแอนติเจนพิษสุนัขบ้า(rabies antigen-positive neurons), ปริมาณจำนวนจุดแอนติเจน(rabies antigen dot per positive neurons), พื้นที่แอนติเจนคิดเป็นร้อยละต่อพื้นที่ positive neuron(rabies antigen area per positive neuron) รวมทั้งพื้นที่ส่วน hippocampal dentate fascia และร้อยละของแอนติเจนพิษสุนัขบ้าภายนอกเซลล์ neuron ในส่วนต่างๆของสมองและไขสันหลังได้ นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบหาความแตกต่างกันของสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดอ่อนแรง ดังเห็นได้จากการทดสอบทางสถิติที่พบว่า

มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในคนติดเชื้อพิษสุนัขบ้าที่ผ่านมา⁽¹³⁾ อาจเป็นไปได้ว่าการศึกษาในคนเป็นการศึกษาในระยะท้ายของโรคและมีการดำเนินโรคจนกระทั่งเชื้อแอนติเจนพิษสุนัขบ้ามีการแพร่กระจายไปทั่วส่วนต่างๆของสมองและไขสันหลัง ทำให้การทดสอบไม่พบว่ามีความแตกต่างกัน จากการศึกษาในครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 2 ชนิดอาการในส่วนต่างๆของสมองและไขสันหลังจะเห็นได้ว่าเซลล์ประสาทที่ติดเชื้อในสมองใหญ่ มีปริมาณมากกว่าในสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่ง และพบมากในบริเวณ frontal lobe (ชนิดคลุ้มคลั่ง 38.2% ชนิดอ่อนแรง 13.6%, p=0.038) และ occipital lobe (ชนิดคลุ้มคลั่ง 37.2% ชนิดอ่อนแรง 8.4%, p=0.030) (ตารางภาคผนวก ฉ.) และในไขสันหลังพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญใน 3 ส่วนของไขสันหลังได้แก่ Cervical cord (ชนิดคลุ้มคลั่ง 97.3% ชนิดอ่อนแรง 84.326%, p=0.025), Lumbar cord (ชนิดคลุ้มคลั่ง 98.4% ชนิดอ่อนแรง 79.23%, p=0.025) และ Sacral cord (ชนิดคลุ้มคลั่ง 97.1% ชนิดอ่อนแรง 60.13%, p=0.025) ในบริเวณอื่นๆของสมองใหญ่ที่มีปริมาณของเชื้อแอนติเจนไวรัสพิษสุนัขบ้าจำนวนมากแต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ parietal lobe, thalamus และ cerebellum สุนัขบ้าชนิดอ่อนแรงพบเชื้อพิษสุนัขบ้าได้มากที่ก้านสมองเช่นกัน แต่ลักษณะเด่นของสุนัขบ้าชนิดอ่อนแรง คือ การอักเสบรุนแรงที่ก้านสมองในสุนัขบ้าชนิดอ่อนแรง การทดสอบใน region 40048 (ตารางที่ 1) ตรวจไม่พบแอนติเจนของไวรัสพิษสุนัขบ้าเลยทั้งในสมองและก้านสมอง แต่พบเชื้อระดับ 3+ ที่ไขสันหลังระดับคอ ร่วมกับการอักเสบที่รุนแรงในก้านสมอง จึงเป็นไปได้ว่า การอักเสบที่ก้านสมองนี้ อาจทำหน้าที่เสมือนเป็นกำแพงที่กั้นไม่ให้เชื้อไวรัสวิ่งเข้าสู่สมองได้โดยสะดวก ในสมองใหญ่ของสุนัขบ้าชนิดอ่อนแรง จึงมีแนวโน้มที่จะพบเชื้อไวรัสได้น้อยกว่าในสมองสุนัขบ้าแบบคลุ้มคลั่ง การศึกษาการอักเสบก่อนหน้านี้พบว่า สมองของสุนัขที่มีอาการแบบอ่อนแรง มี cytokine สูงกว่า⁽¹⁷⁾ อาจเป็นไปได้ว่าการหลั่ง cytokine ออกมาเพื่อเป็นการป้องกันการตายหรือการสลายของเซลล์ (apoptosis) หากพบว่าการสลายของเซลล์เกิดขึ้น (apoptosis) ใน leukocytes ของสุนัขบ้าชนิดอ่อนแรง จะไปช่วยให้มีการแพร่กระจายของเชื้อเข้าสู่สมองมากขึ้น⁽¹⁸⁾ อย่างไรก็ตามยังมีข้อมูลจากการศึกษาก่อนนี้⁽¹⁷⁾ พบว่า มีปริมาณ cytokine mRNA มากในสุนัขบ้าชนิดอ่อนแรงแต่พบว่ามี leukocyte dysfunction จากข้อมูลที่ไม่สอดคล้องกันนี้ สันนิษฐานได้ว่าอาจเป็นเพราะรูปแบบของการตายหรือการสลายของเซลล์ (apoptosis) นั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละเซลล์ของการอักเสบที่เกิดขึ้นระหว่างชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดอ่อนแรง

อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้มีข้อจำกัดของการศึกษาในแง่ของจำนวน sample size ที่คำนวณได้ว่าต้องให้จำนวนตัวอย่างสุนัขบ้าชนิดละ 11 ตัว แต่จากการศึกษาที่ระยะเวลาจำกัดและการแยกแยะชนิดของสุนัขบ้าเพื่อนำมาเป็นตัวตัวอย่างในระยะแรกของโรคทำได้ยากและมีจำนวน

ตัวอย่างน้อยจึงไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ตามที่คำนวณ ถึงแม้ว่าจำนวนตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษาจะมีไม่มาก แต่การศึกษาจากสมองและไขสันหลังของสุนัขบ้าในระยะแรกของโรค ในครั้งนี้ก็พบว่าในทั้ง 2 ชนิดอาการของสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งและอ่อนแรง มีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นับเป็นข้อดีของการนำเอาตัวอย่างในระยะแรกของโรคมาศึกษาซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อไปในอนาคตที่อาจจะนำไปศึกษาเพิ่มเติมทั้งทางด้านการหาปริมาณ viral load เพื่อวินิจฉัยยืนยันได้ว่าการศึกษานี้ในบริเวณที่พบปริมาณแอนติเจนอยู่เป็นจำนวนมาก มีปริมาณ viral load แตกต่างกันด้วยหรือไม่ในทั้ง 2 ชนิดอาการ หรืออาจนำไป ศึกษาหาความแตกต่างกันของทั้ง 2 ชนิดของสุนัขบ้าทางด้าน gene และ host ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การแพร่กระจายของแอนติเจนไวรัสพิษสุนัขบ้าและการอักเสบ มีความแตกต่างกันในสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งและชนิดอ่อนแรงในระยะแรกของโรค การอักเสบรุนแรงที่ก้านสมองของสุนัขบ้าชนิดอ่อนแรงอาจช่วยชะลอไม่ให้เชื้อไวรัสเข้าสู่สมองได้สะดวก การอักเสบที่ต่างกันนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า หรือความแตกต่างในการตอบสนองของสัตว์ที่เป็นโรค ซึ่งจะต้องพิสูจน์กันต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

- (1.) Hemachudha, T., Wacharapluesadee, S., Laothamatas, J., and Wilde, H. Rabies. Curr Neurol Neurosci Rep 6,6 (November 2006) : 460-468.
- (2.) WHO Expert Consultation on rabies. World Health Organ Tech Rep Ser 931 (May 2005):1-88.
- (3.) Knobel, DL.et al. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and asia. Bull World Health Organ 83,5 (May 2005) : 360-368.
- (4.) Chuxnum, T., and Choomkasien, P. Epidemiology of human rabies in Thailand, B.E.2546-2550 (2003-2007 AD). Tren Res Sci Technol 2,1 (October 2010) : 71-75.
- (5.) Hemachudha, T., Laothamatas, J., and Rupprecht, CE. Human rabies: A disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. Lancet Neurol 1,2 (June 2002) : 101-109.
- (6.) Laothamatas, J., Hemachudha, T., Mitrabhakdi, E., Wannakrairot, P., and Tulayadachanont S. MR imaging in human rabies. Am J Neuroradiol 24, 6 (June-July 2003) : 1102-1109.
- (7.) Hemachudha, T. Rabies. In: Vinken P, Briyn GW, Klawans HL (eds). Handbook of Clinical Neurology, Revised Series. Amsterdam: Elsevier Science Publishers (1989) : 383-404.
- (8.) Jackson, AC., and Wunner, WH. Rabies. United state of America (2002); 1-493.
- (9.) Wunner, WH. Rabies virus. In: Jackson AC, Wunner WH, eds. Rabies. New York

: Academic Press (2002) : 23-77.

