



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษากลไก “คลุ้มคลั่ง” และ “ผลกระทบจากโลก
ร้อน” โดยใช้โรคพิษสุนัขบ้า และ ciguatoxin เป็นแม่แบบ :
การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากประสาทวิทยาศาสตร์

โดย ศาสตราจารย์ นายแพทย์ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา
และคณะ

กรกฎาคม ๒๕๕๔

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการ: การศึกษากลไก “คลุ้มคลั่ง” และ “ผลกระทบจากโลกร้อน”
โดยใช้โรคพิษสุนัขบ้า และ ciguatoxin เป็นแม่แบบ :
การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากประสาทวิทยาศาสตร์

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1. ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุธา | คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2. ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี | คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 3. ผศ.ดร.จิรพล สิ้นธนา | คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ |
| 4. ศ.นพ.ชนพ ช่างโชติ | ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ |
| 5. ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล | สถาบันศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ |
| 6. นายสัตวแพทย์ วีระ เทพสุเมธานนท์ | สถานเสาวภา สภากาชาดไทย |
| 7. ดร.ผกามาศ ขาวปลอด | สถานเสาวภา สภากาชาดไทย |
| 8. น.ส.ณัฐภาณี วัฒนศิริเดชชัย | คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 9. น.ส.พัชรมน วิโรจนภิรมย์ | คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 10. น.ส.นิศาชล เทพา | คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 11. น.ส. พรพรรณ สุวรรณวงศ์ | คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานฉบับนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
ABSTRACT.....	1
บทคัดย่อ.....	3
EXECUTIVE SUMMARY.....	5
เนื้อหางานวิจัย.....	8
โครงการที่ 1 การศึกษา temporal-spatial relationship ของอาการ “คลุ้มคลั่ง” กับการเคลื่อนและการ กระจายตัวของ recombinant rabies virus และความผิดปกติที่พบใน magnetic resonance imaging.....	8
โครงการที่ 2 Neuropathology of Inhibitory Neurons in Furious and Paralytic Rabies of canine origin.....	22
โครงการที่ 3 การศึกษาโปรตีนในสมอง ก้านสมอง และไขสันหลังของสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบ อาการดุร้ายและแบบอัมพาต.....	23
โครงการที่ 4 การตรวจไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าจากสิ่งส่งตรวจนอกสมองในสุนัขที่เสียชีวิตด้วยเทคนิค อนุชีววิทยา.....	42
โครงการที่ 5 การสำรวจนําร่อง ciguatoxin ในเนื้อปลาที่นำส่งเข้าตลาดของกทม.และจังหวัดใกล้เคียง	47
โครงการที่ 6 Distribution of Rabies Antigen and Inflammatory Response in Furious and Paralytic Rabies of Canine Origin.....	50
OUTPUT OF RESEARCH.....	52
ผลงานทางวิชาการ.....	52
ประโยชน์ของงานวิจัยในเชิงสาธารณะ.....	60
รายชื่อผู้ทำงานในโครงการ.....	40
ภาคผนวก.....	97

ABSTRACT

The present integrated study aimed to provide better understanding of mechanisms responsible for neurological disorders manifesting as “furious or aggression” (rabies as prototype) and neuromuscular-autonomic derangements (ciguatera toxin as prototype). Various techniques in recombinant viral technology, neuropathology, proteomic profiling study as well as critical analysis of patients with marine fish poisoning and survey for ciguatera toxin contaminated fishes at the markets.

Although we could not identify “furious centre” in the brain by molecular imaging of recombinant rabies virus decorated with ferritin gene [project(1)], we were able to obtain, for the first time, rabies viruses passaged in non-neuronal baby hamster kidney (BHK) cells with increased (diminished LD50) instead of decreased virulence. Such street rabies virus (QS-05) at 7th passage in BHK cells, namely QS 05-BHK-P7, could cause disease in mice by both intra-cerebral (IC) and -muscular challenges (whereas the parental virus could only by IC inoculation). Whole viral genome sequencing revealed mutation points at several genes. However the most likely mutation responsible for such phenotypic change was at 7th polyadenylation site of intergenic region between phospho- and matrix-protein genes, which may disturb homeostasis of transcription and replication and process of budding/immune evasion. Construction of recombinant QS-05 and BHK-P7 viruses was achieved at the final stage of virus recovery due to the unavailability of T7 RNA polymerase gene-plasmid and – BHK cells (material agreement transfer among 3 international institutions).

Having realized the incompleteness of project (1), we decided to augment with project (6) on the distribution pattern study of rabies antigen and inflammation in the CNS of early rabid dogs of furious and paralytic types. Results showed a caudal-rostral trend of antigen abundance particularly in the paralytic groups. The inflammatory cells were demonstrated exclusively in the brainstem of paralytic dogs. These findings were in agreement with our previously published brain mapping data of rabid dogs (Adv Viral Res 2011) in that axonal tract integrity was disrupted at the brainstem of paralytic dogs. All of these underscored the importance of inflamed brainstem as “gate or barrier” in preventing virus from spreading towards the cerebral hemispheres. Role of inhibitory neurons [project (2)] was found not to play any significant role in the genesis of “furious” character in rabies since numbers of inhibitory neurons were comparable at different brain regions of both forms of rabid dogs.

Proteomic profiling studies [Project (3)] of the furious and paralytic rabid dogs’ brains as examined by SDS-PAGE followed by LC-MS/MS was the continuation of our previous investigation using 2D-PAGE on late-stage rabid dogs’ brains (during minor review and accepting process). Results confirmed the role of brainstem in retarding viral progression, particularly in the case of paralytic rabies. This was in accord with neuropathology and brain mapping studies (as above). Heat shock or stress protein

Project (4) focused on an alternative source to detect rabies viral RNA in animals. Although brain is the perfect sample for rabies diagnosis, it has been frequently affected by hot climate, rendered it unsuitable for fluorescence antibody test (FAT) or molecular detection. Our study showed that whisker follicles and hair follicles and saliva obtained from dogs after death could be used as alternative option. Since the sensitivity of examination using these non-neural specimens was in the range between 80 and 85%, it is used for enhancing epidemiological surveillance to assess rabies burden in endemic countries. We also proved that real-time RT-PCR yielded a comparable result with nested RT-PCR (as reported by Institut Pasteur group) in terms of sensitivity although the target sequences were different (nucleocapsid in the former and polymerase gene in the latter technique).

Project (5) highlighted ciguatera toxin from fish as a potential epidemic. Analysis of patients who had neurologic disorders from fish consumption showed 6 patients (2 from Chulalongkorn and 4 from Phuket hospitals) compatible with ciguatera poisoning. Their dramatic recovery within 24 hours from neuromuscular and autonomic nervous system disturbances differentiated ciguatera poisoning from other related illnesses from fish (such as, puffer fish poisoning) or from bamboo stick poisoning (botulism). Two of 227 fish samples as surveyed from 3 markets in Bangkok showed borderline result. Problem of ciguatera poisoning, a perfect example of global warming effect, must be underestimated. This has to be urgently warned and needs multidisciplinary approach to prevent further outbreaks.

บทคัดย่อ

โครงการประยุกต์การใช้ประโยชน์จากประสาทวิทยาศาสตร์ เป็นการผนวก ความรู้ ทักษะทางคลินิก การสำรวจตัวอย่าง การตั้งสมมุติฐาน และการใช้เทคโนโลยีในการวิเคราะห์สาเหตุความผิดปกติทางสมอง (“คลุ้มคลั่ง” ในโรคพิษสุนัขบ้า) และความผิดปกติทางระบบประสาทในรูปชา อ่อนแรง ความผิดปกติทางระบบหัวใจ (จากผลของโลกร้อนสู่ปลาพิษ ciguatoxin)

อาการ “คลุ้มคลั่ง” (โครงการ 1) แม้จะไม่บรรจุเป้าประสงค์เดิมในการอธิบายตำแหน่งของสมองโดยการติดตามตัวไวรัสที่มี Ferritin gene ติดอยู่ในร่างกายของสุนัขบ้า เนื่องจากไวรัสต้นแบบที่มีไม่สามารถ “วิ่ง” ได้จากตำแหน่งที่ฉีดที่กล้ามเนื้อเข้าไปในสมอง กระบวนการหาไวรัสต้นแบบกลับพบปรากฏการณ์พิเศษที่เมื่อนำไวรัสจากสมองสุนัขบ้า ผ่านเข้าไปในเซลล์ที่ไม่ใช่สมอง (Baby Hamster Kidney-BHK) ไวรัสจะมี phenotype และ genotype เปลี่ยนไปคือก่อโรคได้ทั้งการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและเข้าสมอง (โดยที่ไวรัสดั้งเดิมก่อโรคจากการฉีดเข้าสมองอย่างเดียว) และมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น (LD50 ลดลง) โดยมี mutation ที่หลายตำแหน่งของ genes แต่ตำแหน่งที่ควรอธิบายลักษณะได้ดีที่สุดน่าจะเป็นที่ 7th Polyadenylation site ของ intergenic region ระหว่าง phospho- และ matrix protein gene ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนสุดท้ายของการ recovery recombinant virus จาก street และ BHK-adapted virus ผู้วิจัยขยายขอบเขตของงานโดยเพิ่ม (โครงการ 6) ศึกษาการกระจายตัวของโปรตีนของไวรัสและเซลล์อีกเสบในระบบประสาทของสุนัขที่มีและไม่มีอาการคลุ้มคลั่ง และยืนยัน ก้านสมองเป็นเสมือน “ประตู” กันให้ไวรัสวิ่งสู่สมองช้าลง โดยพบการอักเสบเฉพาะที่ก้านสมองในสุนัขไม่คลุ้มคลั่ง ซึ่งตรงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของผู้วิจัยในการทำแผนที่สมองสุนัขบ้า (Adv Viral Res 2011) ที่มีสายใยประสาทผิดปกติที่ก้านสมองและเป็นสาเหตุให้ไวรัสในสมองสุนัขชนิดคลุ้มคลั่งมีจำนวนมากกว่าสุนัขชนิดไม่คลุ้มคลั่ง อย่างไรก็ตามในส่วนส่วนของเซลล์ประสาทยับยั้ง (โครงการ2) ที่ว่าควรจะมีจำนวนต่างกัน 2 กลุ่มอาการ พบว่าไม่เป็นไปตามสมมุติฐาน แสดงว่าควรมีกลไกซับซ้อนร่วมกันของระบบประสาทมากกว่าเซลล์ยับยั้งเดี่ยวๆ โปรตีนในสมองและไซสตันหลังของสุนัขบ้าอาการต่างๆกันและสุนัขปกติในระยะเริ่มแรก (โครงการ3)เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากผู้วิจัยทำซึ่งเป็นระยะสุดท้าย (ด้วย 2D-PAGE) (อยู่ในระหว่างแก้ไขและพิจารณาตีพิมพ์) และในครั้งนี้เป็นระยะต้นของสุนัขบ้า (ด้วย SDS-PAGE และ LC-MS/MS) โปรตีนที่พบยืนยันความสำคัญของก้านสมองโดยที่มีหลักฐานของ Anti-oxidant หรือ Stress proteins และ CRMP-2 ซึ่งแสดงถึงการตอบโต้ของระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบ innate และ adaptive immunity

การตรวจชันสูตรโรคสุนัขบ้า โดยไม่ใช้สมองซึ่งมีผลกระทบจากอากาศร้อนทำให้สมองอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสม (โครงการ 4) พบว่าสามารถใช้น้ำลาย หนอง และขนของสุนัขบ้าที่ตายแล้วในการวิเคราะห์ได้ โดยแม้ไม่ให้ผลความไว 100% (อยู่ระหว่าง 80-85%) การตรวจตัวอย่างดังกล่าว ซึ่งจัดเก็บได้ง่ายกว่าการตัดหัว เปิดกระโหลก เป็นตัวเลือกที่ดีในการประเมินสถานการณ์ทางระบาดวิทยาได้ และยังพิสูจน์ว่าวิธีการ Nested PCR ต่อ Polymerase Gene มีความไวพอกับ Real-time PCR ต่อ Nucleocapsid gene ซึ่งวิธีการแรกเป็นของคณะวิจัยจากสถาบันปาสเตอร์และวิธีหลังเป็นของผู้วิจัยเอง

โครงการสุดท้าย (5) เกี่ยวกับพิษจากปลา Ciguatoxin ซึ่งส่งผลร้ายต่อระบบประสาทกล้ามเนื้อ และระบบอัตโนมัติ ผู้วิจัยได้พบและทำการรักษาผู้ป่วย 2 รายที่ รพ.จุฬาลงกรณ์ และ พบผู้ป่วยอีก 4 รายจากการสืบค้นโดยมีประวัติครบถ้วนที่ รพ.ภูเก็ต ทั้ง 6 รายมีลักษณะเฉพาะที่ควร

นำมาใช้แยกจากพิษชนิดอื่นๆทั้งจากปลาปักเป้า และหน่อไม้พิษ (botulism) และผู้วิจัยสำรวจปลาและเนื้อปลาแล่ จากตลาดพบ 2 จาก 227 ตัวอย่างให้ผลก้ำกึ่ง (borderline) เหล่านี้ควรเป็นสัญญาณเตือนภัยของปลาพิษที่ควรพบมากขึ้นเรื่อยๆในอนาคต

EXECUTIVE SUMMARY

โครงการ : การศึกษากลไก “คลุ้มคลั่ง” และ “ผลกระทบจากโลกร้อน” โดยใช้โรคพิษสุนัขบ้า และ ciguatoxin เป็นแม่แบบ : การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากประสาทวิทยาศาสตร์

หัวหน้าโครงการ : ศาสตราจารย์ นายแพทย์ วีระวัฒน์ เหมะจุฑา

สาขา : Targeted Basic Research-Medical Science

งบประมาณ : 8,518,000.00 บาท (แปดล้านห้าแสนหนึ่งหมื่นแปดพันบาทถ้วน)

ระยะเวลา : 3 ปี ตั้งแต่วันที่ 28 กรกฎาคม 2551 ถึง 27 กรกฎาคม 2554

โครงการวิจัยนี้มีรากฐานจากโรคหรือความผิดปกติที่เกิดขึ้นแก่สมองและระบบประสาท และใช้กระบวนการทางประสาทวิทยาศาสตร์ในการสืบเสาะ วิเคราะห์กลไกความผิดปกติ โดยที่ความผิดปกติที่เป็นตัวแทนในโครงการนี้คือ อาการ “คลุ้มคลั่ง” ซึ่งเป็นอาการสำคัญในโรคพิษสุนัขบ้า และอาการพิษที่เกิดจากปลาทะเลที่มีผลต่อการทำงานของสื่อประสาท ระหว่างเส้นประสาท และกล้ามเนื้อและระบบประสาทอัตโนมัติ โดยพิษที่เป็นเป้าหมาย คือ “ciguatera toxin” ซึ่งมีแนวโน้มสูงขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของอากาศ และโลกร้อน

อาการ “คลุ้มคลั่ง” โดยแม่บทเดิม จะใช้ไวรัสที่สร้างขึ้นใหม่ (recombinant virus) โดยมี ferritin gene ขมวดใน genes ของไวรัส และติดตามการเคลื่อนที่โดยใช้คอมพิวเตอร์สนามแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic Resonance Image –MRI) ตรวจจับในสัตว์ที่มีการติดเชื้อ นอกจากนั้นจะเป็นการวิเคราะห์ความเปลี่ยนแปลงในระดับ โปรตีน (proteomic profiling) ในส่วนต่างๆของสมองและไขสันหลังของสุนัขบ้าที่มีและไม่มีอาการ คลุ้มคลั่ง ร่วมกับการพิสูจน์สมมุติฐานที่ว่าเซลล์ประสาท (neuron) ชนิดที่มีผลยับยั้ง (inhibitory) น่าจะมีปริมาณแตกต่างกันใน 2 กลุ่มอาการ อีกทั้งโครงการยังได้ขยายขอบเขตไปถึงการชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้าในเมืองร้อน ซึ่งสมองส่งตรวจจะมีการนำเสียหาย และชันสูตรไม่ได้ด้วยวิธี Fluorescence Antibody Test (FAT) หรือแม้แต่วิธีทางชีวโมเลกุลก็ตาม

ผลการวิจัยในส่วนของการสร้าง recombinant virus โดยวิธี reverse genetic พบอุปสรรคเนื่องจากไวรัสต้นแบบที่ใช้ซึ่งมีวิธีในการสร้าง recombinant พื้นฐานอยู่บ้างแล้ว คือ HEP-Flury ไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังระบบประสาทและสมองได้ จากการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ และแม้แต่ฉีดเข้าสมองโดยตรงก็ตาม หรือแม้แต่ใช้ไวรัสที่ได้จากสมองสุนัขบ้าโดยตรง (QS-05 strain) ก็ยังพบว่าผลของการเกิดโรคในสัตว์ทดลองไม่คงที่จากการฉีดทางกล้ามเนื้อ แต่ก่อโรคเมื่อฉีดเข้าสมองเท่านั้น จากผลการก่อโรคที่แตกต่างกันนี้เองทำให้ผู้วิจัยต้องการไวรัสต้นแบบใหม่ โดยทำการ passage ไวรัสจากสมองสุนัขบ้าผ่านเข้าไปในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีได้มีต้นกำเนิดจากเซลล์ประสาท (non-neural cell line) ได้แก่ เซลล์ Baby Hamster Kidney-BHK ในระหว่างที่ทำการ passage ใน BHK เซลล์จนถึงลำดับที่ 7 พบมี phenotype แทนที่จะอ่อนกำลังลง (attenuation) กลับมีความสามารถในการก่อโรค (pathogenicity) สูงขึ้น ทั้งการฉีดเข้าสมองและกล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน

การวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ระหว่าง QS05-BHK P7 และ QS-05 ซึ่งเป็น parental strain พบมี mutation ทั้งที่เป็น synonymous และ non-synonymous ในหลาย gene แต่ mutations ใน glycoprotein (G) genes ไม่อาจอธิบายปรากฏการณ์นี้ได้ โดยที่ mutation ใน codon 23 เป็นเพียง marker ของไวรัส ที่เป็น non-neuronal adaptation และ mutation ใน G gene นั้นไม่จำเพาะใน PDZ domain-binding motif ใน cytoplasmic region ทั้งนี้โดยที่ QS-05 และ QS05-BHK-P7 มี

cytoplasmic G sequence เหมือนกัน จุดเดียวที่มีความเป็นไปได้คือ mutation ที่ intergenic region (IGR) ระหว่าง phosphoprotein (P) และ matrix (M) gene ที่ 7th polyadenylation site ทั้งนี้โดยที่ไวรัสเป็น monocistronic, non-segmented และมี transcription gradient โดยเริ่มจาก 3' ตั้งแต่ N-P-M-G-L-5' ตำแหน่งใน IGR ดังกล่าวน่าจะเกิดผลกระทบต่อ expression ของ M protein ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการ budding และกระทบต่อ phenotype ของไวรัสได้ การสร้าง recombinant virus Q5-05 และ BHK-P7 โดยร่วมมือกับ Oita University (ประเทศญี่ปุ่น) อยู่ในขั้นตอนสุดท้ายของการ recovery ไวรัส และสามารถนำมาใช้ในการศึกษากลไกพยาธิกำเนิดต่อไปได้ รวมทั้งจะเป็นครั้งแรกที่สามารถ recover dog street virus ได้จากกระบวนการ reverse genetic

เนื่องจากคณะผู้วิจัยตระหนักในความไม่สมบูรณ์ของโครงการ 1 แม้จะพบขั้นตอนของการเปลี่ยนคุณสมบัติไวรัสก็ตาม จึงได้เพิ่มเติมโครงการ 6 เป็นการทดแทน ได้แก่ การศึกษาการกระจายตัวของโปรตีน (หรือ antigen) ของไวรัสในระบบประสาททั้งสมองและไขสันหลังของสุนัขบ้าตั้งแต่มีอาการเริ่มต้น (early stage) ทั้งที่มีและไม่มีอาการคลุ้มคลั่ง ซึ่งไม่มีผู้วิเคราะห์มาก่อน ทั้งนี้การวิเคราะห์ได้ใช้ image analyser ซึ่งเป็น quantitative analysis (ไม่ใช่ semi – quantitative) ผลที่ได้พบว่า antigen ในส่วนต่างๆของระบบประสาทสุนัขบ้าที่คลุ้มคลั่งมากกว่าสุนัขบ้าที่ไม่คลั่ง (ซึ่งตรงกับการศึกษาของผู้วิจัยที่ผ่านมาในระดับ viral RNA) และลักษณะปริมาณของ antigen จะเป็น Caudal-Rostral gradient นั่นคือปริมาณจะมากขึ้นที่ไขสันหลัง ก้านสมอง และลดลงเรื่อยๆที่ระดับสมอง โดย gradient ดังกล่าวจะเห็นชัดในสุนัขบ้าที่ไม่คลั่ง อีกประการที่สำคัญคือ พบการอักเสบโดยมีเซลล์อักเสบแทรกในเนื้อสมองเฉพาะที่ก้านสมองในสุนัขบ้าที่ไม่คลั่ง ข้อมูลดังกล่าวตรงกับผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยเอง แผนที่จะส่องสุนัขบ้าด้วย MRI วิธีใหม่ โดยวัดการเคลื่อนตัวของโมเลกุลของน้ำตามทางเดินเส้นใยประสาท (ตีพิมพ์ใน Adv Viral Res 2011) โดยพบว่าการ “ชะงัก” หรือมีความผิดปกติของ tract integrity ที่ก้านสมองของสุนัขบ้าที่ไม่คลั่ง ซึ่งทั้งนี้อธิบายจากการที่มีเซลล์อักเสบที่ก้านสมองนั่นเอง

โครงการ 2 การศึกษาบทบาทของเซลล์ยับยั้งในอาการคลุ้มคลั่ง พบว่า ไม่เป็นตามสมมุติฐาน กล่าวคือ เซลล์ยับยั้งมีปริมาณจำนวนไม่แตกต่างกันใน 2 กลุ่มอาการ ดังที่เคยมีหลักฐานในโรคจิตประสาท (psychosis) และโรคลมชัก และทำให้อาจสรุปขึ้นต้นได้ว่า อาการดังกล่าวอาจจะเป็นผลรวมของ complex network มากกว่า

โครงการที่ 3 เป็นการวิเคราะห์โปรตีนในสมองระยะต้นและท้ายของสุนัขบ้าทั้ง 2 กลุ่มอาการ โดยผลที่ได้ยืนยันข้อมูลที่ได้ก่อนหน้านี้ซึ่งทำในสมองระยะท้ายด้วยวิธี 2-D-PAGE (อยู่ระหว่างแก้ไขและรอพิจารณาตีพิมพ์) โดยครั้งนี้ใช้วิธี SDS-PAGE และ LC/MS/MS ข้อมูลที่ได้ยืนยันความสำคัญของ “ก้านสมอง” ในการชะลอการเคลื่อนตัวของไวรัส โดยที่โปรตีนในระบบ anti-oxidant / stress proteins และ CRMP-2 ซึ่งเป็นสัญลักษณ์ของ innate และ adaptive immunity พบที่ก้านสมองของสุนัขบ้าชนิดไม่คลุ้มคลั่ง แม้ปริมาณไวรัสในกลุ่มนี้จะน้อยกว่ากลุ่มสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งก็ตาม และยังพบ CD₂ (T และ NK เซลล์) ที่ hippocampus ของสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่ง

โครงการที่ 4 จากสภาพที่อาจไม่เหมาะสมของสมองในภาวะอากาศร้อน คณะผู้วิจัยได้ทำการพิสูจน์ว่า น้ำลาย หนอง และรากขนสุนัขบ้าที่เสียชีวิตแล้ว ก็สามารถนำมาตรวจ RNA ได้โดยที่ถึงแม้ว่าจะมีความไวประมาณ 80-85% แต่มีความจำเพาะ 100% และถึงแม้ว่าไม่สามารถนำไปประกอบการตัดสินใจว่าควรให้การรักษาผู้สัมผัสโรคหรือไม่ แต่วิธีดังกล่าวสามารถนำมาใช้ประเมินสถานการณ์ของ

โรคพิษสุนัขบ้าได้ โดยไม่ต้องตัดคอสุนัข และไม่ต้องแฉะกะโหลกเพื่อเอาสมองมาตรวจ อนึ่งผู้วิจัยได้ทำการพิสูจน์วิธีการตรวจทางอณูชีววิทยาว่า วิธี nested PCR มีความไวไม่ต่างจากวิธี real-time PCR และ Target ที่ polymerase gene ในวิธีแรกตามที่คณะของ Pasteur Institute ได้รายงานว่าได้ผลความไว 100% แท้จริงไม่ต่างจากการใช้ target ที่ nucleocapsid gene ขณะนี้ได้มีโครงการควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าของประเทศอินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ ให้ความสนใจโดยขอรายละเอียดและติดต่อขอรับการอบรมการตรวจวินิจฉัยด้วยตัวอย่างที่ไม่ใช่สมองนี้

โครงการที่ 5 เป็นตัวแทนของโรคทางระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับโลกร้อน โดยได้ทำการวิเคราะห์ผู้ป่วยที่รักษาต่อที่ รพ.จุฬาลงกรณ์ และ รพ.ภูเก็ต จากการบริโภคปลา (ซึ่งผู้วิจัยได้เป็นผู้ดูแลผู้ป่วยเอง) พบว่ามีลักษณะเข้าได้กับพิษ ciguatera โดยแยกจากพิษที่มีผลทางระบบประสาทจากปลาปักเป้า และหน่อไม้พิษ (Botulism) จากอาการทางระบบประสาทอัตโนมัติทางหัวใจ คลื่นไส้อาเจียร ปวดท้อง และอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง ซึ่งจะมีอาการดีขึ้นจนหายได้สมบูรณ์ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น จากการสูมตัวอย่างปลา (69 ตัว) และชิ้นเนื้อปลาแล้สำเร็จรูปที่ขายในตลาด (158 ชิ้น) ใน กทม. พบ 2 ตัวอย่างของชิ้นเนื้อแล้ที่มีปฏิกิริยา Borderline รายงานขั้นต้นแสดงว่าพิษ ciguatera จากปลามีจริงและควรให้ความสนใจในทุกระดับ

เนื้อหางานวิจัย

โครงการที่ 1 การศึกษา temporal-spatial relationship ของอาการ “คลุ้มคลั่ง” กับการเคลื่อนและการกระจายตัวของ recombinant rabies virus และความผิดปกติที่พบใน magnetic resonance imaging

ผู้รับผิดชอบหลัก ดร.ผกามาศ ขาวปลอด

นส.พัทธมน วิโรจนากิรมย์

นักศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาชีวเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาและอธิบายกลไกในการเกิดอาการ “คลุ้มคลั่ง” ในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า โดยใช้ ferritin-modified rabies virus

การดำเนินงาน

โครงการนี้เป็นการศึกษากลไกการเกิดอาการของโรคพิษสุนัขบ้าโดยใช้ ferritin-modified virus ในการติดตามตัวว่าเชื้อไวรัสได้ไปอยู่ที่ส่วนไหนของระบบประสาทในขณะที่เกิดอาการ จากแผนการดำเนินงานเดิมที่จะใช้ full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า HEP-Flury strain เป็น recombinant virus(rHEP-GFP) ในการศึกษากลไกในการเกิดอาการคลุ้มคลั่งในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าเนื่องจากเรามี condition ในการทำ recombinant virus ของ HEP-Flury strain (rHEP-Flury strain) อยู่แล้วซึ่งคาดว่าจะแทนที่ GFP gene ที่ pseudogene region ระหว่าง G-L gene ด้วย Ferritin gene แต่พบว่าเมื่อนำเชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้ไปทดสอบในหนูทดลองพบว่าไม่มีคุณสมบัติเป็น neurovirulence ไม่ว่าจะฉีดด้วยวิธีการแบบ intramuscular พบว่าเชื้อไวรัสไม่สามารถแพร่กระจายจาก peripheral ไปยัง central nervous system ได้ หรือฉีดทาง intracerebral เชื้อไวรัสไม่สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพแต่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี ซึ่งมีคุณสมบัติตรงกันข้ามกับ neurovirulence อย่างสิ้นเชิง ผู้วิจัยจึงเห็นสมควรที่จะไม่ใช้ rHEP-GFP ในการดำเนินงานวิจัยนี้ต่อ

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเปลี่ยนสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเป็น CVS strain แต่จากการทดสอบความสามารถในการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า CVS strain ภายหลัง การฉีดเชื้อเข้าไปยังหนูทดลองทาง intracerebral ที่ dilution ต่างๆ พบว่าที่ dilution 10^{-5} และ 10^{-6} ไม่สามารถทำให้หนูตายได้ทั้งหมด และเมื่อฉีดเชื้อไวรัสในหนูทดลองทั้งทาง intracerebral และ intramuscular ที่ dilution 10^{-1} หนูทดลองที่ได้รับเชื้อทาง intracerebral ตายทั้งหมด ในขณะที่หนูทดลองที่ได้รับเชื้อทาง intramuscular มีเพียงบางตัวเท่านั้นที่ตายและบางตัวไม่มีอาการผิดปกติใดๆและไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในสมองของหนู ดังนั้นเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า CVS strain จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยนี้

ทางผู้วิจัยจึงทำการเปลี่ยนสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเป็น QS05 strain ซึ่งเป็น street virus ที่ isolate จากสมองของสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าโดยตรง นำมาเพิ่มจำนวนใน suckling mice 1 passage ทำ stock seed virus เป็น 20% suspension เพื่อนำมาใช้ในงานวิจัยต่อไป

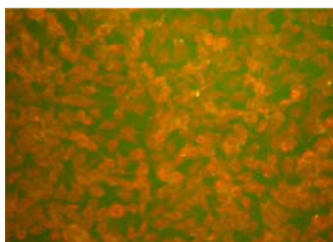
อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อนำเชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้ไปตรวจสอบคุณสมบัติในสัตว์ทดลอง พบว่าเชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้แสดง neuropathogenesis ได้ดีเมื่อนำเชื้อไวรัสทาง intracerebral แต่แสดง neuroinvasiveness ไม่ดีนักเมื่อนำเชื้อไวรัสเข้าทาง intramuscular ซึ่งยังอาจไม่เหมาะสมในการมาทำ recombinant ไวรัสที่จะมาทำการศึกษา

นอกจากนี้การนำ street virus QS-05 strain ไปเพิ่มจำนวนใน suckling mice ใน passage ที่ 2 ก็ไม่สามารถเพิ่ม mortality rate โดยการฉีดเข้าทาง intramuscular หรือ peripheral route

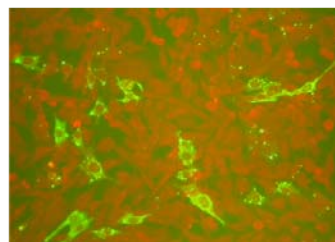
จากประสบการณ์การทำไวรัส isolation และ propagation ในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยเฉพาะ Baby Hamster Kidney Cells (BHK-21 cells) ซึ่งเป็น non-neuronal cells พบว่า street virus จะมี infectivity ต่ำและมี growth rate ที่ช้ามากเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพิ่มจำนวนในสัตว์ทดลองโดยการฉีดเข้าทาง intracerebral เช่น การนำ 20% brain suspension ไปฉีดสัตว์ทดลองทาง intracerebral สัตว์ทดลองจะมี mortality rate 100% แต่ถ้าฉีดเข้าทาง intramuscular จะมี mortality rate ประมาณ 30% หรือน้อยกว่า หรือหากนำไป infect BHK-21 cells จะมี infectivity ในเซลล์ BHK-21 ประมาณ 10-20% เท่านั้น และมี growth rate ที่ช้ากว่าหากนำไปเปรียบเทียบการ propagate ใน NA cells ซึ่งเป็น neuron cells

หนึ่งในขณะเดียวกันผู้วิจัยยังคงทำ QS-05 subpassage ใน BHK-21 ต่อไปเพื่อเพิ่มจำนวน และหลีกเลี่ยงการใช้ suckling mice และเนื่องจากผู้วิจัยสันนิษฐานว่าแม้ rabies virus จะเป็น neurotropic virus แต่เชื้อไวรัสที่สามารถ infect และอยู่รอดและเพิ่มจำนวนใน non-neuron cells ได้น่าจะมีความสำคัญใน กระบวนการเกิด pathogenesis (หรือ non-neuron cells เป็นตัวคัดเลือกที่สำคัญในการเกิด pathogenesis ของ rabies virus ในธรรมชาติ) จากการทำ subpassage QS-05 ไปเรื่อยๆพบว่า QS-05 strain เริ่มมี growth rate และเพิ่มจำนวนมากขึ้นในประมาณ passage ที่ 4-5 และเมื่อ harvest virus supernatant ใน passage ที่ 7 (QS05-BHK-P7) (รูปที่ 1) และนำไปตรวจสอบในหนูทดลองพบว่ามี mortality rate 100% เมื่อนำเชื้อไวรัสเข้าทาง intramuscular route (ตารางที่ 1) ดังนั้น QS05-BHK-P7 strain จึงสมควรเป็น candidate ที่เหมาะสมในการศึกษาเนื่องจากมีความสามารถในการก่อโรคได้ทาง peripheral challenge และยังมีมีความสำคัญที่ต้องศึกษาว่ามีพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงที่ยีนตัวไหน อย่างไร หรือเป็นที่ intergenic region (IGR) ซึ่งอาจจะทำให้มีผลต่อสมดุลของ transcription/replication และกระบวนการ budding รวมทั้งกระบวนการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune evasive strategy)

QS-05 strain



QS05-BHK-P7 strain



รูปที่ 1 Immunofluorescence of BHK cells infected with QS-05 and QS05-BHK-P7 viruses

ตารางที่ 1 Median Lethal Dose (LD50)

Rabies strain	Intramuscular	Intra-cerebral
QS-05	No death	10 ^{-2.5}
QS-BHK-P7	10 ^{-0.83}	10 ^{-3.83}

Six week-old female mice were intramuscularly or intracerebrally inoculated with 30% brain suspension (undiluted – 10⁻⁴ dilution)

เนื่องจากเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ได้มี phenotype ที่แตกต่างจาก QS-05 ใน passage แรก ผู้วิจัยจึงทำการตรวจสอบทางพันธุกรรมของ QS-05 และ QS05-BHK-P7 โดยการทำการ whole genome sequence ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าทั้งสอง strains พบว่ามีความแตกต่างของลำดับเบส 5 ตำแหน่ง และระดับ amino acid 3 ตำแหน่ง ความแตกต่างของของ virulence ของทั้งสอง strains ควรจะเกิดจาก point mutation ที่ตำแหน่ง 7th poly adenylation sequence ของ intergenic region ระหว่าง phosphoprotein และ matrix protein gene ซึ่งจะมีผลต่อการ budding ของเชื้อไวรัสเนื่องจากอาจมีปริมาณของ matrix protein ลดลง ข้อสันนิษฐานนี้ได้มีการศึกษานับสนุนในกรณีของ vesicular stomatitis virus ที่พบว่า IGR มีส่วนสำคัญในการแสดงออกของโปรตีนของเชื้อไวรัสและได้ส่งผลกระทบต่อ virulence ของเชื้อไวรัส[1,2] ในส่วน mutation ที่ตำแหน่งอื่นๆไม่น่าจะอธิบายได้ เนื่องจากมีการศึกษาก่อนหน้าแล้วว่า S23R substitution ใน glycoprotein gene ของ QS05-BHK-P7 strain ตรงกับงานวิจัยของ Dr.Morimoto [3] ก่อนหน้านั้นในการทำ BHK-21 cells adaptation ของ CVS และพบตำแหน่ง mutation ที่ตำแหน่งนี้ซึ่งเป็น non-neuronal adaptation marker และ mutation อีกตำแหน่งที่พบใน ectodomain ของ glycoprotein gene นั้นไม่เคยมีการรายงานมาก่อนถึงความสำคัญรวมทั้งตำแหน่งดังกล่าวไม่อยู่ใน cytoplasmic domain ที่ส่งผลต่อ apoptosis mechanism ของ infected host cells และส่งผลถึงความสามารถในการกระจายตัว (cell spread) ในระบบประสาทและ virulence ของเชื้อไวรัส[4]จากการศึกษาโดยการแทนที่ polymerase (L) gene ของ pathogenic strain ด้วย vaccine strain พบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อ neurovirulence และ mortality rate ในสัตว์ทดลอง [5] นอกจากนี้เมื่อทำการ passage เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า SAD-B19 strain ในสุนัขจึงจอก 4 ครั้ง พบ amino acid substitution เพียงตำแหน่งเดียวใน L gene ซึ่งก็ไม่ส่งผลการเปลี่ยนแปลง virulence ของเชื้อไวรัสแต่อย่างใด [6] ดังนั้น mutation ที่ตำแหน่ง I1711V ใน L gene จึงไม่ควรส่งผลถึงเปลี่ยนแปลงในการเพิ่มขึ้นของ virulence ใน QS05-BHK-P7 strain

