

ABSTRACT

The objectives of this research project aim to create a clearer understanding of the role of wildlife (bats) and canine vectors in transmitting zoonotic encephalitogenic lyssa- and Nipah viruses as well as to implement molecular epidemiological technique in predicting transmission dynamic of rabies virus in Thailand and to develop simple methods and procedures to secure RNA from freshly collected and archival formalin fixed brain specimens.

Thai bats were found to be infected with (a) new lyssavirus genotype(s) as evidenced by neutralization assays. Also, presence of Nipah virus infection was demonstrated by high titers of antibody in the sera and recovery of RNA in saliva and urine. Species of bats as well as transmitting seasons were analyzed. It is clear that new paradigms for field studies of zoonotic diseases are necessary and from now on must include longitudinal and in-depth investigations of agent, host, habitat and environment in order to predict risk and response in appropriate manner.

Analysis of nucleocapsid gene of rabies virus in canine and wildlife and human samples all over the country confirmed compartmentalization theory that rabies viruses were segregated in certain geographical locations and that, in Thailand, human facilitated canine vector transfer was an effective mean to disseminate virus to distant location. Presence of more than one genotype or clade of virus in any region suggested a constant gene flow, thus, reflecting frequent migration of dogs between such region and neighbors. Area likely to be successful in dog campaign should contain only one homogeneous virus and enforcement of dog transfer regulation must be carried out.

In order to maximize reliability of epidemiological surveillance data, a simple dried brain spot technique was developed. Fresh brain tissues were smeared onto filter paper and air dried. This could be kept up to 222 days in room temperature. Rabies virus RNA could still be recovered and sequenced. Method of isolating and sequencing RNA from archival specimens (brain tissues fixed in acidic formalin for at least 7 days and embedded in paraffin and kept at room temperature for at least 16 years) was also successfully developed.

Apart from those originally proposed for grant support, we also characterize imaging characteristics in magnetic resonance imaging (MRI) in human rabies and illustrate the value of molecular technique in diagnosing human rabies during life. Based on clinical and disease patterns, MRI, algorithm in diagnosing rabies and other forms of viral encephalitides was developed and published in international journal and text books. Sequencing data (on rabies glyco-, phospho- and nucleoprotein genes) obtained from analysis of human rabies specimens presenting with either furious paralytic

forms also confirmed that there should be no specific variant responsible for individual manifestation and support the role of human immune responses. This immunopathogenetic role was also confirmed by development of paralysis in a furious rabies patient who received large dose of intravenous rabies immune globulin. Further, we also proved for the first time that weakness in human paralytic rabies was due to peripheral nerve dysfunction, thus, arguing against the direct virus effect upon anterior horn cells of spinal cord. Critical analysis of treatment failure cases also led to new WHO recommendation on rabies post-exposure prophylaxis.

Keyword: Rabies Lyssavirus Nipah virus Chiroptera PCR Diagnosis
Encephalitis Magnetic resonance imaging Rabies post exposure prophylaxis
Pathogenesis

บทคัดย่อ

เป้าหมายของการวิจัยคือเพื่อสร้างความกระจ่างในบทบาทของค้างคาวและสุนัขในด้านการแพร่กระจายไวรัส (lyssa และ Nipah) ซึ่งก่อให้เกิดสมองอักเสบ และเพื่อเป็นการขยายบทบาท ขอบเขตในการใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาในการติดตามการกระจายของไวรัสพิษสุนัขบ้าในพื้นที่ต่างๆของประเทศไทย นอกจากนั้น การวิจัยยังมีเป้าหมายที่จะทำการพัฒนาวิธีที่ง่าย ประหยัดและสะดวกในการเก็บรักษาเนื้อสมองเพื่อการตรวจหา RNA ของไวรัสพิษสุนัขบ้า รวมทั้งวิธีการสกัด RNA จากชิ้นเนื้อสมองซึ่งผ่านการแช่ฟอร์มาลินมาเป็นเวลานาน

ผลการศึกษาพบว่า ค้างคาวไทยมีการติดเชื้อ ไวรัส lyssa และ Nipah โดยใช้วิธี Neutralization assay สำหรับไวรัส lyssa และจากการที่พบแอนติบอดีระดับสูงในเลือดรวมทั้งพบ RNA ในน้ำลายและปัสสาวะในกรณีของไวรัส Nipah การศึกษายังได้รวมถึงการวิเคราะห์ชนิดของค้างคาวและฤดูซึ่งน่าจะมีการแพร่ไวรัส การศึกษานี้แสดงให้เห็นชัดเจนว่า ในการได้ครอบโรคอุบัติซ้ำ หรืออุบัติใหม่ ต้องมีความพร้อม รวมทั้งรูปแบบที่ไม่ซ้ำซากในการศึกษาสัตว์พาหะและนำโรค ต้องมีการติดตามในระยะยาว และมีการศึกษาลึกซึ่งทั้งในสัตว์นำโรค ตัวไวรัส รังและที่อยู่อาศัยของสัตว์และสภาพแวดล้อมทางภูมิศาสตร์ เพื่อที่จะทำนายความเสี่ยงของการระบาดในอนาคต และเพื่อการวางแผนการได้ตอบที่มีประสิทธิภาพ