- (10.) Hemachudha, T. Rabies. In: Roos K. Central Nervous System Infectious Disease and Therapy. New York: Marcel Dekker. 1997: 573-600.
- (11.) Sheikh, KA., Ramos- Alvares, M., Jackson, AC., Li, CY., Asbury, Ak., and Griffin, JW. Overlap of pathology in paralytic rabies and axonal Guillain-Barré syndrome. Ann Neurol 57,5 (2005 April) : 768-72.
- (12.) Hemachudha, T., Phanthumchinda, K., Phanuphak, P., and Manutsathit, S. Myoedema as a clinical sign in paralytic rabies. Lancet 1,8543 (May 1987) :1210.
- (13.) Hemachudha, T. et al. Sequence analysis of rabies virus in humans exhibiting encephalitis or paralytic rabies. J Infect Dis 188,7(october 2003) : 960-966.
- (14.) Tirawatnpong, S., Hemachudha, T., Manutsathit, S., Shuangshoti, S., Phanthumchida, K., and Phanuphak, P. Regional distribution of rabies viral antigen in central nervous system of human encephalitic and paralytic rabies. J Neurol Sci 92,1(1989 August) : 91-9.
- (15.) Mitrabhakdi, E., et al. Difference in neuropathogenetic mechanisms in human furious and paralytic rabies. J Neurol Sci 238,1-2 (october 2005) : 3-10.
- (16.) Hemachudha, T., Wacharapluesadee, S., Mitrabhakdi, E., Wilde, H., Morimoto, K., and Lewis, RA. Pathophysiology of human paralytic rabies. J Neurovirol 11,1 (February 2005) : 93-100.
- (17.) Laothamatas J, et al. Furious and Paralytic rabies of canine origin: Neuroimaging with virological and cytokine studies. J Neurovirol 14,2 (August 2008) : 119-129.

- (18.) Suja, M., Mahadevan, A., Madhusudhana, S., Vijayasarithi, S., and Shankar, K. Neuroanatomical mapping of rabies nucleocapsid viral antigen distribution and apoptosis in pathogenesis in street dog rabies - an immunohistochemical study. Clin Neuropath 28,2 (February 2009) : 113-124.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
ขั้นตอนการเตรียมสไลด์ (Slide Preparation)

- 1.1 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อ brain และ spinal cord จากสุนัขป่าที่ติดเชื้อตามธรรมชาติมา fixed ด้วย 10% neutral buffer formalin
- 1.2 จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการ tissue processing และ embedded specimen จนกระทั่งได้ block เนื้อเยื่อ
- 1.3 นำ block เนื้อเยื่อมาตัด tissue section จาก paraffin block ด้วย เครื่อง Microtome ให้มีความหนา 2-3 microns ลอยในอ่างน้ำอุณหภูมิ ประมาณ 43 องศาเซลเซียสตัด section ลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยสาร superfrost plus
- 1.4 นำไปอบที่ 60 °C 10 นาที ใน Hot air oven
- 1.5 จากนั้น deparaffinized ด้วย Xylene 3 นาที 3 ครั้ง
- 1.6 rehydrate slide ด้วย Absolute Ethanol, 95% ethanol และ น้ำกลั่น

ภาคผนวก ข.

ขั้นตอนเทคนิค Immunohistochemical (IHC)