ด้วยเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงทำการสร้าง reverse genetics rabies virus จากเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05 strain ควบคู่ไปกับ QS05-BHK-P7 strain

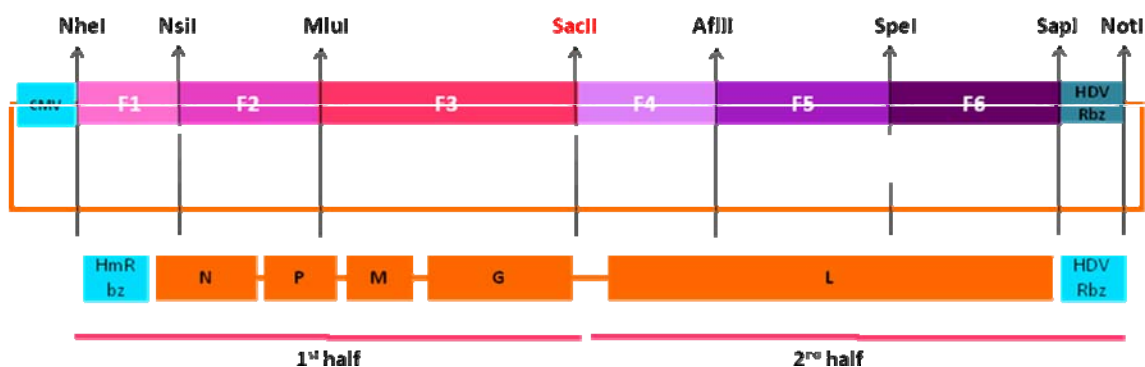
1. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05 strain ที่มีและไม่มี ferritin heavy chain แทนที่ pseudogene region
2. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05-BHK-P7 strain ที่มีและไม่มี ferritin heavy chain แทนที่ pseudogene region

3. ทำการ recovery recombinant virus ใน baby hamster kidney (BHK-21) cells ที่ stably expressing T7 RNA polymerase

ผลที่ได้รับ

ขั้นตอนการสร้างและ recovery recombinant virus ได้รับความช่วยเหลือจาก Oita University ภายใต้การควบคุมของ Professor Akira Nishizono และ Dr. Kentaro Yamada ประเทศญี่ปุ่นให้นางสาวพัชรมน วิโรจนภิมย์เดินทางไปทำการทดลองเป็นระยะเวลา 6 เดือนตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน 2553 ถึงเดือน พฤษภาคม 2554 ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการได้รับทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก

1. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05 strain (pCI-QS05) (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดง Full-length cDNA clone construction ของ QS-05 strain

- สามารถสร้าง pCI-QS05 ได้เป็นผลสำเร็จ

โดยทุก recombinant virus ที่ได้นั้นจะมี unique restriction endonuclease site คือ SacII ซึ่งไม่พบใน parental QS05 หรือ QS05-BHK-P7 sequence เพื่อสามารถใช้เป็นการตรวจสอบได้ว่า recovered virus นั้นเป็น recombinant virus ที่สร้างขึ้นมาจริง

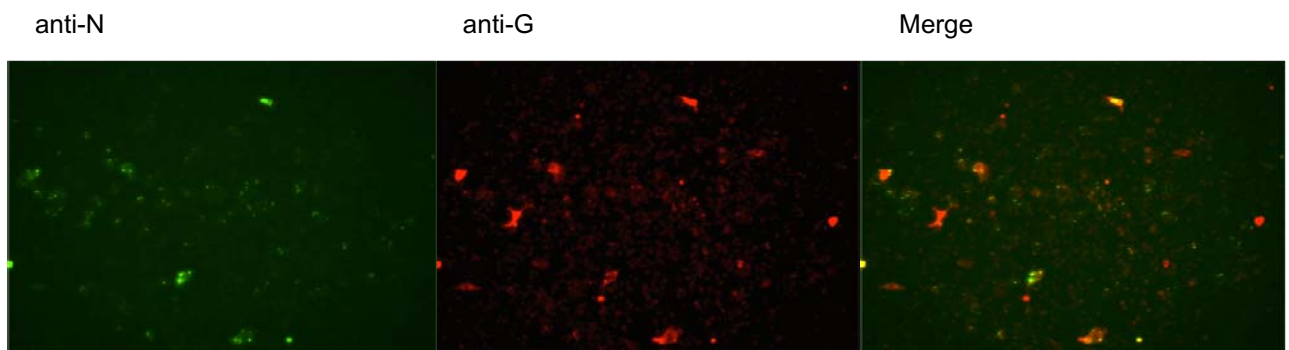
2. ทำการ recovery recombinant virus ใน baby hamster kidney (BHK-21) cells ที่ stably expressing T7 RNA polymerase
 - a. ทำการ recovery recombinant QS05 จาก pCI-QS05 plasmid โดยใช้ helper plasmids 3 genes ภายใต้ T7 promoter คือ Nucleoprotein, Phosphoprotein และ RNA-dependent RNA polymerase (สร้างมาจากเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า RC-HL strain) ใน BHK/T7-9 cells (Baby Hamster Kidney cells ที่ stably expressing T7 RNA polymerase) จากนั้น 48 ชั่วโมงจึงทำการ co-culture กับ neuroblastoma (NA) cells แล้ว incubate 4 วันจึงทำการเก็บ supernatant ที่ได้ไป infect NA cells จากนั้น 9 วันจึง

ย้อมด้วย FITC-antibody ต่อ nucleoprotein เพื่อดู infected cells

พบว่าไม่มีการติดสีของ cell แสดงว่าไม่มี recovered QS05 virus ใน supernatant

- b. ทำการ recovery recombinant QS05 จาก pCI-QS05 plasmid อีกครั้งโดยใช้ helper plasmids 4 genes โดยเพิ่ม glycoprotein helper plasmid ใน BHK/T7-9 cells จากนั้น 24 ชั่วโมงจึงทำการ co-culture กับ neuroblastoma (NA) cells แล้ว incubate 4 วัน จากนั้นทำการ

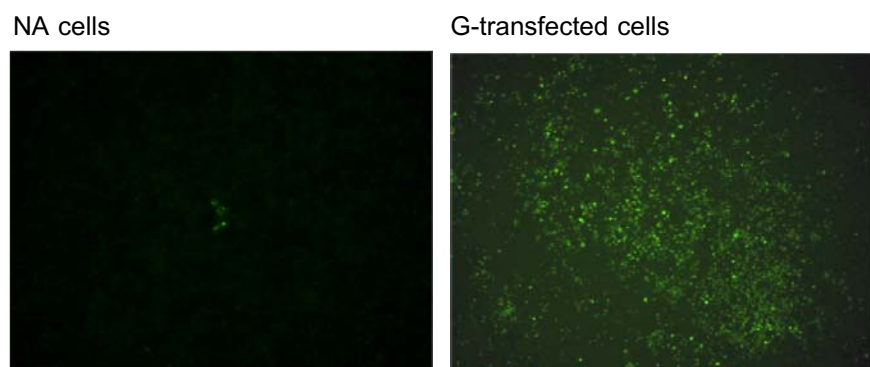
- i. ย้อม transfected cells ด้วย FITC-anti-N และ anti-G



รูปที่ 3 Immunofluorescence of QS-05 transfected cells

พบว่า transfected cells มีการติดสีของทั้ง anti-N และ anti-G ซึ่งทั้งสองโปรตีนนั้นมีการ express ภายในเซลล์เดียวกัน แสดงว่าน่าจะมี recovered virus เกิดขึ้น

- ii. เก็บ supernatant ที่ได้ไป infect NA cells และ NA cells ที่ถูก transfect ด้วย glycoprotein helper plasmid ล่วงหน้าหนึ่งวัน (G-transfected NA cells) จากนั้น 6 วันจึงย้อมด้วย FITC-anti-N เพื่อดู infected cells



รูปที่ 4 Immunofluorescence of NA cells infected with recovered QS05 virus

พบว่าไม่มีการติดสีของ infected NA cell ในขณะที่พบการกระจายตัวของ nucleoprotein ใน G-transfected cells เป็นจำนวนมาก แสดงว่า recovered QS05 virus ต้องใช้ glycoprotein

supplement จากภายนอกเป็นตัวช่วยในการเพิ่มปริมาณและแพร่กระจายของเชื้อไวรัส แต่ถึงกระนั้น ยังคงพบเป็นแค่ single-cell infection ไม่พบเป็น foci

จากการทดลองข้างต้นพบว่าไม่มีการกระจายตัวของ recovered QS05 virus ถ้าไม่ได้รับ glycoprotein เพิ่มจาก RC-HL strain ซึ่งเป็น well-adapted strain เพื่อช่วยในการแพร่กระจายของ เชื้อไวรัส จึงได้ทำการ sequencing glycoprotein gene อีกครั้ง พบว่ามี deletion ที่ตำแหน่ง 3479 ซึ่ง อยู่ upstream, ของ G-ORF (glycoprotein open reading frame) และการเจริญเติบโตของ plasmid นี้ก็ต่ำมาก เมื่อพยายามสร้าง full-length cDNA clone ใหม่ก็ยังประสบปัญหาแบบเดียวกันอีกทุกครั้ง แม้จะได้ทำการเปลี่ยน strain ของ E.coli และแก้ไขโดยการ insertion ที่ตำแหน่ง 3479 ด้วยวิธี site-directed mutagenesis แล้วก็ตาม (ทำการทดสอบประมาณ 100 clones) มีเพียงหนึ่ง clone ที่ไม่มี deletion ที่ตำแหน่งนี้แต่พบ insertion ที่ตำแหน่ง 3284 แทนที่ จึงทำให้ผู้วิจัยคาดว่าน่าจะเกิดจาก toxic sequence ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของ plasmid ใน E.coli

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าการสร้าง recombinant virus ของ เชื้อ Japanese encephalitis virus ก็ประสบปัญหาคล้ายกันคือพบ deletion ในตำแหน่งของโปรตีนที่ใช้ในการ แพร่กระจายของเชื้อซึ่งเกิดจากการมี bacterial-like promoter sequence ใน gene นั้น

ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการแก้ไขโดยการเพิ่ม silent mutation เข้าไปยังส่วน intergenic region ระหว่าง matrix และ glycoprotein gene (M-G/Asel) ซึ่งลำดับเบสที่ได้ใหม่นั้นจะมี Asel restriction endonuclease site ใหม่เพิ่มเข้าไปด้วยทำให้เกิดเป็น stop codon ของ toxic sequence ดังกล่าว

3. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05 strain (pCI-QS05(M-G/Asel))

QS05 3211 CATCAAACCGCTGCATTTTA 3230

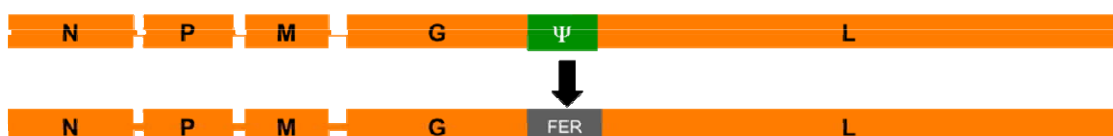
T -- T

ATT AAT (Asel)

รูปที่ 5 แสดง point mutation ที่ตำแหน่ง intergenic region ระหว่าง matrix และ glycoprotein

- สามารถสร้าง pCI-QS05(M-G/Asel) ได้เป็นผลสำเร็จ

4. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05 strain ที่มี ferritin heavy chain แทนที่ pseudogene region (pCI-QS05/hFER(M-G/Asel))



รูปที่ 6 แสดง Full-length cDNA clone construction ของ QS-05 strain ที่มี ferritin heavy chain

- สามารถสร้าง pCI-QS05/hFER(M-G/Asel) ได้เป็นผลสำเร็จ

นอกจากนี้ทางผู้วิจัยได้ทำการสร้าง recombinant virus จากเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS05-BHK-P7 strain เพิ่มเติมจากที่ได้วางแผนไว้ เนื่องจากมีความรุนแรงรวมทั้งการแพร่กระจายของเชื้อได้ดีกว่า QS05 strain ซึ่งเมื่อทำการสร้างเสร็จแล้วจะทำให้สามารถทดสอบได้ว่าลำดับเบสที่แตกต่างกันตำแหน่งใดที่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความรุนแรงของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้

5. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05-BHK-P7 strain (pCI-P7(M-G/Asel))

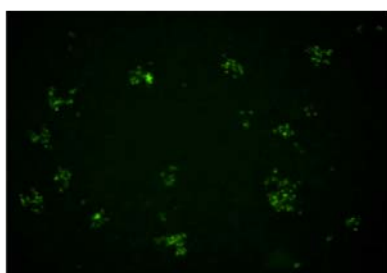
- สามารถสร้าง pCI-P7(M-G/Asel) ได้เป็นผลสำเร็จ

6. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05-BHK-P7 strain ที่มี ferritin heavy chain แทนที่ pseudogene region (pCI-P7/hFER(M-G/Asel))

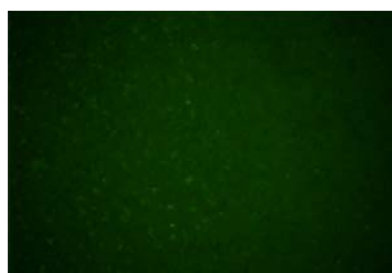
- สามารถสร้าง pCI-P7/hFER(M-G/Asel) ได้เป็นผลสำเร็จ

7. ทำการ recovery recombinant virus ใน baby hamster kidney (BHK-21) cells ที่ stably expressing T7 RNA polymerase

- a. ทำการ recovery recombinant QS05 ที่มี insertion ที่ตำแหน่ง 3284 จาก pCI-QS05+3284A plasmid โดยใช้ helper plasmids 4 genes (N, P, G และ L) ใน BHK/T7-9 cells แล้ว incubate 4 วัน จากนั้นทำการเก็บ supernatant ที่ได้ไป infect NA cells แล้ว incubate 3 วันจึงย้อมด้วย FITC-anti-N เพื่อดู infected cells



anti-N



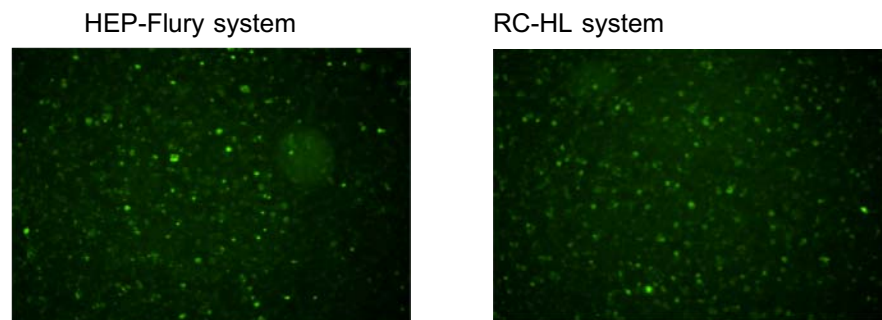
mock control

รูปที่ 7 Immunofluorescence of NA cells infected with recovered QS05+3284A virus

พบว่าการติดสีของ nucleoprotein และมีการเกิด foci ขึ้นซึ่งแสดงถึงการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไปยังเซลล์ข้างเคียงได้

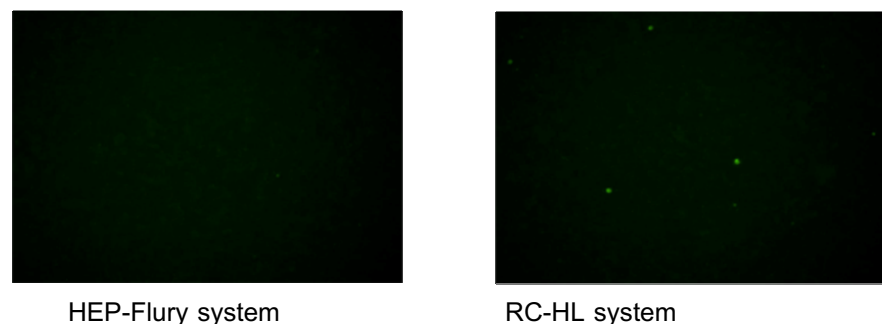
จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า full-length cDNA clone ที่ได้นั้นสามารถนำมาใช้ในการ recovery virus ได้ แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องใช้ T7 promoter และ BHK/T7-9 cells ในการ recovery ซึ่งระบบนี้จะไม่สามารถนำกลับมาใช้ต่อในประเทศไทยได้เนื่องจากปัญหาเรื่อง material transfer จึงได้พยายามทำการ recovery ภายใต้ CMV promoter ต่อไป

- b. ทำการ recovery recombinant QS05 ที่มี insertion ที่ตำแหน่ง 3284 จาก pCI-QS05+3284A plasmid โดยใช้ helper plasmids 3 genes (N, P และ L) ซึ่งมาจาก HEP-Flury strain และ RC-HL strain โดยทั้งสองระบบอยู่ภายใต้ CMV promoter ใน NA cells แล้ว incubate 4 วัน จากนั้น
- i. ย้อม transfected cells ด้วย anti-G