การวิเคราะห์ nucleoprotein gene ของ ไวรัสพิษสุนัขบ้าในสุนัข คน และสัตว์ป่า ทั่วประเทศยืนยัน ทฤษฎีของการที่ไวรัสจะมีการวางตัวเฉพาะในภูมิประเทศหนึ่งๆ (compartmentalization theory) และยังแสดงว่า การที่ไวรัสสามารถแพร่ระบาดไปได้ทั่วเกิดจากการที่สุนัขซึ่งเป็นโรคหรืออยู่ในระยะฟักตัวมีคนนำพาไปยังถิ่นต่างๆ อันเป็นการทำให้มีการแพร่โรคได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น นอกจากนั้นผลการศึกษาพบว่าการที่มีไวรัส 1 สายพันธุ์ (genotype หรือ clade ก็ตาม) ในพื้นที่หนึ่งๆเป็นการแสดงถึงภาวะที่มีการไหลเทของ gene (gene flow) ได้อย่างสิ้นไหล และแสดงถึงมีการเคลื่อนที่ของสุนัขเข้า / ออก ในพื้นที่นั้นและข้างเคียงตลอดเวลา ซึ่งพื้นที่ลักษณะดังกล่าวไม่เหมาะแก่การบรรจุควบคุมประชากรสุนัขและโรคพิษสุนัขบ้าเป็นแห่งแรก นอกจากนั้นการควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพ ต้องมีการป้องกันไม่ให้มีการนำสุนัขข้ามท้องที่ โดยไม่ได้รับอนุญาต

ผลของการพัฒนาการป้ายเนื้อสมองลงบนกระดาษกรอง เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการทราบถึงข้อมูลทางระบาดวิทยา ทั้งนี้เนื่องจากการเก็บไม่ต้องใช้ตู้เย็น สะดวก ประหยัด และเก็บในอุณหภูมิห้องได้ไม่ต่ำกว่า 222 วัน ยังสามารถนำมาตรวจหา RNA และลำดับเบสได้อย่างถูกต้อง การที่สามารถแยกสกัด RNA จากเนื้อสมองซึ่งแช่ในฟอร์มาลินมาเป็นเวลานานถึง 7 วัน (ซึ่งปกติจะนานกว่าการแช่ของเนื้อเยื่อชนิดอื่นๆ) และเก็บในพาราฟินนานถึง 16 ปี จะสามารถนำมาตรวจสอบผู้ป่วยที่เสียชีวิตในอดีตที่ยังไม่สามารถทราบการวินิจฉัยที่แน่นอนได้

งานที่ทำในช่วง 3 ปี ยังได้ผลงานนอกเหนือจากที่ได้ยื่นขอไว้ โดยมีได้ซึ่งงบประมาณเพิ่ม กล่าวคือ การค้นพบลักษณะเฉพาะของสมองจากภาพคอมพิวเตอร์สนามแม่เหล็กไฟฟ้า ในผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้า และสามารถแยกเยาะความไวในการตรวจหา RNA ของไวรัสในสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆในช่วงเวลาต่างๆกันตั้งแต่เริ่มมีอาการ ทั้งหมดนี้มีประโยชน์อย่างยิ่งในการวินิจฉัยโรคในคน และจากข้อมูลดังกล่าวยังนำมาสร้าง แบบแผนในการวินิจฉัยแยกโรค สมองอักเสบชนิดต่างๆในคน งานวิเคราะห์รูปแบบของ nucleocapsid, phosphoprotein, และ glycoprotein genes ซึ่งพบว่าไม่มีรูปแบบเฉพาะในผู้ป่วยที่มีอาการต่างๆกันร่วมกับการที่ผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าที่มีอาการอะอะ อาละวาด หลังจากได้รับการรักษาด้วย rabies immune globulin มีแขนขาอ่อนแรง แสดงว่ากลไกที่ควบคุมอาการของโรคในคนมีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยมากกว่าที่จะถูกกำหนดจากสาย

พันธุ์ หรือความแตกต่างของลำดับรหัสพันธุกรรมใน gene ต่างๆแต่เพียงอย่างเดียว นอกจากนั้นการค้นพบว่า
ประสาทอักเสบเป็นตัวการที่ทำให้มีกล้ามเนื้ออ่อนแรง เป็นเครื่องสนับสนุนบทบาททางภูมิคุ้มกันต่อตัวเชื้อไวรัส ทั้งนี้
เนื่องจากไวรัสจะแพร่กระจายในเซลล์ที่ควบคุมกล้ามเนื้อในไขสันหลัง การวิเคราะห์ข้อมูลของผู้ป่วยที่เสียชีวิตแม้
ได้รับการรักษา ยังนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงข้อแนะนำในการให้การป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าของ WHO.