1. นำสไลด์ที่ผ่านการ deparaffinized มาทำ antigen retrieval ด้วยเทคนิค microwave method
2. Epitope retrieval โดยใช้ citrate buffer pH 6 เป็น target retrieval solution
3. นำเข้า microwave และทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
4. นำไป block endogenous peroxidase ด้วย 3% H₂O₂ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
5. ล้างน้ำประปา 5 นาที
6. ล้าง phosphate buffer saline(PBS) 5 นาที
7. หยดด้วย 3% normal horse serum ลงไปเพื่อ block nonspecific background
8. Incubate 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
9. Drain excess 3% Normal horse serum
10. หยด primary antibody หรือ anti-rabies monoclonal globulin (Fujirebio Diagnostics, Inc Malvern, ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ความเข้มข้น 1: 100) ลงไป
11. Incubate 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
12. ล้าง phosphate buffer saline(PBS) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
13. จากนั้นหยด secondary antibody หรือ visualization reagent ลงไปทำปฏิกิริยากันและเพื่อให้เกิดสีของปฏิกิริยานี้
14. Incubate 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
15. ล้าง phosphate buffer saline(PBS) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
16. หยด DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride) ซึ่งเป็น substrate ลงไป
17. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
18. ล้างด้วยน้ำประปา
19. นำสไลด์ไปย้อมสี counter stain ด้วย Hematoxylin solution
20. Mount slide ด้วย Mounting media
21. นำสไลด์ที่ได้ไปตรวจหาแอนติเจนของเชื้อพิษสุนัขบ้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ค.

การย้อมสี Hematoxylin–eosin (H&E)

1. ละลาย paraffin ในสไลด์เนื้อเยื่อ โดยอบสไลด์ที่อุณหภูมิ 60°C อย่างน้อย 30 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน xylene 3 ครั้ง นาน 5 นาที 2 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
2. Rehydration โดยแช่ใน ethanol ตั้งแต่ความเข้มข้นสูงลงมาต่ำ เรียงจาก
 - 2.1 100% ethanol 3 ครั้ง นาน 5 นาที 2 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
 - 2.2 95% ethanol 3 ครั้ง นาน 5 นาที 2 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
3. ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำไหลผ่านนาน 5 นาที
4. จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในสี Mayer's hematoxylin นาน 5-7 นาที
5. ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำไหลผ่านนานอย่างน้อย 15 นาที
6. จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อในสี eosin นาน ½-1 นาที
7. Dehydration โดยแช่สไลด์เนื้อเยื่อใน ethanol ดังนี้
 - 7.1 95% ethanol 3 ครั้ง นาน 5 นาที 2 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
 - 7.2 100% ethanol 3 ครั้ง นาน 5 นาที 2 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
8. กำจัด ethanol โดยแช่ใน xylene 3 ครั้ง นาน 5 นาที 2 นาที และ 2 นาที ตามลำดับ
9. ปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วย coverslip โดยหยดน้ำยา mounting medium ประมาณ 1-2 หยด

ภาคผนวก ง.
การเตรียมสารละลาย

1. วิธีการเตรียม Citrate Buffer pH 6

ส่วนผสม	ปริมาณ
Citric acid monohydrate(mw 210.14)	2.1 ml
Distilled Water (DW)	900 ml
2 M NaOH (40 g NaOH+500 ml DW)	13.0 ml
Distilled Water (DW)	87.0 ml
Total	1000 ml

2. วิธีการเตรียม Phosphate Buffered Saline (PBS) ที่ความเข้มข้น 30X

ส่วนผสม	ปริมาณ
NaCl	526 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	82.8 g
5NaOH	~120 ml (40 g NaOH/200 ml)
DW maker จนกระทั่งได้ปริมาณ	2000 ml

3. วิธีการเตรียม Working Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4

ส่วนผสม	ปริมาณ
30X PBS	70 ml
Distilled Water (DW)	2030 ml

4. วิธีการเตรียม 3% normal horse serum

ส่วนผสม	ปริมาณ
Working PBS pH7.4	100 ml
Normal Horse Serum	3 ml

5. วิธีการเตรียม Tris-HCl buffer, pH 7.4

เตรียม Stock A : 2.42 g Trizma base ใน Distilled Water (DW) 100 ml

เตรียม Stock B : 1.7 ml ใน Distilled Water (DW) 100 ml

ส่วนผสม	ปริมาณ
Stock A	2.5 ml
Stock B	2.07 ml

เติมน้ำ Distilled Water (DW) จนกระทั่งได้สารละลาย 10 ml

6. วิธีการเตรียม DAB (3,3 - diaminobenzidine tetrahydrochloride, anhydrous)

ส่วนผสม	ปริมาณ
ละลาย DAB (sigma D-5637)	50 mg/ml ใน Distilled Water (DW)
Aliquoute ใส่ microtube	microtube ละ 100 μ l (หรือ 5 ml)

Store below 0°C

7. วิธีการเตรียม Working DAB Tris-HCl buffer, pH 7.4

ส่วนผสม	ปริมาณ
DAB	1 microtube
Tris-HCl buffer	10 ml
30% H ₂ O ₂	10 µl

ภาคผนวก จ.