รูปที่ 8 Immunofluorescence of transfected cells

- ii. ทำการเก็บ supernatant ที่ได้ไป infect NA cells แล้ว incubate 3 วันจึงย้อมด้วย FITC-anti-N เพื่อดู infected cells



รูปที่ 9 Immunofluorescence of NA cells infected with recovered QS05 virus

ไม่พบการติดสีของ nucleoprotein ใน infected NA cells

การติดสีของ glycoprotein ใน transfected cells นั้นอาจเกิดจาก full-length cDNA clone ที่ใส่เข้าไป

8. ข้อจำกัดในการดำเนินงานของผู้วิจัยในการสร้าง recombinant rabies virus
- a. การสร้าง pUC-HDVRbz ไม่สามารถสร้าง plasmid ที่มี NheI restriction endonuclease site ได้ตามที่ออกแบบไว้ (ทำการตรวจสอบประมาณ 30 clones) จึงต้องเปลี่ยนมาใช้ restriction endonuclease อื่นแทน
- b. การสร้าง pT7-QS05-F3 ซึ่งตามแผนงานที่ออกแบบไว้ตั้งแต่ต้นนั้นจะทำการสร้าง pT7-

QS05-F3 แต่ภายหลังจากการ clone F3 fragment เข้าสู่ pT7Blue-T vector แล้วไม่พบ plasmid ที่มี F3 fragment ที่ต้องการได้ (ทำการตรวจสอบประมาณ 70 clones) จึงได้ทำการเปลี่ยนแผนงานโดยแบ่ง F3 fragment ออกเป็นสองส่วนคือ F3a และ F3b จากนั้นจึงทำการรวมทั้งสองส่วนเป็น pUC-QS05-F3ab ซึ่งในขั้นตอนนี้ก็ประสบปัญหาเช่นเดียวกัน (ทำการตรวจสอบประมาณ 70 clones) ซึ่งภายหลังจากทราบว่าเกิดจาก toxic sequence ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

- c. การ recovery ของ recombinant virus เนื่องจาก full-length cDNA clone (pCI-QS05) ที่ใช้ในการ recovery virus ในช่วงแรกไม่ประสบความสำเร็จหากไม่มีการใช้ glycoprotein helper plasmid ทำให้ผู้วิจัยต้องทำการสร้าง full-length cDNA clone ขึ้นใหม่

เนื่องจากผู้วิจัยไม่สามารถนำ BHK/T7 cells และ RC-HL helper plasmid ภายใต้ T7 promoter กลับมาใช้ในประเทศไทยได้ทำให้ยังต้องใช้เวลาในการสร้าง plasmid ที่มี T7 RNA polymerase gene และสร้าง BHK cells ที่ stably expressing T7 RNA polymerase เพื่อใช้ในการ recovery recombinant virus ต่อไป และภายหลังจากการที่สามารถ recovery virus ได้แล้วนั้นยังคงต้องทำการทดสอบ cell-to-cell spreading ในเซลล์และหาค่า mean lethal dose (LD50) เพื่อทดสอบคุณสมบัติของ recovered virus ในสัตว์ทดลองทั้งทาง intracerebral และ intramuscular เพื่อเปรียบเทียบ pathogenicity กับเชื้อไวรัสที่เป็น parental strain ต่อไป

สรุปโครงการและประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้

1. ถึงแม้โครงการจะไม่บรรลุถึงวัตถุประสงค์เดิมในการอธิบายปรากฏการณ์ของโรคพิษสุนัขบ้า โดยดูความสัมพันธ์ระหว่างอาการและตำแหน่งที่เชื้อไวรัสเคลื่อนตัวในระบบประสาท แต่ผลที่ได้จากการศึกษาได้นำไปสู่องค์ความรู้ใหม่
2. ได้องค์ความรู้ใหม่ซึ่งเป็นครั้งแรกเกี่ยวกับ non-neuronal adaptation ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าภายหลังจากการ passage ใน BHK-21 cells (non-neuronal cells) ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ virulence ของเชื้อไวรัส โดยอาจเป็นผลจาก point mutation ที่ตำแหน่ง 7th polyadenylation sequence ของ intergenic region ระหว่าง phosphoprotein และ matrix protein gene
3. ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการสร้าง reverse genetics ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ดังที่กล่าวไปข้างต้นทั้งนี้โดยที่ยังไม่มีคณะผู้วิจัยใดสามารถทำการ recovery street rabies virus strain ได้มาก่อน โดยที่ขณะนี้ผู้วิจัยอยู่ในขั้นตอนสุดท้ายของการ recovery ทั้ง street และ BHK-adapted strains ซึ่ง recombinant virus ที่ได้ทั้งสองตัวจะสามารถนำไปศึกษา pathophysiology ของโรคพิษสุนัขบ้าได้หลากหลายขึ้นไปอีก

เอกสารอ้างอิง

1. Stillman EA, Whitt MA. Mutational analyses of the intergenic dinucleotide and the transcriptional start sequence of vesicular stomatitis virus (VSV) define sequences required for efficient termination and initiation of VSV transcripts. J Virol. 1997

- Mar;71(3):2127-37.
2. Hwang LN, Englund N, Pattnaik AK. Polyadenylation of vesicular stomatitis virus mRNA dictates efficient transcription termination at the intercistronic gene junctions. *J Virol*. 1998 Mar;72(3):1805-13.
 3. Morimoto K et al. Rabies virus quasispecies: implications for pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17;95(6):3152-6.
 4. Préhaud C et al. Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. *Sci Signal*. 2010 Jan 19;3(105):ra5.
 5. Faber M et al. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 16;101(46):16328-32. Epub 2004 Nov 1.
 6. Beckert A et al. Genetic stability (in vivo) of the attenuated oral rabies virus vaccine SAD B19. *Microbiol Immunol*. 2009 Jan;53(1):16-21.

Output ผลงานตีพิมพ์

Phatthamon Virojanapirom, Pakamat Khawplod, Arthikaya Sawangwaree, Supaporn Wacharapluesadee, Thiravat Hemachudha, Kinjiro Morimoto and Akira Nishizono.

BHK-cell adapted canine rabies virus variant: mutation in intergenic phosphoprotein and matrix protein gene non-coding region may confer higher neurovirulence in adult mice. (submitted for publication) [เอกสารแนบ 1]

ภาคผนวก

1. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05 strain (pCI-QS05)
 - a. สร้าง plasmids ต่างๆ ดังนี้
 - i. pUC-QS05-F1 (containing Hammerhead Ribozyme)
 - ii. pT7-QS05-F2
 - iii. pT7-QS05-F3a
 - iv. pT7-QS05-F3b
 - v. pT7-QS05-F4
 - vi. pT7-QS05-F5
 - vii. pT7-QS05-F6
 - viii. pUC-HDVRbz
 - b. ขั้นตอนการสร้าง plasmids มีดังนี้
 - i. สกัด RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าด้วย High Pure Viral RNA Kit (Roche)
 - ii. First-strand RNA synthesis ด้วย SuperScript® Reverse Transcriptase (Invitrogen)
 - iii. Polymerase Chain Reaction ด้วย KOD-Plus DNA polymerase (TOYOBO)
 - iv. Agarose gel electrophoresis จากนั้นตัด fragment ที่ต้องการแล้วสกัดด้วย NucleoSpin®

Extract II Kit (MN)

- v. Agarose gel electrophoresis อีกครั้งเพื่อตรวจสอบขนาดของ fragment ที่ได้
- vi. Cloning PCR product ที่ได้ใส่ใน pT7Blue T-vector (Novagen) หรือ pUC-19 vector
 1. เติม overhang A ที่ปลายของ PCR product เนื่องจากเป็น blunt-end product ด้วย 10x A-attachment Mix (TOYOBO) 30 นาที 60°C
 2. ทำการ ligate digested fragment กับ vector ด้วย Mighty Mix Ligase (TaKaRa) 16°C 1-6 ชั่วโมง
 3. Transformation โดยใช้ competent cells *E.coli* strain DH5-alpha หรือ XL10-Gold จากนั้น incubate 37°C 12-16 ชั่วโมง
- vii. ทำการทดสอบหา plasmid ว่ามี fragment ที่ต้องการโดยการสกัดด้วย in-house miniprep (alkali-lysis method) จากนั้นทำการตรวจสอบด้วย restriction endonuclease digestion
- viii. สกัด plasmid ที่มี fragment ที่ต้องการด้วย E.Z.N.A. Plasmid Miniprep
- ix. ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วย sequencing
- x. ใช้โปรแกรม 4Peaks, ATSQ และ GentyX-Mac ในการวิเคราะห์ข้อมูล
- c. ตัดต่อ fragment ต่างๆเข้าด้วยกัน ดังนี้
 - i. First-half construction (pCI-QS05-NPMG) ประกอบด้วย pUC-QS05-F1, pT7-QS05-F2, pT7-QS05-F3a และ pT7-QS05-F3b
 1. สร้าง pUC-QS05-F3ab โดยการตัดต่อ F3a fragment จาก pT7-QS05-F3a และ F3b fragment จาก pT7-QS05-F3b แล้ว double insert ทั้งสอง fragments เข้าสู่ pUC19 vector
 2. สร้าง pUC-QS05-NPMG โดยการตัดต่อ F2 fragment จาก pT7-QS05-F2 และ F3ab fragment จาก pUC-QS05-F3ab แล้ว double insert ทั้งสอง fragments เข้าสู่ pUC-QS05-F1
 3. สร้าง pCI-QS05-NPMG โดยการตัดต่อ NPMG fragment จาก pUC-QS05-NPMG เข้าสู่ pCI vector ซึ่งเป็น expression vector
 - ii. Second-half construction (pUC-QS05-LRbz) ประกอบด้วย pT7-QS05-F4, pT7-QS05-F5, pT7-QS05-F6 และ pUC-HDVRbz
 1. สร้าง pUC-QS05-F6Rbz โดยการตัดต่อ F6 fragment จาก pT7-QS05-F6 เข้าสู่ pUC-HDVRbz
 2. สร้าง pUC-QS05-LRbz โดยการตัดต่อ F4 fragment จาก pT7-QS05-F4 และ F5 fragment จาก pUC-QS05-F5 แล้ว double insert ทั้งสอง fragments เข้าสู่ pUC-QS05-F6Rbz
 - iii. Full-length cDNA clone (pCI-QS05) ประกอบด้วย pCI-QS05-NPMG และ pUC-QS05-LRbz

สร้าง pCI-QS05 โดยการตัดต่อ LRbz fragment จาก pUC-QS05-LRbz เข้าสู่ pCI-QS05-NPMG
- d. ขั้นตอนการตัดต่อ fragment ต่างๆเข้าด้วยกัน
 - i. ตัดต่อ fragments ใส่ใน plasmid ที่ต้องการ
 1. Specific restriction endonuclease ย่อยส่วนปลายของ PCR product 3 ชั่วโมงที่

37°C

2. Agarose gel electrophoresis จากนั้นตัด fragment ที่ต้องการแล้วสกัดด้วย NucleoSpin[®] Extract II Kit (MN)
3. Agarose gel electrophoresis อีกครั้งเพื่อตรวจสอบขนาดของ fragment ที่ได้
4. ทำการ ligate digested fragment กับ vector ด้วย Mighty Mix Ligase (TaKaRa) 16°C 1-6 ชั่วโมง
5. Transformation โดยใช้ competent cells *E.coli* strain DH5-alpha หรือ XL10-Gold แล้ว incubate 37°C 12-16 ชั่วโมง
- ii. ทำการทดสอบหา plasmid ว่ามี fragment ที่ต้องการโดยการสกัดด้วย in-house miniprep (alkali-lysis method) จากนั้นทำการตรวจสอบด้วย restriction endonuclease digestion
- iii. สกัด plasmid ที่มี fragment ที่ต้องการด้วย E.Z.N.A. Plasmid Miniprep
- iv. ตรวจสอบความถูกต้องของ plasmid ว่ามี fragment ที่ถูกต้องอีกครั้งโดย restriction endonuclease digestion

โดยทุก recombinant virus ที่ได้นั้นจะมี unique restriction endonuclease site คือ SacII ซึ่งไม่พบใน parental QS05 หรือ QS05-BHK-P7 sequence เพื่อสามารถใช้เป็นการตรวจสอบได้ว่า recovered virus นั้นเป็น recombinant virus ที่สร้างขึ้นมาจริง

2. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05 strain (pCI-QS05(M-G/Asel))
 - a. สร้าง pT7-QS05-F3c มีขั้นตอนการสร้างเหมือนข้อ 1b.
 - b. สร้าง pT7-QS05-F3c(M-G/Asel) โดยทำการเปลี่ยนลำดับเบสใน M-G intergenic region ด้วย QuikChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้
 - i. ออกแบบ primer ที่มี mutation ที่ตำแหน่ง 3214C>T และ 3217A>T
 - ii. Polymerase Chain Reaction ด้วย Pfu Ultra HF DNA polymerase โดยใช้ pT7-QS05-F3c เป็น template
 - iii. DpnI digestion 37°C 1 ชั่วโมง
 - iv. Transformation โดยใช้ competent cells *E.coli* strain XL1-Blue จากนั้น incubate 37°C 12-16 ชั่วโมง
 - v. ทำการทดสอบหา plasmid ว่ามี fragment ที่ต้องการโดยการสกัดด้วย in-house miniprep (alkali-lysis method) จากนั้นทำการตรวจสอบด้วย restriction endonuclease digestion
 - vi. สกัด plasmid ที่มี fragment ที่ต้องการด้วย E.Z.N.A. Plasmid Miniprep
 - vii. ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วย sequencing
 - viii. ใช้โปรแกรม 4Peaks, ATSEQ และ GentyX-Mac ในการวิเคราะห์ข้อมูล
 - c. ตัดต่อ fragment ต่างๆเข้าด้วยกัน ดังนี้
 - i. First-half construction (pCI-QS05-NPMG(M-G/Asel))

สร้าง pCI-QS05-NPMG(M-G/Asel) โดยการตัดต่อ F3c(M-G/Asel) fragment จาก pT7-QS05-F3c(M-G/Asel) แทนที่ F3c fragment ของ pCI-QS05-NPMG

ii. Full-length cDNA clone (pCI-QS05(M-G/Asel))

สร้าง pCI-QS05(M-G/Asel) โดยการตัดต่อ LRbz fragment จาก pUC-QS05-LRbz เข้าสู่ pCI-QS05-NPMG(M-G/Asel)

3. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05 strain ที่มี ferritin heavy chain แทนที่ pseudogene region (pCI-QS05/hFER(M-G/Asel))

a. สร้าง plasmids ต่างๆ ดังนี้

i. pT7-QS05-F4deltapseudogene (without pseudogene sequence) มีขั้นตอนการสร้างเหมือนข้อ 1b.

ii. pT7-StopStart/hFER (containing transcription stop-start sequence และ ferritin heavy chain)

b. ขั้นตอนการสร้าง pT7-StopStart/hFER มีดังนี้

i. ทำการแยก peripheral mononuclear cells (PBMCs) จาก heparinized whole blood ด้วย LSM Lymphocyte Separation Medium

ii. สกัด RNA จาก PBMCs ด้วย TRIzol[®] Reagent (Invitrogen)

iii. First-strand RNA synthesis ด้วย SuperScript[®] Reverse Transcriptase (Invitrogen)

iv. Polymerase Chain Reaction ด้วย ExTaq[™] polymerase (TAKARA)

v. Agarose gel electrophoresis จากนั้นตัด fragment ที่ต้องการแล้วสกัดด้วย NucleoSpin[®] Extract II Kit (MN)

vi. Agarose gel electrophoresis อีกครั้งเพื่อตรวจสอบขนาดของ fragment ที่ได้

vii. Cloning PCR product ที่ได้ใส่ใน pT7Blue T-vector (Novagen)

viii. ทำการทดสอบหา plasmid ว่ามี fragment ที่ต้องการโดยการสกัดด้วย in-house miniprep (alkali-lysis method) จากนั้นทำการตรวจสอบด้วย restriction endonuclease digestion

ix. สกัด plasmid ที่มี fragment ที่ต้องการด้วย E.Z.N.A. Plasmid Miniprep

x. ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วย sequencing

xi. ใช้โปรแกรม 4Peaks, ATSQ และ GentyX-Mac ในการวิเคราะห์ข้อมูล

c. ตัดต่อ fragment ต่างๆเข้าด้วยกัน ดังนี้

i. Second-half construction (pUC-QS05-L/hFER) ประกอบด้วย pT7-QS05-F4deltapseudogene และ pT7-StopStart/hFER

สร้าง pUC-QS05-L/hFER โดยการตัดต่อ F4deltapseudogene fragment จาก pT7-QS05-F4deltapseudogene และ StopStart/hFER fragment จาก pT7-StopStart/hFER แล้ว double insert ทั้งสอง fragments แทนที่ F4 fragment ของ pUC-QS05-LRbz

ii. Full-length cDNA clone (pCI-QS05/hFER(M-G/Asel))

สร้าง pCI-QS05/hFER(M-G/Asel) โดยการตัดต่อ L/hFER fragment จาก pUC-QS05-L/hFER เข้าสู่ pCI-QS05-NPMG(M-G/Asel)

4. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05-BHK-P7 strain (pCI-P7(M-G/Asel))

a. สร้าง plasmids ต่างๆ ดังนี้

- i. pUC-P7-F3c มีขั้นตอนการสร้างเหมือนข้อ 1b.
 - ii. pUC-P7-F3c(M-G/Asel) มีขั้นตอนการสร้างเหมือนข้อ 2b. แต่ใช้ pUC-P7-F3c เป็น template
 - iii. pUC-P7-F6Rbz มีขั้นตอนการสร้างเหมือนข้อ 2b. แต่ใช้ primer ที่มี mutation ที่ตำแหน่ง 10537A>G และ pUC-QS05-F6Rbz เป็น template
 - b. ตัดต่อ fragment ต่างๆเข้าด้วยกัน ดังนี้
 - i. First-half construction (pCI-P7-NPMG(M-G/Asel))

สร้าง pCI-P7-NPMG(M-G/Asel) โดยการตัดต่อ F3c(M-G/Asel) fragment จาก pUC-P7-F3c(M-G/Asel) แทนที่ F3c fragment ของ pCI-QS05-NPMG
 - ii. Second-half construction (pUC-P7-LRbz)