การเตรียมสารละลายขั้นตอนการย้อม Hematoxylin and Eosin

น้ำยาสำหรับย้อมสี Hematoxylin–eosin

Mayer's hematoxylin solution

Hematoxylin crystal	1.00	g
Distilled water (D.W.)	1000.00	ml
Sodium iodate	0.20	g
Ammonium or potassium alum	50.00	g
Citric acid	1.00	g
Chloral hydrate	50.00	g

Eosin solution

1% Stock alcoholic eosin solution

Eosin Y water soluble	1.00	g
D.W.	20.00	ml
ละลายให้เข้ากันแล้วเติม		
95% ethanol	80.00	ml

Working eosin solution

1% Eosin stock solution	1	part
80% Ethanol	3	part

ก่อนนำไปใช้ให้เติม 0.5 ml ของ glacial acetic acid ลงในทุกๆ 100 ml ของ working eosin solution และเขย่าให้เข้ากัน

ภาคผนวก จ.

แสดงข้อมูลที่น่ามาคำนวณหาค่าเฉลี่ยใน Parameter ต่างๆ
ของแต่ละส่วนของสมองและไขสันหลังของสุนัขบ้าเปรียบเทียบทั้ง 2 ชนิดอาการ

Dumb		40048	R148-48	457-48	153-50	211-01	Mean
Furious		212-01	228-01	392-48	1148-01	443-49	
Dumb Frontal	% positive neurons	0	2	20	19	27	13.6
Furious Frontal	% positive neurons	18	23	47	39	64	38.2
	Avg Ag dot/positive neuron	0	1.14	1.61	1.66	1.74	1.23
	Avg Ag dot/positive neuron	1.43	1.7	1.48	1.27	2.23	1.622
	Avg % Ag area/positive neuron	0	0.72	1.9	1.92	2.29	1.366
	Avg % Ag area/positive neuron	1.83	1.6	4.38	4.1	5	3.382
	% area Ag outside cells	0	0.03	0.039	0.41	0.76	0.2478
	% area Ag outside cells	0.17	0.66	1.28	1.17	4.85	1.626
	Inflammation	1	1	1	1	1	1
	Inflammation	1	0	1	1	1	0.8
Dumb Parietal	% positive neurons	0	6	53	58	35	30.4
Furious Parietal	% positive neurons	11	31	38	50	69	39.8
	Avg Ag dot/positive neuron	0	1.36	1.85	2.09	3.13	1.686
	Avg Ag dot/positive neuron	1.43	1.48	1.43	1.57	2.4	1.662
	Avg % Ag area/positive neuron	0	1.46	3.35	4.61	5.3	2.944
	Avg % Ag area/positive neuron	2.04	1.82	3.29	4.88	4.69	3.344
	% area Ag outside cells	0	0.02	0.075	2.01	2.79	0.979
	% area Ag outside cells	0.03	2.38	0.8	2.07	3.96	1.848

Dumb		40048	R148-48	457-48	153-50	211-01	Mean
Furious		212-01	228-01	392-48	1148-01	443-49	
	Inflammation	1	1	1	1	0	0.8
	Inflammation	1	0	1	1	1	0.8
Dumb Temporal	% positive neurons	0	1	14	45	57	23.4
Furious Temporal	% positive neurons	23	5	32	37	62	31.8
	Avg Ag dot/positive neuron	0	1	2	1.5	2.88	1.476
	Avg Ag dot/positive neuron	1.19	1.05	1.34	1.26	1.84	1.336
	Avg % Ag area/positive neuron	0	0.45	4.29	3.14	5.15	2.606
	Avg % Ag area/positive neuron	2.32	2.04	6.01	6.66	5.82	4.57
	% area Ag outside cells	0	0.01	0.022	0.99	1.14	0.4324
	% area Ag outside cells	0.51	0.47	1.76	2.02	4.89	1.93
	Inflammation	1	1	1	1	1	1
	Inflammation	1	0	1	1	1	0.8
Dumb Occipital	% positive neurons	0	0	2	25	15	8.4
Furious Occipital	% positive neurons	6	50	15	48	67	37.2
	Avg Ag dot/positive neuron	0	1	1.25	1.67	2.04	1.192
	Avg Ag dot/positive neuron	1.24	1.65	1.15	1.43	1.92	1.478
	Avg % Ag area/positive neuron	0	0.05	1.44	3.55	2.16	1.44
	Avg % Ag area/positive neuron	2.57	2.98	1.52	6.24	5.7	3.802
	% area Ag outside cells	0	0.06	0.001	0.93	0.03	0.2042
	% area Ag outside cells	0.04	2.65	0.15	3.16	3.8	1.96
	Inflammation	1	1	1	1	0	0.8
	Inflammation	1	0	1	1	1	0.8

Dumb		40048	R148-48	457-48	153-50	211-01	Mean
Furious		212-01	228-01	392-48	1148-01	443-49	
Dumb Neocortex	% positive neurons	0	2.2	26.4	33.2	31	18.56
Furious Neocortex	% positive neurons	15.5	26.9	33.8	44.8	65.4	37.28
	Avg Ag dot/positive neuron	0	1	1.99	2	2.65	1.528
	Avg Ag dot/positive neuron	1	1.7	1	1.3	2	1.4
	Avg % Ag area/positive neuron	0	1.05	3.16	3.59	4.18	2.396
	Avg % Ag area/positive neuron	2.15	2.35	3.99	5.44	5.29	3.844
	% area Ag outside cells	0	0.04	0.034	1.085	1.18	0.4678
	% area Ag outside cells	0.187	1.54	0.997	2.105	4.375	1.8408
	Inflammation	1	1	1	1	1	1
	Inflammation	1	0	1	1	1	0.8
Dumb Hippo (CA)	% positive neurons	0	0	24	72	91	37.4
Furious Hippo (CA)	% positive neurons	56	68	36	57	86	60.6
	Avg Ag dot/positive neuron	0	0	1.73	2.55	3.85	1.625
	Avg Ag dot/positive neuron	1.66	2.68	1.61	1.92	3.5	2.274
	Avg % Ag area/positive neuron	0	0	2.05	2.16	3.55	1.552
	Avg % Ag area/positive neuron	2.78	3.27	2.52	4.07	5.23	3.574
	% area Ag outside cells	0	0.01	0.022	1.82	0.62	0.4944
	% area Ag outside cells	0.97	5.51	0.87	1.63	2.48	2.292
	Inflammation	1	1	1	1	1	1
	Inflammation	1	0	1	1	1	0.8

Dumb		40048	R148-48	457-48	153-50	211-01	Mean
Furious		212-01	228-01	392-48	1148-01	443-49	
Dumb Hippo (dentate)	Ag dot	0	0	0	1	9.5	2.1
Furious Hippo (dentate)	Ag dot	0	26	3.846	40	41.6	22.2892
	% Ag area	0	0	0	0.01	0.042	0.0104
	% Ag area	0	0.516	0.023	0.8	0.83	0.4338
Dumb Caudate	% positive neurons	0	6	4	19	65	18.8
Furious Caudate	% positive neurons	27	35	44	30	63	39.8
	Avg Ag dot/positive neuron	0	1.07	1.4	1.5	1.91	1.176
	Avg Ag dot/positive neuron	1.49	1.97	1.34	1.27	2.16	1.646
	Avg % Ag area/positive neuron	0	1.3	0.4	2.15	2.65	1.3
	Avg % Ag area/positive neuron	3.29	2.18	2.37	2.56	2.43	2.566
	% area Ag outside cells	0	0.03	0.001	0.28	1.15	0.2922
	% area Ag outside cells	0.15	2.71	0.38	0.41	0.45	0.82
	Inflammation	1	1	1	1	1	1
	Inflammation	1	0	1	1	1	0.8
Dumb Thalamus	% positive neurons	0	30	12	69	51	32.4
Furious Thalamus	% positive neurons	15	45	82	NA	82	56
	Avg Ag dot/positive neuron	0	1.69	1.67	2.43	2.15	1.588
	Avg Ag dot/positive neuron	1.42	2.43	3.69	NA	2.37	2.4775
	Avg % Ag area/positive neuron	0	0.77	1.75	1.66	2.53	1.342
	Avg % Ag area/positive neuron	1.82	2.47	3.68	NA	3.08	2.7625
	% area Ag outside cells	0	0.38	0.001	0.25	0.68	0.2622