สร้าง pUC-P7-LRbz โดยการตัดต่อ P7-F6Rbz fragment จาก pUC-P7-F6Rbz แทนที่ pUC-QS05-LRbz
 - iii. Full-length cDNA clone (pCI-P7(M-G/Asel))

สร้าง pCI-P7(M-G/Asel) โดยการตัดต่อ P7-LRbz fragment จาก pUC-P7-LRbz เข้าสู่ pCI-P7-NPMG(M-G/Asel)
5. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05-BHK-P7 strain ที่มี ferritin heavy chain แทนที่ pseudogene region (pCI-P7/hFER(M-G/Asel))
- a. ตัดต่อ fragment ต่างๆเข้าด้วยกัน ดังนี้
 - i. Second-half construction (pUC-P7-L/hFER)

สร้าง pUC-P7-LRbz โดยการตัดต่อ P7-F6Rbz fragment จาก pUC-P7-F6Rbz แทนที่ pUC-QS05-LRbz/hFER
 - ii. Full-length cDNA clone (pCI-P7/hFER(M-G/Asel))

สร้าง pCI-P7/hFER(M-G/Asel) โดยการตัดต่อ P7-L/hFER fragment จาก pUC-P7-L/hFER เข้าสู่ pCI-P7-NPMG(M-G/Asel)

โครงการที่ 2 Neuropathology of Inhibitory Neurons in Furious and Paralytic Rabies of canine origin

ผู้รับผิดชอบหลัก ศ.นพ.ชนพ ช่วงโชติ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาจำนวนของเซลล์ประสาทยับยั้งในสมองของสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งและอ่อนแรง ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยมีสมมุติฐานว่าอาจจะมีจำนวนลดลงในสมองสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่ง ทั้งนี้เนื่องจากพบว่าในผู้ป่วยจิตเภท (Schizophrenia) มีเซลล์ยับยั้งลดลงในสมองส่วน pre frontal และในผู้ป่วยโรคลมชักเช่นกันที่มีจำนวนลดลงในสมองส่วน temporal

การดำเนินงาน

ศึกษาเนื้อเยื่อสมองสุนัขบ้าจำนวน 15 ตัวอย่าง แบ่งเป็นชนิดคลุ้มคลั่ง 8 ตัวอย่าง และอ่อนแรง 7 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างทำการศึกษาในบริเวณ neocortex (frontal, parietal, temporal และ occipital lobes) caudate, thalamus และ hippocampus ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยใช้ antibody ต่อ calcium-binding proteins ชนิด parvalbumin ในการจำแนกเซลล์ประสาทยับยั้ง

ผลที่ได้รับ

พบความแตกต่างในจำนวนของเซลล์ประสาทยับยั้งในสมองเฉพาะที่ตำแหน่ง frontal lobe โดยกลับมีจำนวนมากกว่า ในสมองสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่ง แต่ไม่พบความแตกต่างที่สมองตำแหน่งอื่น ๆ

สรุปและวิเคราะห์ผล

จำนวนเซลล์ประสาทยับยั้ง ในสมองสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าทั้งชนิดคลุ้มคลั่งและอ่อนแรง มีความแตกต่างกันที่ตำแหน่ง frontal lobe ของสมอง แต่ไม่พบความแตกต่างที่ตำแหน่งอื่นของสมอง จึงไม่น่าจะเป็นสาเหตุ ที่ทำให้เกิดความแตกต่างในอาการแสดงของสุนัขบ้าทั้งสองแบบ

Output ผลงานตีพิมพ์

Ruangvejvorachai P, Nopvichai C, Tepsumethanon V, Wacharapluesadee S, Hemachudha T, Shuangshoti S. Role of inhibitory neurons in the pathogenesis of paralytic and furious rabies in canine. [เอกสารแนบ 2]

หมายเหตุ ขณะนี้กำลังย้อมพิเศษแบบ double-labeling staining โดยใช้ antibody ชนิด parvalbumin และ rabies viral antigen เพื่อทดสอบว่า เซลล์ประสาทยับยั้งที่พบ มีอัตราการติดเชื้อพิษสุนัขบ้าแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อสรุปผลสุดท้าย และส่งตีพิมพ์ในวารสาร

โครงการที่ 3 การศึกษาโปรตีนในสมอง ก้านสมอง และไขสันหลังของสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอาการดุร้ายและแบบอัมพาต

ผู้รับผิดชอบโครงการ

1 ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

2 น.ส.ณัฐภาณี วัฒนศิริเดชชัย

นักศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาชีวเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในสมอง ก้านสมอง และไขสันหลัง ของสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอาการดุร้าย แบบอัมพาตและสุนัขที่ไม่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า

การดำเนินงาน

ผลจากการศึกษาการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะในไขสันหลังของสุนัขที่ไม่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า (N) กับในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบ Furious (F) และแบบ paralytic (D) โดยวิธี 2D PAGE

(งบประมาณจากทุนวิจัยโรคพิษสุนัขบ้า จาก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)

จากการวิเคราะห์โปรตีนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบ Furious (F) และแบบ paralytic หรือ dumb (D) เปรียบเทียบกับสุนัขที่ไม่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า (N) ในแต่ละกลุ่ม ได้ข้อมูลของคุณสมบัติของโปรตีนแต่ละชนิด แล้วนำมาจัดกลุ่มแยกตามชนิดและหน้าที่ของโปรตีนนั้นๆ ได้ 12 กลุ่ม ดังนี้ Antioxidant proteins, Apoptosis-related proteins, Cytoskeleton proteins, Heat shock proteins and chaperones, Immune response-related proteins, Intermediary metabolism enzymes, Neuron-specific proteins, RNA binding proteins and proteins serving in transcription and splicing and elongation, Ubiquitination and proteasome-related proteins, Vesicular transport proteins, Hypothetical protein และ Unidentified

ตัวอย่าง

1) สมองและไขสันหลังของสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า

- 1.1 สุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบดุร้ายที่เสียชีวิตเร็ว (FE) (n = 3)
- 1.2 สุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอัมพาตที่เสียชีวิตเร็ว (DE) (n = 3)
- 1.3 สุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบดุร้ายที่เสียชีวิตช้า (FL) (n = 3)
- 1.4 สุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอัมพาตที่เสียชีวิตช้า (DL) (n = 3)

2) สมอและไซสัณหลังของสุนัขที่ไม่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า (N) (n = 6)

วิธีเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างสมอและไซสัณหลัง (ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร) จากสุนัขที่เสียชีวิตตามธรรมชาติ ใส่ในกล่องปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำมาศึกษาทดลอง

การทดลองทางห้องปฏิบัติการ

1. การสกัดแยกโปรตีนจากตัวอย่างที่เป็นสมอ ก้านสมอ และไซสัณหลังของสุนัขที่ไม่ได้ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้า สุนัขที่ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าทั้งในแบบดุร้ายและแบบอัมพาต

1) นำตัวอย่างมาสกัดแยกโปรตีนโดยบดให้เป็นผงแล้วใส่ Lysis buffer และ vortex ให้ละลาย จากนั้นนำไปปั่นเอาส่วนน้ำใสมาใช้

2) ตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธี Acetone Chloroform Precipitation

3) วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry protein assay โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2. การแยกโปรตีนจากตัวอย่าง ด้วยวิธี Off-line LC-MS/MS

1) แยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้กระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE

2) ย้อมโปรตีนในแผ่นเจลด้วยเทคนิค silver staining ตัดก้อนเจลตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล แล้วย่อยโปรตีนในก้อนเจลด้วยเอนไซม์ทริปซิน โดยเทคนิค In-gel digestion

3) วิเคราะห์เปปไทด์ด้วย LC-MS/MS

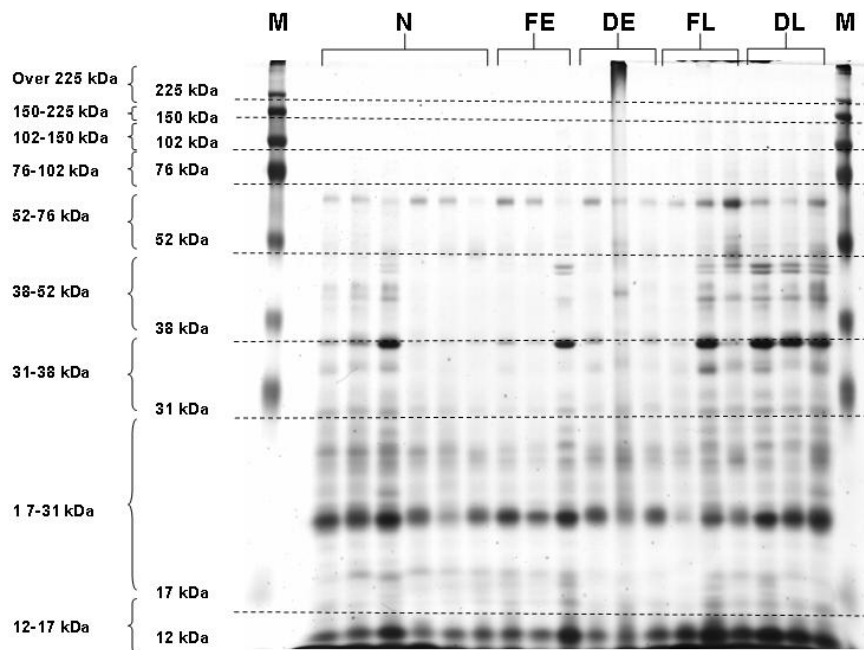
Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) เป็นเทคนิคการแยกสารและตรวจวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณสำหรับตัวอย่างที่เป็นของเหลว

หลักการ คือ ตัวอย่างสายเปปไทด์จะถูกปั๊มเข้าสู่คอลัมน์ซึ่งภายในบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็ก การแยกเกิดขึ้นในคอลัมน์ เนื่องจากเปปไทด์แต่ละตัวเคลื่อนผ่านอนุภาคของแข็งด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน หลังจากนั้นเปปไทด์แต่ละสายจะถูกวิเคราะห์มวลด้วย MS สำหรับสายเปปไทด์ที่มีปริมาณมากพอจะถูกทำให้แตกแบบสุ่ม และ software จะนำมาวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์ด้วยเทคนิค De Novo sequencing

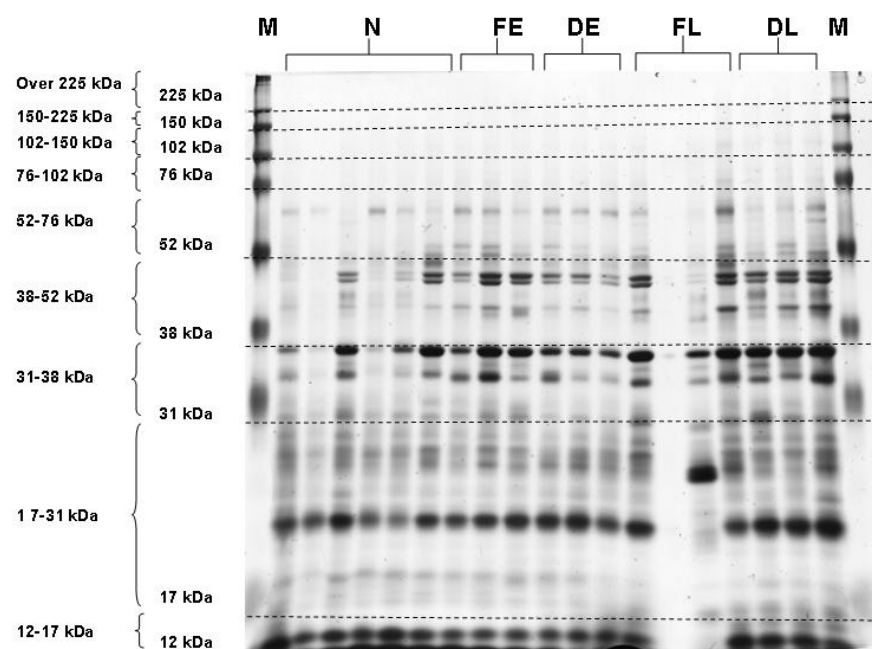
4) วิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT

ผลที่ได้รับ

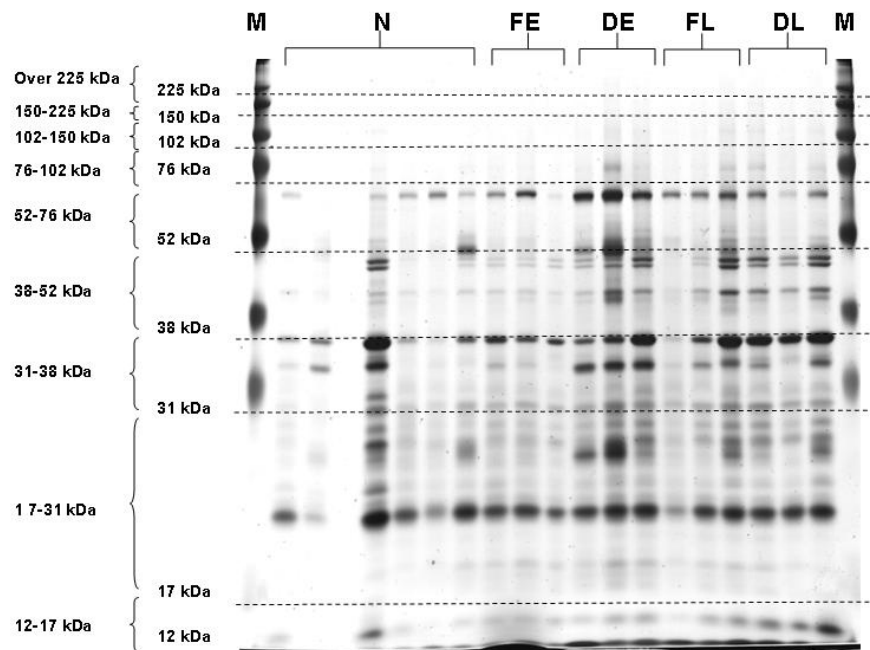
1. ผลการวิเคราะห์การแยกโปรตีนจากตัวอย่างด้วยวิธี SDS-PAGE ดังรูปที่ 1-4 พบว่าสามารถพัฒนาเทคนิคในขั้นการแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลได้โปรตีนในแผ่นเจลที่ย้อมด้วยเทคนิค silver staining และสามารถตัดก้อนเจลตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล เพื่อย่อยโปรตีนในก้อนเจลด้วยเอนไซม์ทริปซิน ให้ได้โปรตีนเพื่อนำมาศึกษาวิเคราะห์เปปไทด์ด้วย วิธี LC-MS/MS ต่อไป



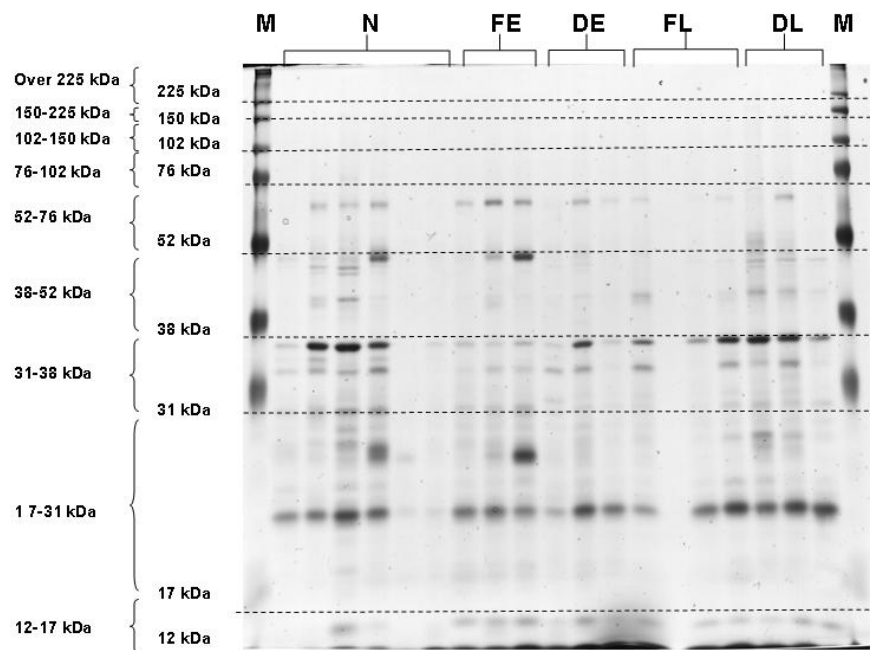
รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างเจลที่แยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในตัวอย่างสมองส่วน Hippocampus



รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างเจลที่แยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในตัวอย่างสมองส่วน Parietal



รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างเจลที่แยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในตัวอย่างสมองส่วน Brainstem



รูปที่ 4 แสดงตัวอย่างเจลที่แยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในตัวอย่างไขสันหลัง

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของโปรตีนจำเพาะในสมองและไขสันหลังที่แตกต่างกันที่ได้คัดเลือกของสุนัขที่ไม่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าเปรียบเทียบกับในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบดุร้ายและแบบอัมพาตที่เสียชีวิตเร็วและช้า