Dumb		40048	R148-48	457-48	153-50	211-01	Mean
Furious		212-01	228-01	392-48	1148-01	443-49	
	% area Ag outside cells	0.02	1.77	1.63	NA	0.67	1.0225
	Inflammation	1	1	1	1	1	1
	Inflammation	1	1	1	NA	1	1
Dumb Cerebellum	% positive neurons	0	70	43	72	69	50.8
Furious Cerebellum	% positive neurons	50	66	60	84	80	68
	Avg Ag dot/positive neuron	0	2.13	2.27	2.6	3.25	2.05
	Avg Ag dot/positive neuron	1.36	2.39	1.52	2	2.42	1.938
	Avg % Ag area/positive neuron	0	2.12	2.43	2.26	2.53	1.868
	Avg % Ag area/positive neuron	2.97	0.77	1.904	7.54	1.65	2.9668
	% area Ag outside cells	0	0.45	0.019	0.04	1.01	0.3038
	% area Ag outside cells	0.03	2.21	0.54	0.52	0.49	0.758
	Inflammation	0	1	1	1	1	0.8
	Inflammation	0	1	1	1	1	0.8
Dumb midbrain	% positive neurons	0	65	77	84	99	65
Furious midbrain	% positive neurons	76	71	92	54	86	75.8
	Avg Ag dot/positive neuron	0	3.09	2.7	4.04	12.36	4.438
	Avg Ag dot/positive neuron	4.03	7.14	3.8	2.66	3.46	4.218
	Avg % Ag area/positive neuron	0	1.69	2.86	4.11	8.44	3.42
	Avg % Ag area/positive neuron	11.22	6.03	13.54	4.37	11.76	9.384
	% area Ag outside cells	0	0	0.129	0.67	2.67	0.6938
	% area Ag outside cells	4.29	12.01	6.25	0.74	7.5	6.158

Dumb		40048	R148-48	457-48	153-50	211-01	Mean
Furious		212-01	228-01	392-48	1148-01	443-49	
	Inflammation	3	3	3	2	2	2.6
	Inflammation	1	1	1	1	1	1
Dumb pons	% positive neurons	0	79	25	80	90	54.8
Furious pons	% positive neurons	41	72	76	28	92	61.8
	Avg Ag dot/positive neuron	0	3.49	2.6	8.47	6.03	4.118
	Avg Ag dot/positive neuron	2.54	3.39	3.09	1.29	4.6	2.982
	Avg % Ag area/positive neuron	0	4	0.83	6.47	5.7	3.4
	Avg % Ag area/positive neuron	3.05	9.06	8.29	3.48	6.43	6.062
	% area Ag outside cells	0	0.12	0.02	0.78	1.44	0.472
	% area Ag outside cells	0.97	9.3	2.03	0.91	2.77	3.196
	Inflammation	3	2	3	2	2	2.4
	Inflammation	1	1	2	1	1	1.2
Dumb medulla	% positive neurons	0	68	55	77	98	59.6
Furious medulla	% positive neurons	NA	73	83	87	93	84
	Avg Ag dot/positive neuron	0	5.12	2.83	4.52	11.1	4.714
	Avg Ag dot/positive neuron	NA	5.85	8.54	3.77	5.92	6.02
	Avg % Ag area/positive neuron	0	4.13	1.84	3.28	6.08	3.066
	Avg % Ag area/positive neuron	NA	8.46	8.78	3.24	9.5	7.495
	% area Ag outside cells	0	0.25	0.076	0.81	3.02	0.8312
	% area Ag outside cells	NA	12.09	1.95	2.3	7.26	5.9
	Inflammation	3	3	3	2	2	2.6
	Inflammation	NA	1	2	1	1	1.25
Dumb Brainstem	% positive neurons	0	73.7	60	80.3	93.5	61.5