ID Details	Protein	Region	N	FE	DE	FL	DL
28S ribosomal protein S14, mitochondrial	gi 157787000	Hippocampus	↑	↑↑	↑↑	0	↑
aczonin	gi 6433936	Hippocampus	↑	↑↑	0	0	↑
axin	gi 2252820	Brainstem	↑	0	↑↑	↑	↑↑
brain alpha-tropomyosin (TMBr-1)	gi 207355	Spinal cord	↑	↑	↑↑	↑	↑
brain alpha-tropomyosin (TMBr-3)	gi 207359	Spinal cord	↑	↑	↑↑	0	↑
Brca1	gi 6694636	Spinal cord	↑	↑	0	0	0
breast and ovarian cancer susceptibility gene	gi 157460971	Brainstem	↑	0	↑↑	↑	↑
CD2 molecule	gi 56204193	Hippocampus	0	↑↑	↑	↑↑	0
Chain A, Crystal Structure Of Human Dihydropyrimidinease-Like 2	gi 109158020	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
Chain A, Crystal Structure Of Human Sperm-Specific Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (Gapds) Complex With Nad And Phosphate	gi 238537990	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
Chain A, Low Resolution, Molecular Envelope Structure Of Type I Collagen In Situ Determined By Fiber Diffraction. Single Type I Collagen Molecule, Rigid Body Refinement	gi 254221095	Brainstem	↑	↑	↑	↑	↑
Chain A, Structure Of Pitp-Alpha Complexed To Phosphatidylinositol	gi 47169316	Hippocampus	↑	↑	↑	↑	0
Chain A, Structure Of Tropomyosin's Mid-Region: Bending And Binding Sites For Actin	gi 85544236	Spinal cord	↑	↑	↑↑	0	↑
Chain A, The Structure Of Collagen Type I. Single Type I Collagen Molecule	gi 109156929	Brainstem	↑	↑	↑	0	↑
chondroitin sulfate proteoglycan 3	gi 56122258	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
collapsin response mediator protein	gi 1582083	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
collapsin response mediator protein 1	gi 14189905	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
CSPG3 variant protein	gi 68533063	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
cyclin A2	gi 14210077	Brainstem	↑	0	0	0	↑
cytokeratin 9	gi 435476	Brainstem	↑↑	0	↑	0	↑
cytokeratin KRT2-6HF	gi 13272554	Brainstem	↑↑	0	↑	0	↑↑
cytokeratin type II	gi 3901030	Brainstem	↑↑	0	↑	↑	↑
DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide	gi 157272171	Brainstem	0	↑	↑↑	↑	0
dihydropyrimidinase-like 2 long form	gi 161727458	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
dihydropyrimidinase-like 2 short form	gi 161727456	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
dihydropyrimidinase-like 2 variant	gi 62898846	Parietal	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	0
dihydropyrimidinase-like 2 variant	gi 62087970	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
dihydropyrimidinase-related protein 1 isoform 1	gi 62422571	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
dihydropyrimidinase-related protein 1 isoform 2	gi 4503051	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
dihydropyrimidinase-related protein 2	gi 4503377	Parietal	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
dihydropyrimidinase-related protein 2	gi 4503377	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
DKFZP459J041 protein	gi 207080280	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
E3 ubiquitin-protein ligase RNF123	gi 300796384	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
E3 ubiquitin-protein ligase RNF19A	gi 194474032	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
epidermal keratin subunit II	gi 293686	Brainstem	↑↑	0	↑	0	↑
FLIP	gi 148913064	Hippocampus	↑↑	↑	0	0	↑↑

ID Details	Protein	Region	N	FE	DE	FL	DL
GAPDH-2 like	gi 2282013	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble	gi 148709958	Parietal	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
glutamic-oxaloacetic transaminase 1, aspartate aminotransferase 1, cytosolic	gi 84626479	Parietal	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	gi 110626121	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
heat shock protein	gi 840652	Brainstem	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑
heat shock protein 105 kDa	gi 114145505	Brainstem	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑
heat shock protein 110, isoform CRA_a	gi 148673922	Brainstem	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑
HLA-B associated transcript 2	gi 147832430	Brainstem	↑↑	0	0	↑	0
HSD-35	gi 34559254	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
HSPC192	gi 7106774	Parietal	↑	↑	↑	0	0
Ig heavy chain variable region, VH3 family	gi 33319536	Hippocampus	0	↑↑	↑↑	0	↑
IgK	gi 196490	Parietal	↑↑	↑↑	↑↑	↑	0
immunoglobulin lambda light chain variable region	gi 4324228	Brainstem	↑	↑	↑	↑↑	↑
keratin 1	gi 11935049	Brainstem	↑↑	↑	0	0	↑
keratin 17, isoform CRA_c	gi 119581156	Hippocampus	↑	0	↑	↑↑	↑
Keratin 6A	gi 46812692	Hippocampus	↑	↑	↑	0	0
keratin 9 (epidermolytic palmoplantar keratoderma)	gi 119581148	Brainstem	↑↑	0	↑	↑	↑
keratin type II	gi 914833	Brainstem	↑↑	0	↑	0	↑
keratin, type I cytoskeletal 10	gi 296476308	Spinal cord	↑	0	↑	0	0
keratin, type I cytoskeletal 17	gi 4557701	Hippocampus	↑	0	↑	↑↑	↑
keratin, type II cytoskeletal 1	gi 119395750	Brainstem	↑	↑	0	↑	↑
keratin, type II cytoskeletal 5	gi 50233797	Brainstem	↑↑	0	↑	↑	↑↑
keratin, type II cytoskeletal 6A	gi 5031839	Hippocampus	↑	↑	↑	0	0
keratin, type II cytoskeletal 6A	gi 155369696	Hippocampus	↑	↑	↑↑	↑↑	0
keratin, type II cytoskeletal 6C	gi 155969697	Brainstem	↑↑	0	↑	↑	↑
keratin, type II cytoskeletal 7	gi 114051856	Brainstem	↑↑	0	↑	↑	↑↑
keratin, type II cytoskeletal 75	gi 29789317	Brainstem	↑↑	0	↑	↑	↑↑
keratin, type II cytoskeletal cochlear	gi 114145409	Brainstem	↑↑	0	↑	↑	↑↑
kinesin-associated protein 3	gi 197097982	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
La ribonucleoprotein domain family, member 5	gi 55959410	Hippocampus	↑	↑↑	↑↑	0	↑↑
la-related protein 4B	gi 57634536	Hippocampus	↑	↑↑	↑↑	0	↑↑
metaphase chromosomal protein	gi 1154803	Parietal	0	↑↑	0	↑	↑
msh homeobox 1-like protein	gi 71370485	Brainstem	↑	↑	0	0	0
mucin-16	gi 83367077	Brainstem	0	↑	↑	0	0
mutant keratin 9	gi 1890020	Brainstem	↑↑	0	↑	↑	↑
NADH dehydrogenase subunit 4	gi 13562136	Brainstem	↑	0	↑	0	↑
neurocan core protein precursor	gi 118600983	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1	gi 61554433	Brainstem	↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑
Padi2 protein	gi 126153395	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
peptidyl arginine deiminase, type II	gi 148681383	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PGCN_HUMAN	gi 2627295	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
phosphate carrier protein, mitochondrial isoform a precursor	gi 6031192	Hippocampus	↑	↑↑	0	0	↑
phosphate carrier protein, mitochondrial isoform b precursor	gi 4505775	Hippocampus	↑	↑↑	0	↑↑	↑
pol protein	gi 21913262	Parietal	↑	↑	0	↑	0
PRAME family member 16	gi 113865933	Brainstem	↑	↑	0	↑	↑

ID Details	Protein	Region	N	FE	DE	FL	DL
PRAME family member 17	gi 157426839	Brainstem	↑	↑	0	↑	↑
PREDICTED: abhydrolase domain containing 10	gi 291400705	Brainstem	↑	↑	↑	↑	↑↑
PREDICTED: acyl-CoA-binding domain-containing protein 5-like	gi 301784310	Brainstem	↑	↑	↑↑	↑	↑
PREDICTED: ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 6	gi 114581255	Brainstem	↑	↑	↑	0	↑↑
PREDICTED: BTB (POZ) domain containing 8	gi 194211113	Parietal	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46	gi 114601933	Brainstem	↑↑	↑	↑	0	↑
PREDICTED: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	gi 194224905	Brainstem	0	↑	↑↑	0	0
PREDICTED: DNA repair protein complementing XP-C cells isoform 1	gi 297670010	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: DNA repair protein complementing XP-C cells isoform 2	gi 297670012	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: dynein heavy chain 7, axonemal	gi 293361672	Parietal	↑	↑↑	0	↑	↑↑
PREDICTED: dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1 isoform 1	gi 291383983	Brainstem	↑	↑	0	0	↑
PREDICTED: dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1 isoform 2	gi 291383985	Brainstem	↑	↑	0	0	↑
PREDICTED: erythroblast membrane-associated protein (Scianna blood group)-like	gi 194665871	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: intercellular adhesion molecule 5	gi 114675337	Spinal cord	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: KCTD2 protein-like	gi 293340576	Brainstem	↑↑	0	↑↑	↑	↑↑
PREDICTED: kinesin-associated protein 3 isoform 2	gi 114565304	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: kinesin-associated protein 3 isoform 4	gi 114565298	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: microtubule-associated protein 4	gi 194221363	Hippocampus	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: MORN repeat-containing protein 1	gi 297279741	Parietal	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: mortality factor 4 like 2-like	gi 27674605	Spinal cord	↑	↑	0	0	0
PREDICTED: olfactory receptor 414-like	gi 194668731	Hippo	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: PRAME family member 10	gi 114575124	Brainstem	↑	↑	0	↑	↑
PREDICTED: PRAME family member 17	gi 114554119	Brainstem	↑	↑	0	↑	↑
PREDICTED: putative uncharacterized protein FLJ37004-like	gi 109003210	Parietal	↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑
PREDICTED: ras-related protein Rab-26-like, partial	gi 297283256	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: serine/threonine-protein kinase SRPK2-like isoform 1	gi 109067772	Hippo	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: serum albumin-like isoform 1	gi 301786252	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: similar to 3-oxoacyl-	gi 149729674	Hippocampus	↑	↑↑	↑↑	↑↑	0
PREDICTED: similar to Abhydrolase domain containing 8	gi 149625264	Brainstem	↑	0	↑	↑	↑
PREDICTED: similar to apolipoprotein O	gi 149744396	Brainstem	↑	0	↑	↑	3
PREDICTED: similar to CDC2-related kinase 7 isoform 6	gi 73966113	Spinal cord	↑	↑	0	0	0
PREDICTED: similar to Cell division cycle 2-related protein kinase 7 (CDC2-related protein kinase 7) (CrkRS) isoform 1	gi 73966105	Spinal cord	↑	↑	0	0	0
PREDICTED: similar to CG17941-PA	gi 73981949	Parietal	↑	↑	↑	0	↑

ID Details	Protein	Region	N	FE	DE	FL	DL
PREDICTED: similar to chromatin modifying protein 2B	gi 74001062	Parietal	↑	↑↑	↑↑	↑	↑
PREDICTED: similar to Chromosome 14 open reading frame 73	gi 126290447	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	0	↑↑
PREDICTED: similar to chromosome 6 open reading frame 152	gi 149463327	Parietal	↑	↑	0	0	↑
PREDICTED: similar to Coiled-coil and C2 domain containing 1A isoform 1	gi 126323160	Hippocampus	↑	0	↑	0	↑
PREDICTED: similar to Coiled-coil and C2 domain containing 1A isoform 2	gi 126323162	Hippocampus	↑	0	↑	↑↑	↑
PREDICTED: similar to cyclin T1	gi 73996851	Hippocampus	↑	↑↑	↑	↑↑	↑
PREDICTED: similar to cyclin-dependent kinase 12	gi 126308212	Spinal cord	↑	↑	0	0	0
PREDICTED: similar to cytokeratin type II	gi 73996498	Brainstem	↑	0	↑	0	↑↑
PREDICTED: similar to dentin sialophosphoprotein precursor, putative	gi 126337978	Brainstem	↑	0	0	↑	↑
PREDICTED: similar to diabetes related ankyrin repeat protein	gi 149727156	Brainstem	↑	0	0	↑	↑
PREDICTED: similar to dopamine beta-hydroxylase	gi 126297977	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific (Spermatogenic cell-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-2) (GAPDH-2) (HSD-35)	gi 73948478	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: similar to GPI-mannosyltransferase subunit	gi 74002957	Brainstem	↑	0	↑	↑	↑↑
PREDICTED: similar to GS homeobox 1	gi 149599030	Brainstem	↑	↑	↑	↑↑	0
PREDICTED: similar to heat shock transcription factor 1	gi 149598283	Brainstem	↑	↑	↑↑	↑	↑↑
PREDICTED: similar to keratin 5b	gi 73996461	Brainstem	↑↑	0	↑	↑	↑↑
PREDICTED: similar to keratin 6L	gi 73996463	Brainstem	↑↑	0	↑	↑	↑↑
PREDICTED: similar to Keratin, type I cytoskeletal 14 (Cytokeratin-14) (CK-14) (Keratin-14) (K14)	gi 114667176	Brainstem	↑↑	0	↑	↑	↑
PREDICTED: similar to kinesin-associated protein 3	gi 126306371	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: similar to Leucine-rich repeat protein SHOC-2 (Ras-binding protein Sur-8)	gi 74003729	Parietal	0	↑	↑	↑	↑
PREDICTED: similar to low density lipoprotein receptor-related protein 10	gi 149567113	Parietal	↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: similar to low density lipoprotein receptor-related protein 8	gi 73956442	Brainstem	↑	0	0	0	↑
PREDICTED: similar to Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 precursor (Multiple epidermal growth factor-like domains 7)	gi 126332714	Parietal	↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: similar to Macrophage receptor MARCO (Macrophage receptor with collagenous structure)	gi 73984183	Parietal	↑	↑↑	0	0	0
PREDICTED: similar to myosin heavy chain 10, non-muscle	gi 149409210	Brainstem	↑	↑↑	↑	0	0
PREDICTED: similar to N-myc proto-oncogene protein	gi 149631792	Spinal cord	↑	↑	0	0	0
PREDICTED: similar to nucleoside diphosphate kinase type 6	gi 73985902	Hippocampus	↑	↑↑	0	0	↑
PREDICTED: similar to Olfactory receptor 10T2	gi 74006383	Brainstem	↑	0	↑	0	↑
PREDICTED: similar to Olfactory receptor 9I1	gi 73982588	Spinal cord	↑	↑	0	0	0

ID Details	Protein	Region	N	FE	DE	FL	DL
PREDICTED: similar to peptidylarginine deiminase, type II	gi 149253211	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: similar to Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 3	gi 126322823	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: similar to RIKEN cDNA 6330514A18 gene	gi 149633975	Brainstem	↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑
PREDICTED: similar to RNA polymerase I transcription termination factor 1	gi 126297923	Spinal cord	↑	↑	0	0	0
PREDICTED: similar to SEL1L	gi 126282500	Spinal cord	↑↑	↑	↑	0	↑
PREDICTED: similar to SLC25A3 protein isoform 4	gi 114646438	Hippocampus	↑	↑↑	0	↑↑	↑
PREDICTED: similar to sorbin and SH3 domain containing 2, partial	gi 149615821	Brainstem	↑	0	↑	↑	↑
PREDICTED: similar to T cell receptor V delta 5	gi 149598669	Brainstem	↑	0	↑	↑	↑↑
PREDICTED: similar to tolloid-like 2, partial	gi 149618793	Spinal cord	↑	↑	0	0	0
PREDICTED: similar to tudor domain containing 6	gi 73980599	Brainstem	↑	0	↑	↑	↑
PREDICTED: similar to type IIA procollagen, partial	gi 149473605	Brainstem	↑	0	↑	↑	↑↑
PREDICTED: similar to ubiquitin associated protein 2	gi 149409863	Hippocampus	↑	↑	↑↑	↑↑	0
PREDICTED: similar to Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E3 (Ubiquitin-protein ligase E3) (Ubiquitin carrier protein E3) (Ubiquitin-conjugating enzyme E2-23 kDa) (UbcM2) isoform 3	gi 74004751	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: similar to Zinc finger protein 64, isoforms 1 and 2 (Zinc finger protein 338)	gi 194238788	Hippocampus	0	↑↑	↑↑	↑↑	0
PREDICTED: similar to zinc finger protein 709	gi 149554947	Spinal cord	↑	↑	0	0	↑↑
PREDICTED: ubiquilin 1	gi 194224707	Brainstem	0	↑	↑↑	0	↑↑
PREDICTED: ubiquitin specific protease 34	gi 293353299	Brainstem	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: UPF0691 protein C9orf116-like	gi 301792272	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
PREDICTED: WD repeat domain 78	gi 297473081	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
prostate stromal protein ps20	gi 10312075	Brainstem	↑	0	↑	0	↑
protein piccolo isoform 1	gi 150378539	Hippocampus	↑	↑↑	0	↑	↑
protein piccolo isoform 2	gi 150170670	Hippocampus	↑	↑↑	0	↑↑	↑
protein unc-13 homolog C	gi 284055293	Brainstem	↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑
protein-arginine deiminase type-2	gi 171906557	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	gi 124001551	Hippocampus	0	↑	↑	↑↑	↑
protocadherin 15 precursor (predicted)	gi 165934069	Spinal cord	↑	↑	0	↑	0
protocadherin alpha-8	gi 41281624	Hippocampus	↑	0	↑	↑	0
PRTD-NY2	gi 12330995	Parietal	0	↑	↑	↑	0
quaking protein 3	gi 17224450	Brainstem	↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑
RAB26, member RAS oncogene family	gi 44890744	Brainstem	↑	0	↑	1	↑↑
ras-like protein family member 11B	gi 110625708	Hippocampus	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
ras-related protein Rab-26	gi 46361978	Brainstem	↑	0	↑	0	↑↑
RecName: Full=Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway, mitochondrial; AltName: Full=Protein SITPEC; Flags: Precursor	gi 150382601	Hippocampus	0	↑	0	↑	↑↑
RecName: Full=Hemoglobin subunit beta-Z; AltName: Full=Beta-Z-globin; AltName: Full=Hemoglobin beta-Z chain	gi 232227	Brainstem	↑↑	0	↑	0	↑

ID Details	Protein	Region	N	FE	DE	FL	DL
RecName: Full=Homeobox protein MSX-1; AltName: Full=Msh homeobox 1-like protein	gi 88913535	Brainstem	↑	↑	0	0	0
RecName: Full=Myelin basic protein; Short=MBP	gi 32469616	Brainstem	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
RecName: Full=Protein HUG-1; AltName: Full=HOX11 upstream gene 1 protein	gi 13124303	Hippocampus	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
RecName: Full=Protein-arginine deiminase type-2; AltName: Full=Peptidylarginine deiminase II; AltName: Full=Protein-arginine deiminase type II	gi 730271	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
RecName: Full=RNA-binding protein 12B; AltName: Full=RNA-binding motif protein 12B	gi 75071008	Parietal	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
reelin	gi 1743885	Parietal	↑	↑	↑	0	0
regulator of G-protein signaling 22	gi 158534077	Parietal	0	↑	↑	0	0
RNA helicase LGP2	gi 149408137	Hippocampus	↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑
sarcomeric tropomyosin kappa	gi 49660012	Spinal cord	↑	↑	↑↑	0	↑
serine/threonine-protein kinase SRPK2 isoform a	gi 33188449	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
serum albumin precursor	gi 57977283	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
SET and MYND domain-containing protein 4	gi 156616308	Brainstem	↑	0	0	0	↑↑
SFRS protein kinase 2 isoform c	gi 34329350	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
short-wave sensitive type 1 opsin	gi 77025120	Brainstem	↑↑	0	0	↑	↑↑
skeletal muscle tropomyosin	gi 339958	Spinal cord	↑	↑	↑↑	0	↑
SLC25A3 protein	gi 34783216	Hippocampus	↑	↑↑	0	0	↑
SMAP	gi 3645904	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3, isoform CRA_c	gi 119618006	Hippocampus	↑	↑↑	0	↑↑	↑
SRPK2 protein	gi 46250445	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
STAT3	gi 13272532	Brainstem	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
T-cell surface antigen CD2 precursor	gi 156071472	Hippocampus	↑↑	↑↑	↑	↑↑	0
tetratricopeptide repeat protein 35	gi 166157534	Parietal	↑	↑	↑↑	0	↑
TPM1 protein	gi 29792232	Spinal cord	↑	↑	↑↑	0	↑
TPMsk1	gi 19072647	Spinal cord	↑	↑	↑↑	0	↑
transducin-like enhancer of split 3 (E(sp1) homolog, Drosophila), isoform CRA_d	gi 119598257	Parietal	↑	↑	0	0	0
tropomyosin (227 AA)	gi 825723	Spinal cord	↑	↑	↑↑	0	↑
tropomyosin alpha striated muscle isoform	gi 49660014	Spinal cord	↑	↑	↑↑	0	↑
tropomyosin isoform	gi 854189	Spinal cord	↑	↑	↑↑	0	↑
type II keratin Kb1	gi 149031965	Brainstem	↑	↑	0	0	↑
type II keratin Kb14	gi 51092301	Brainstem	↑↑	0	↑	↑	↑
type II keratin subunit protein	gi 386854	Brainstem	↑	↑	0	↑	↑
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 20	gi 157427794	Spinal cord	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
WAP four-disulfide core domain protein 1 precursor	gi 18379353	Brainstem	↑	0	↑	↑	↑
yv40g01.s1 Soares fetal liver spleen 1NFLS Homo sapiens cDNA clone IMAGE:245232 3-, mRNA sequence	gi 1195811	Hippocampus	↑	0	↑	0	↑

N = กลุ่มสุนัขที่ไม่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า

FE = กลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบดุร้ายที่เสียชีวิตเร็ว

DE = กลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอัมพาตที่เสียชีวิตเร็ว

FL = กลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบดุร้ายที่เสียชีวิตช้า

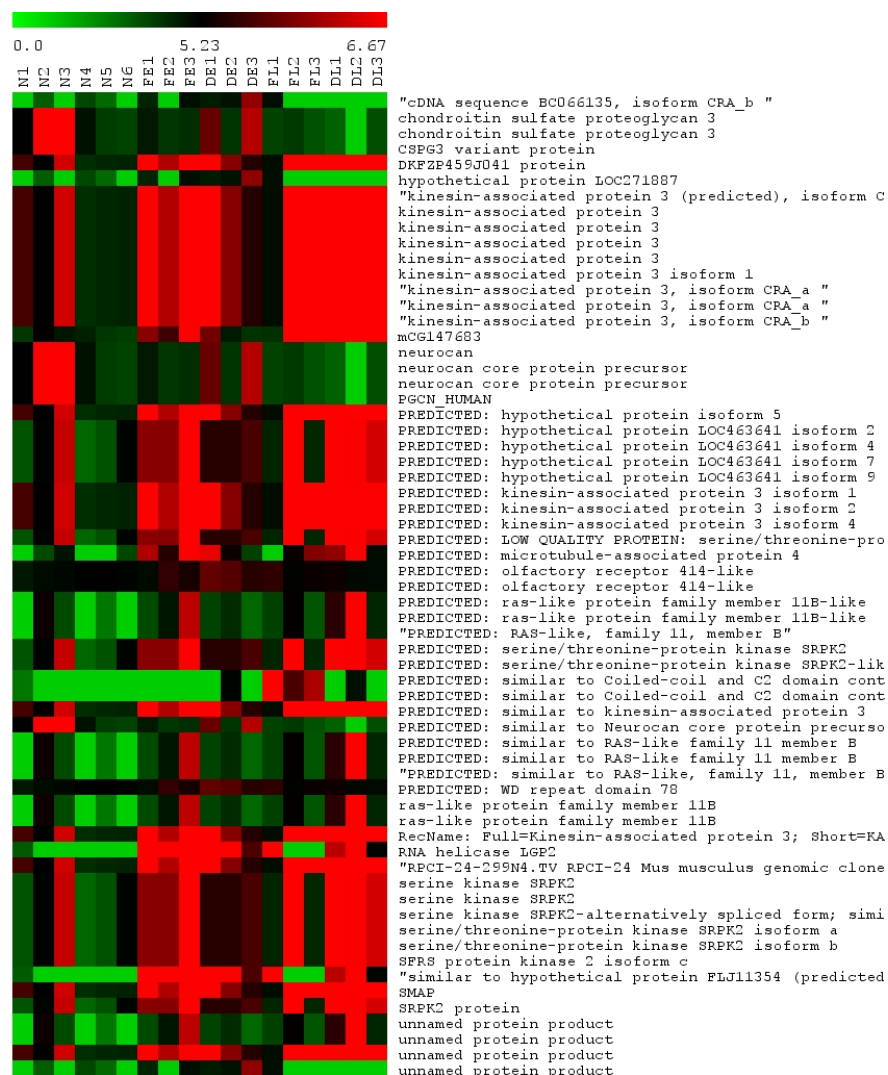
DL = กลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอัมพาตที่เสียชีวิตช้า

(0 หมายถึง ไม่มีค่า intensity)

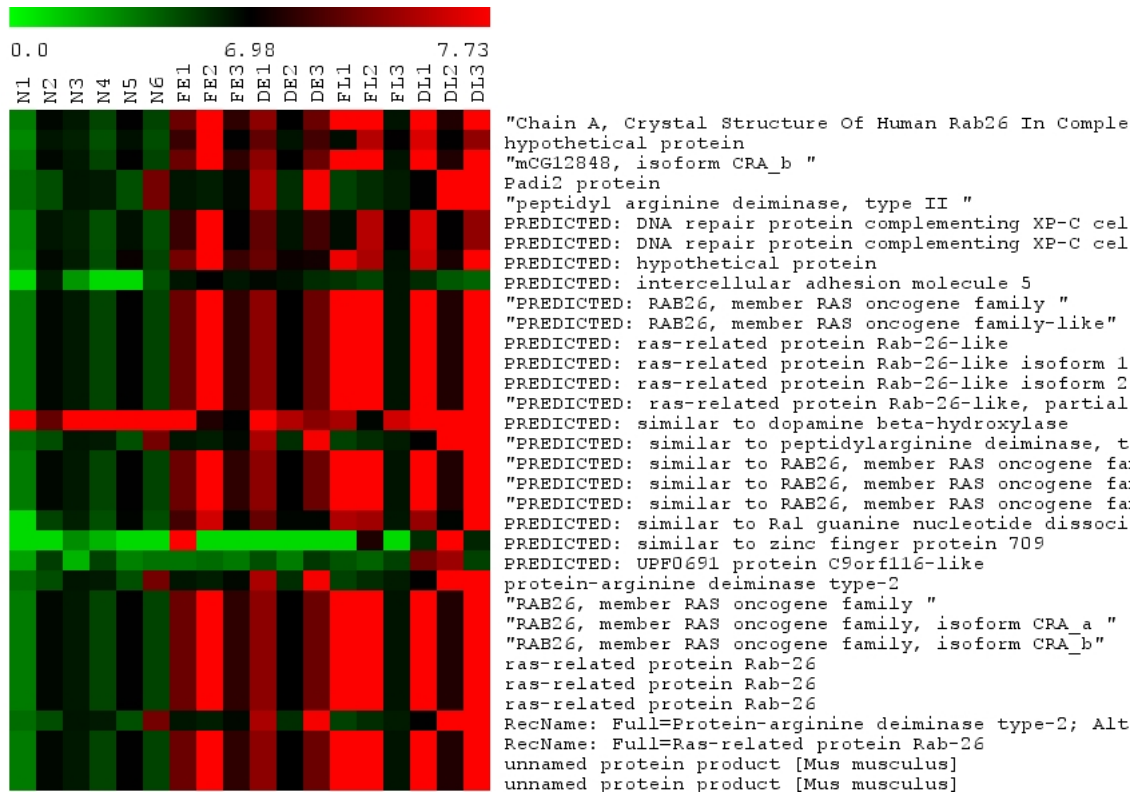
(↑ หมายถึง มีค่า intensity ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ 0)

(↑↑ หมายถึง มีค่า intensity ที่เพิ่มขึ้นมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ 0)

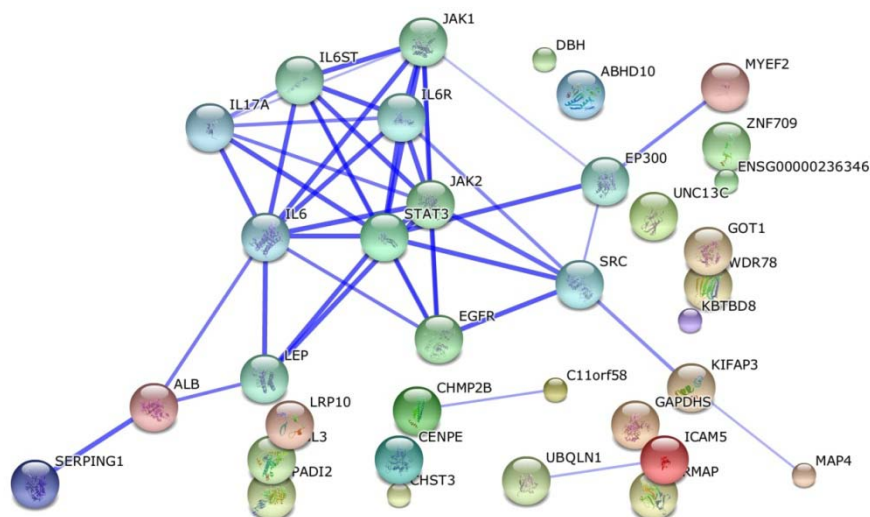
2. ผลการวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกของสมองส่วน Hippocampus, Parietal, Brainstem และไขสันหลัง ของสุนัขที่ไม่ได้ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้า สุนัขที่ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าทั้งในแบบดุร้ายและแบบอัมพาต จากโปรแกรม MeV ดังรูปที่ 5-8 พบว่าสามารถพัฒนาเทคนิคในขั้นการวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนได้



รูปที่ 5 แสดงผลการเปรียบเทียบ การแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของสมองส่วน Hiocampus ของสุนัขที่ของสุนัขที่ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าทั้งในแบบดุร้ายและแบบอัมพาต เปรียบเทียบกับสุนัขที่ไม่ได้ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าด้วยโปรแกรม MeV



รูปที่ 8 แสดงผลการเปรียบเทียบ การแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของไขสันหลัง ของสุนัขที่ของสุนัขที่ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าทั้งในแบบดูร้ายและแบบอัมพาต เปรียบเทียบกับสุนัขที่ไม่ได้ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าด้วยโปรแกรม MeV



รูปที่ 9 แสดงผลการเชื่อมโยงกันของโปรตีนที่การแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของสุนัขที่ของสุนัขที่ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าทั้งในแบบดูร้ายและแบบอัมพาต เปรียบเทียบกับสุนัขที่ไม่ได้ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าด้วยโปรแกรม String

 ICAM5

intercellular adhesion molecule 5, telencephalin; ICAM proteins are ligands for the leukocyte adhesion protein LFA-1 (integrin alpha-L/beta-2) (924 aa)

 GAPDHS

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic (408 aa)

 C11orf58

Small acidic protein (183 aa)

 UNC13C

unc-13 homolog C (C. elegans) (2214 aa)

 CHMP2B

chromatin modifying protein 2B (213 aa)

 STAT3

signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor) (770 aa)

 CENPE

centromere protein E, 312kDa (2701 aa)

 ABHD10

abhydrolase domain containing 10 (306 aa)

 SERPING1 (500 aa)

 KBTBD8

kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 8 (575 aa)

 ALB

Albumin (609 aa)

 MYEF2

myelin expression factor 2 (600 aa)

 LRP10

low density lipoprotein receptor-related protein 10 (713 aa)

 MAP4

microtubule-associated protein 4 (1152 aa)

 KIFAP3

kinesin-associated protein 3 (792 aa)

 GOT1

glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase 1) (413 aa)

 WDR78

WD repeat domain 78 (848 aa)

 ERMAP

erythroblast membrane-associated protein (Scianna blood group) (475 aa)

 CHST3

carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase 3 (479 aa)

 PADI2

peptidyl arginine deiminase, type II (665 aa)

UBQLN1

ubiquilin 1 (589 aa)

RGL3

ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 3 (710 aa)

DBH

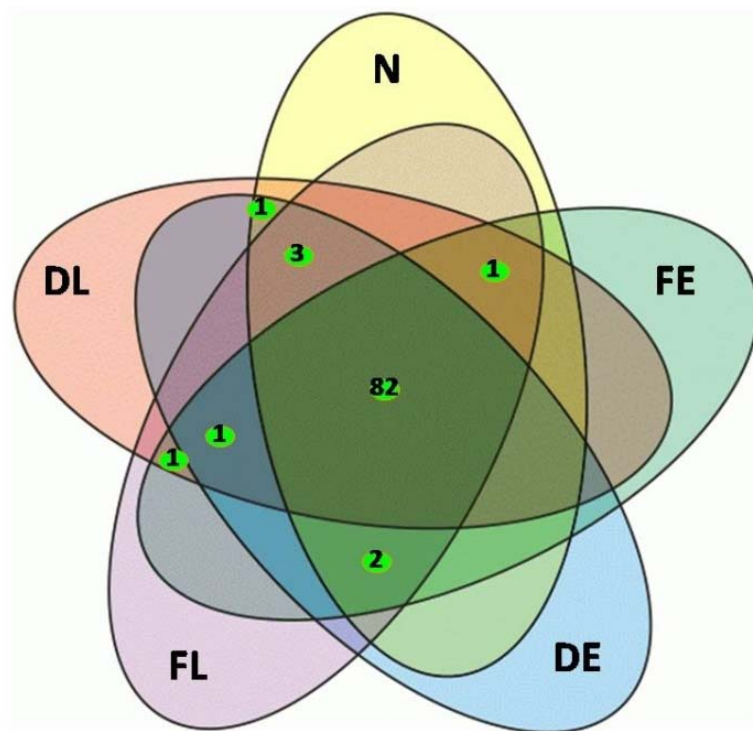
dopamine beta-hydroxylase (dopamine beta-monooxygenase) (617 aa)

ZNF709

zinc finger protein 709 (641 aa)

ENSG00000236346

NF-kappa-B inhibitor-like protein 1 (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1)(Inhibitor of kappa B-like protein)(I-kappa-B-like protein)(IkappaBL) (381 aa)
(*Homo sapiens*)



รูปที่ 10 แสดงจำนวนโปรตีนที่การแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของไขสันหลัง ของสุนัขที่ของสุนัขที่ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าทั้งในแบบดุร้ายและแบบอัมพาต เปรียบเทียบกับ สุนัขที่ไม่ได้ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้า

สรุปและวิเคราะห์ผล

ผลจากการนำแต่ละช่วงเจลไปวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS/MS ได้ข้อมูลของคุณสมบัติของโปรตีนแต่ละชนิด ในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบดุร้ายและแบบอัมพาต ทั้งในกลุ่มที่แสดงอาการเร็วและแสดงอาการช้าเปรียบเทียบกับสุนัขที่ไม่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า พบว่า

Cytoskeleton proteins

เป็นกลุ่มโปรตีนที่พบมาก ทั้งยังสำคัญในกระบวนการรักษาโครงร่างของเซลล์ การขนส่งสารต่างๆ ในการศึกษาใน neuroblastoma cell ที่ infect ด้วย CVS strain แม้ว่า rabies virus nucleocapsid จะทำให้ filamentous actin (F-actin) ลดลง แต่มีผลต่อ synapsin I ซึ่งเป็น neuron-specific protein ที่ควบคุมการเกิด actin bundling แต่ไม่ได้มีผลโดยตรงต่อกระบวนการ actin polymerization [1] ในปี 2008 มีการศึกษาใน transgenic mice ที่สามารถ express yellow fluorescent protein (YFP) ในตำแหน่งของ neurons ใน layer V ของ neocortex pyramidal neurons ของ hippocampus และ mossy fibers ของ cerebellum และใน dorsal root ganglia เมื่อดูด้วย fluorescence microscopy พบว่า มีการเกิด beading ใน axons และ dendrites ของ layer V pyramidal neurons ใน cerebral cortex, cerebellar mossy fibers และ axons ใน brainstem พบการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยใน perikarya ของ neuronal processes ของ hippocampus ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้สัมพันธ์กับเวลาในช่วง late infection บ่งชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ไม่ได้ทำหน้าที่จำกัดการแพร่กระจายของไวรัสผ่าน neural axis [2]

ผลการศึกษาค้นพบ Tropomyosin alpha chain มีหน้าที่เป็น actin-binding protein ซึ่งควบคุม actin mechanics ในหลาย isoform ไม่มีการแสดงออกเฉพาะในไซสตันหลังของกลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบดุร้ายที่เสียชีวิตช้า (FL) ในขณะที่กลุ่มอื่นมีการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มนี้ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอัมพาตที่เสียชีวิตเร็ว (DE)