Dumb		40048	R148-48	457-48	153-50	211-01	Mean
Furious		212-01	228-01	392-48	1148-01	443-49	
Furious Brainstem	% positive neurons	63.7	71.9	77.2	43.2	90.7	69.34
	Avg Ag dot/positive neuron	0	3.3	3	5.6	8.4	4.06
	Avg Ag dot/positive neuron	3.8	4.9	4.5	2.5	4.8	4.1
	Avg % Ag area/positive neuron	0	3.52	2.44	4.6	6.55	3.422
	Avg % Ag area/positive neuron	9.26	8.2	1.037	3.62	8.76	6.1754
	% area Ag outside cells	0	0.123	0.075	0.753	2.376	0.6654
	% area Ag outside cells	2.63	11.13	3.41	1.32	5.84	4.866
	Inflammation	3	3	3	2	2	2.6
	Inflammation	1	1	2	1	1	1.2
Dumb C-cord	% positive neurons	64	94.68		94.3		84.3266667
Furious C-cord	% positive neurons			100	95.1	97	97.3666667
	Avg Ag dot/positive neuron	4.9	2.68		8.3		5.29333333
	Avg Ag dot/positive neuron			11	11.8	9.8	10.8666667
	Avg % Ag area/positive neuron	2.9	5.74		5.17		4.60333333
	Avg % Ag area/positive neuron			13.91	8.78	6.84	9.84333333
	% area Ag outside cells	1.54	0.46		2.135		1.37833333
	% area Ag outside cells			4.09	5.5	4.34	4.64333333
	Inflammation	1	1		1		1
	Inflammation			1	0	1	0.66666667
Dumb T-cord	% positive neurons	42.9	94.24		94.1		77.08
Furious T-cord	% positive neurons			100	94	95.2	96.4

Dumb		40048	R148-48	457-48	153-50	211-01	Mean
Furious		212-01	228-01	392-48	1148-01	443-49	
	Avg Ag dot/positive neuron	9.2	2.25		10.1		7.18333333
	Avg Ag dot/positive neuron			12.7	15.2	6.8	11.5666667
	Avg % Ag area/positive neuron	4.9	6.59		4.95		5.48
	Avg % Ag area/positive neuron			10.4	8.49	3.48	7.45666667
	% area Ag outside cells	1.38	0.47		1.19		1.01333333
	% area Ag outside cells			3.8	3.64	1.64	3.02666667
	Inflammation	1	1		1		1
	Inflammation			1	0	1	0.66666667
Dumb L-cord	% positive neurons	60	82.8		94.9		79.2333333
Furious L-cord	% positive neurons			98.8	100	96.4	98.4
	Avg Ag dot/positive neuron	15.7	1.57		7.5		8.25666667
	Avg Ag dot/positive neuron			9.3	16.7	10.2	12.0666667
	Avg % Ag area/positive neuron	7.2	6.27		5.95		6.47333333
	Avg % Ag area/positive neuron			8.14	11.26	6.29	8.56333333
	% area Ag outside cells	1.36	0.79		2.91		1.68666667
	% area Ag outside cells			2.49	5.46	2.98	3.64333333
	Inflammation	0	1		1		0.66666667
	Inflammation			0	0	0	0
Dumb S-cord	% positive neurons	69.5	51.59		59.3		60.13
Furious S-cord	% positive neurons			95.5	97.3	98.5	97.1
	Avg Ag dot/positive neuron	19.1	1.24		4.4		8.24666667

Dumb		40048	R148-48	457-48	153-50	211-01	Mean
Furious		212-01	228-01	392-48	1148-01	443-49	
	Avg Ag dot/positive neuron			19.3	11.6	7.8	12.9
	Avg % Ag area/positive neuron	9.7	0.89		1.48		4.02333333
	Avg % Ag area/positive neuron			8.55	11.43	5.03	8.33666667
	% area Ag outside cells	2.87	0.33		0.18		1.12666667
	% area Ag outside cells			4.45	5.74	2.74	4.31
	Inflamation	0	0		0		0
	Inflamation			0	0	1	0.33333333

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนิศาชล เทพา เกิดวันที่ 21 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2524 จังหวัดหนองคาย

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (วท.บ.) เทคนิคการแพทย์
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปีการศึกษา 2546

ระดับปริญญาโท

ศึกษาต่อวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต แขนงพยาธิวิทยา สาขาวิทยาศาสตร
การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2550

การนำเสนอผลงาน

นำเสนอผลงานในหัวข้อ “การศึกษาการแพร่กระจายแอนติเจนของเชื้อ
พิษสุนัขบ้า และการอักเสบในระบบประสาทส่วนกลางในระยะแรกของ
สุนัขบ้าที่มีอาการคลุ้มคลั่งและอ่อนแรง” ในจุฬาลงกรณ์เวชสาร