Reelin เป็นโปรตีนที่ช่วยควบคุมการทำงานของ microtubule ใน neurons และ neuronal migration การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบว่ามีแสดงออกเฉพาะในสมองส่วน Parietal ของกลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบดุร้ายและแบบอัมพาตที่เสียชีวิตช้า (FL, DL) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น

ดังนั้นผลของไวรัสมีผลต่อ Cytoskeleton proteins น่าจะเป็นผลในตอนเริ่มแรกและเป็นทางอ้อมจากการที่ไวรัสมีผลต่อ โปรตีนในกลุ่ม neuron-specific protein ซึ่งควบคุมการทำงานของ Cytoskeleton proteins อีกที ดังนั้นทำให้ function ผิดปกติไป มากกว่าการที่ตัวไวรัสไปทำลาย Cytoskeleton proteins โดยตรง

Heat shock proteins and chaperones

Heat shock proteins หรือ stress proteins เป็นกลุ่มโปรตีนที่พบในเซลล์ ในสภาวะปกติ จะทำหน้าที่คล้ายกับ chaperones ควบคุม folding ของ cellular protein ให้มี conformation ถูกต้อง ในสภาวะที่เกิด environmental stresses เช่น ความร้อน การติดเชื้อ การอักเสบ ทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (innate immunity) [3]

การศึกษาที่พบว่ามี Heat shock protein หลายตัว มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในตำแหน่ง brainstem และ spinal cord โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบ

อัมพาต แสดงให้เห็นว่า ในกลุ่มนี้มี stress และ innate immune response ต่อไวรัสที่มากกว่า ทั้งๆที่มีจำนวนไวรัสปริมาณน้อย ซึ่งสัมพันธ์กับข้อมูลที่ศึกษามาก่อนหน้านี้ว่า ณ ตำแหน่ง Spinal cord นี้ซึ่งเป็นทางผ่านของไวรัสก่อนที่จะไปสู่สมองและมีไวรัสอยู่เป็นจำนวนมากในกลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบดุร้าย [4] อาจอธิบายได้ว่าการที่มีปฏิกิริยาการตอบสนองที่มากขึ้น อาจทำให้ไวรัสเคลื่อนตัวช้ากว่าในกลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอัมพาต

Immune response-related proteins

จากการศึกษาพบ CD2 ซึ่งเป็น specific marker ของ T cells และ NK cells มีการเพิ่มขึ้นที่บริเวณสมองส่วน hippocampus โดยเฉพาะในกลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบดุร้าย แสดงว่าน่าจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นในกลุ่มนี้ ซึ่งสัมพันธ์กับข้อมูลที่ศึกษามาก่อนหน้านี้ว่า ไวรัสจะเข้าสู่สมองได้ เร็วกว่าในกลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอัมพาต

Neuron-specific proteins

Collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2) หรือ dihydropyrimidinase-related protein 2 เป็นโปรตีนที่สำคัญทั้งในด้าน microtubule reorganization โดย CRMP-2 ที่ตำแหน่ง axon และ dendrite จะสามารถจับ tubulin heterodimers เกิด microtubule assembly เหนี่ยวนำ neurite elongation ซึ่ง CRMP-2 นี้ ถูกควบคุมการทำงานโดย glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) [5] และ CRMP-2 ยังเกี่ยวข้องในการเกิด migration ของ T-cell [6] ก่อนหน้านี้มีการศึกษาในสมองของหนูที่มี encephalitis พบว่าเมื่อมีการติดเชื้อไวรัส จะมีการแสดงออกของ CRMP-2 ที่เพิ่มขึ้นใน T-lymphocytes ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิด recruitment ของ immune cell [7]

โดยในการศึกษานี้ พบว่า ทั้งในกลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบดุร้ายและแบบอัมพาต มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ CRMP-2 ในตำแหน่งสมองส่วน parietal และ brainstem แต่ไม่มีพบ Spinal cord แสดงให้เห็นว่าในตำแหน่ง parietal และ brainstem นั้น น่าจะมีความทำงานของการตอบสนองภูมิคุ้มกันที่มากขึ้น เหนี่ยวนำให้เกิด cell migration เพื่อเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อไวรัส

Transporter protein

Protein piccolo หรือ Aczonin อาจจะทำหน้าที่เหมือน scaffolding protein โดยเกี่ยวข้องกับการจัดการที่ตำแหน่ง synaptic active zones และการขนส่งของ synaptic vesicle ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบว่าการแสดงออกที่ตำแหน่ง hippocampus เฉพาะในกลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอัมพาตที่เสียชีวิตเร็ว (DE) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น

Ubiquitination and proteosome-related proteins

โปรตีนในกลุ่มนี้ เป็นโปรตีนที่สำคัญในกลุ่มที่ควบคุมระดับ proteolysis/protein stability ในการศึกษาครั้งนี้พบ Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม thiol protease ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการ processing ของ ubiquitin precursors และ ubiquitinated proteins โดยจะ hydrolyzes พันธะ peptide ณ ตำแหน่ง C-terminal glycine ของ ubiquitin, E3 ubiquitin-protein ligase เกี่ยวข้องในกระบวนการ polyubiquitination เพื่อเป็นโปรตีนที่บ่งบอกสำหรับการเกิด

degradation โดย proteasome ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มนี้ในทุกกลุ่ม ในตำแหน่งของสมองส่วน hippocampus, brainstem และไขสันหลัง

Ubiquitin 1 เป็นโปรตีนในกลุ่ม ubiquitin-like protein ทำหน้าที่หลักในการควบคุม proteasomal degradation ของโปรตีนอื่นๆ [8] ในปี 2011 พบว่า Ubiquitin 1 หรือ PLIC-1 (Protein linking IAP with cytoskeleton 1) ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของกระบวนการ TLR3-Trif signaling pathway [9] ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเพิ่มขึ้นของโปรตีนตัวนี้ที่ตำแหน่งของสมองส่วน brainstem ในทุกกลุ่มของสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าเมื่อเปรียบเทียบกับสุนัขที่ไม่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอัมพาตที่เสียชีวิตเร็ว (DE) พบว่าการเพิ่มขึ้นอย่างมาก อาจอธิบายได้ว่าการที่มีปฏิกิริยาการตอบสนองที่มากขึ้น อาจทำให้ไวรัสเคลื่อนตัวช้ากว่าในกลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอัมพาต

จากผลจากการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนแต่ละชนิดที่เปลี่ยนแปลงไป ในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบดุร้ายและแบบอัมพาต ทั้งในกลุ่มที่แสดงอาการเร็วและแสดงอาการช้าเปรียบเทียบกับสุนัขที่ไม่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า ดังนั้นงานวิจัยนี้จะช่วยให้มีการพัฒนาองค์ความรู้ว่า ในเซลล์ประสาทระดับต่างๆกัน มีการสร้างโปรตีนชนิดใดที่เหมือนและต่างกันในส่วนต่างๆ ทั้งในภาวะปกติและภาวะติดเชื้อ และยังทำให้ทราบลักษณะความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนในโรคพิษสุนัขบ้าแบบดุร้ายและแบบอัมพาตที่มีเสียชีวิตเร็วและช้าได้ อันจะเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการศึกษาต่อไปในอนาคต ซึ่งจะนำไปสู่การอธิบายกลไกการทำงาน การทำอันตราย การประยุกต์ใช้ในการรักษาต่อไป

ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการตรวจ mRNA expression ของโปรตีนที่สนใจ เพื่อยืนยันการแสดงออกของโปรตีนที่พบวิธี Real-time PCR ก่อนการเขียนรายงานเพื่อขอรับการตีพิมพ์ต่อไป และศึกษาต่อไปถึงโปรตีนจำเพาะในกลุ่มอาการเดียวกันและในกลุ่มปกติ ที่ตำแหน่งต่างๆ ได้แก่ hippocampus, parietal, brainstem และ spinal cord เพื่อให้ทราบว่า brainstem และ spinal cord มีโปรตีนชนิดใดที่ต่างกับส่วนสมองใหญ่ ทั้งนี้ต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งเป็นการดูโปรตีนในสมองที่ตำแหน่งเดียวกันในแต่ละกลุ่ม

เอกสารอ้างอิง

- [1] Ceccaldi PE, Valtorta F, Braud S, Hellio R, Tsiang H. Alteration of the actin-based cytoskeleton by rabies virus. J Gen Virol. 1997 Nov;78 (Pt 11):2831-5.
- [2] Scott CA, Rossiter JP, Andrew RD, Jackson AC. Structural abnormalities in neurons are sufficient to explain the clinical disease and fatal outcome of experimental rabies in yellow fluorescent protein-expressing transgenic mice. J Virol. 2008 Jan;82(1):513-21.
- [3] Nishikawa M, Takemoto S, Takakura Y. Heat shock protein derivatives for delivery of antigens to antigen presenting cells. Int J Pharm 2008. 354 (1-2): 23–7.
- [4] Mitrabhakdi E, Shuangshoti S, Wannakrairot P, Lewis RA, Susuki K, Laothamatas J, et al. Difference in neuropathogenetic mechanisms in human furious and paralytic rabies. Journal of the neurological sciences. 2005 Nov 15;238(1-2):3-10.

- [5] Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, Kawabata S, Kikuchi A, Kaibuchi K. GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*. 2005 Jan 14;120(1):137-49.
- [6] Vincent P et al. A role for the neuronal protein collapsin response mediator protein 2 in T lymphocyte polarization and migration. *J Immunol*. 2005 Dec 1;175(11):7650-60.
- [7] Vuillat C et al. High CRMP2 expression in peripheral T lymphocytes is associated with recruitment to the brain during virus-induced neuroinflammation. *J Neuroimmunol*. 2008 Jan;193(1-2):38-51.
- [8] Rothenberg C, Srinivasan D, Mah L, Kaushik S, Peterhoff CM, Ugolino J, Fang S, Cuervo AM, Nixon RA, Monteiro MJ. Ubiquitin functions in autophagy and is degraded by chaperone-mediated autophagy. *Hum Mol Genet*. 2010 Aug 15;19(16):3219-32.
- [9] Biswas N, Liu S, Ronni T, Aussenberg SE, Liu W, Fujita T, Wang T. The ubiquitin-like protein PLIC-1 or ubiquitin 1 inhibits TLR3-Trif signaling. *PLoS One*. 2011;6(6):e21153.

Output:ผลงานตีพิมพ์

Natthapaninee Thanomsridetchai, Nilubon Singhto, Veera Tepsumethanon, Shanop Shuangshoti, Supaporn Wacharapluesadee, Supachok Sinchaikul, Shui-Tein Chen, Thiravat Hemachudha, and Visith Thongboonkerd. Comprehensive proteome analysis of hippocampus, brainstem and spinal cord from paralytic and furious dogs naturally infected with rabies. (submitted for publication) [เอกสารแนบ 3]

โครงการที่ 4 การตรวจไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าจากสิ่งส่งตรวจนอกสมองในสุนัขที่เสียชีวิตด้วย เทคนิคอณูชีววิทยา

ผู้รับผิดชอบหลัก

1. ดร.สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี
2. น.สพ.วีระ เทพสุเมธานนท์

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาในสิ่งส่งตรวจจากสุนัขชนิด non-neuronal ที่สามารถเก็บตัวอย่างได้ง่าย เช่น น้ำลาย หนอง หนังติดขนบริเวณหัวสุนัข จากสุนัขที่เสียชีวิต
2. เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการใช้ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจชนิดอื่นที่ไม่ใช่สมองในการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าในสุนัข

การดำเนินงานวิจัย

4.1 โครงการเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยไวรัส RB ด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา 5 แบบ

“Comparative detection of rabies RNA by NASBA, real-time PCR and conventional PCR”

เป็นโครงการวิจัยเปรียบเทียบวิธีการตรวจทางอณูชีววิทยา 5 ชนิด ที่เป็นการตรวจที่มีรายงานตีพิมพ์แล้วทั้งจากของคณะผู้วิจัย ได้แก่ NASBA-ECL (Wacharapluesadee and Hemachudha, 2001) และ Real-time PCR (Wacharapluesadee et al. 2008) และจากคณะผู้วิจัยต่างประเทศ ได้แก่ RT-hnPCR (Dacheux et al., 2008) รวมทั้งการตรวจที่พัฒนาขึ้นใหม่จากคณะผู้วิจัย (Real time- NASBA) เพื่อเปรียบเทียบ sensitivity ,specificity และระยะเวลาในการวินิจฉัย อีกทั้งเปรียบเทียบการใช้เครื่องมือ 2 แบบในการทำ Real-time NASBA คือใช้เครื่องมือจำเพาะที่ผลิตโดยบริษัทผู้จัดจำหน่าย และการประยุกต์ใช้เครื่อง Real-time PCRซึ่งมีการใช้งานอย่างแพร่หลายในประเทศไทย มากกว่าเครื่อง Real-time NASBA

ผลที่ได้รับ

1) การเปรียบเทียบ sensitivity ของวิธีการตรวจ 5 แบบ

จากการเปรียบเทียบในตัวอย่าง 2 ชนิด ได้แก่ viral RNA ของ ไวรัสพิษสุนัขบ้า ชนิด laboratory strain (CVS-11) และไวรัสที่ได้จากสมองสุนัขที่ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (street strain) โดยการทำการ dilution 1:10 เพื่อหาค่าสุดท้ายที่วิธีการตรวจแต่ละแบบสามารถตรวจพบไวรัสได้พบว่า NASBA-ECL, Real-time PCR และ Nested-PCR มีความไวในการตรวจที่ระดับเดียวกัน ในขณะที่ Real-time NASBA มีความไวในการตรวจน้อยกว่าวิธีทั้งสาม 10 เท่า อย่างไม่มีนัยสำคัญ

ตัวย่อ Nucleic acid sequence-based amplification with electrochemiluminescence (NASBA-ECL)

Reverse transcription (RT) - heminested (hn) polymerase chain reaction (PCR)

2) การเปรียบเทียบ sensitivity ของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่ Real- time NASBA จากการใช้เครื่องมือตรวจต่างชนิดกัน

Primers และ Probe ของ Real- time NASBA ได้ออกแบบขึ้นโดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานของวิธีการ NASBA-ECL ที่พัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี 2543 ที่พิสูจน์แล้วว่ามีความไวในการตรวจสูง สามารถตรวจสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยก่อนเสียชีวิตได้ (Wacharapluesadee and Hemachudha, 2001) และใช้เป็นวิธีการตรวจมาตรฐานของศูนย์ปฏิบัติการทางโรคสมอง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 – 2552 แต่เนื่องจากการหยุดผลิตและจำหน่ายน้ำยา ECL ที่ใช้ในการตรวจ โดยมีเทคโนโลยีใหม่ คือ NASBA-Real time มาแทนที่ แต่ต้องใช้เครื่องมือจำเพาะในการตรวจวินิจฉัย ซึ่งมีราคาแพง

คณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองประยุกต์ใช้เครื่องมือ Real- time PCR ซึ่งมีอยู่ในห้องปฏิบัติการอยู่แล้ว นำมาทดลองใช้ในการทำ Real- time NASBA เปรียบเทียบกับการใช้เครื่อง Real- time NASBA ต้นฉบับ

การทดสอบพบว่า การทำ Real- time NASBA จากเครื่องมือทั้ง 2 ชนิด ให้ผลการตรวจที่ไม่แตกต่างกันทั้งในแง่ sensitivity และ specificity

สรุปและวิเคราะห์ผล

ผลการวิจัยการเปรียบเทียบเทคนิคทางอณูชีววิทยาในการตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้า ที่ได้ศึกษาค้นคว้าช่วยยืนยันว่าเทคนิค Real- time PCR สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าทดแทนวิธี NASBA-ECL ที่ศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง ใช้ในการตรวจยืนยันตั้งแต่ พ.ศ. 2543 และถึงแม้จะมีเทคโนโลยีใหม่ คือ Real- time NASBA ก็ไม่ได้ให้ผลการตรวจที่มีความไวในการตรวจ ดีกว่าวิธีเดิม (NASBA-ECL) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการตรวจวัดแบบ ECL เป็นการวัดที่ end point หลังจากมีการสะสมสัญญาณของ chemiluminescent ในขณะที่ Real- time NASBA เป็นการวัดสัญญาณ fluorescent ทุกๆ cycle ที่มีการเปลี่ยนแปลง แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจด้วยเทคโนโลยี Real- time NASBA ใช้ระยะเวลาการตรวจวัดที่น้อยกว่า คือประมาณ 2 ชั่วโมง ในขณะที่ NASBA-ECL ต้องใช้เวลาในขั้นตอนการ amplification และ detection รวมประมาณ 3 ชั่วโมง และยังสามารถประยุกต์ใช้กับเครื่อง Real- time PCR ได้โดยไม่ต้องซื้อเครื่องของระบบ NASBA

การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Nested-PCR ใช้เวลาในการตรวจประมาณ 5 ชั่วโมง และมีความเสี่ยงต่อการเกิด contamination ระหว่างการตรวจ จึงต้องการผู้ปฏิบัติที่มีประสบการณ์ในการตรวจสูง แต่อย่างไรก็ตาม เป้าหมายของยีนในการเพิ่มปริมาณเป็นยีน L-polymerase ซึ่งแตกต่างจากการทำ Real- time PCR และ NASBA ซึ่งมียีน nucleoprotein (N) เป็นยีนเป้าหมาย และเป็นยีนที่มีความคงตัวระหว่างไวรัส strain ต่างๆ หรือภูมิภาคต่างๆค่อนข้างสูง จึงเหมาะที่จะใช้ในการตรวจวินิจฉัยอย่างแพร่หลายทั่วโลก มากกว่ายีน N ที่มีความคงตัวต่ำกว่า และผันแปรตามภูมิภาคของโลก และ strain ของไวรัสพิษสุนัขบ้า

ตารางที่ 1 Comparison of NASBA and PCR detection systems for detection of rabies viruses

Sample (Dilution)	NASBA-ECL ^a	NASBA- Beacon –EQ ^b	NASBA- Beacon-LC ^c	TaqMan RT- PCR ^d	RT-hnPCR ^e
CVS (10 ⁻⁴)*	+/+/+	+/+/+	+/+/+	ND	+/+/+
CVS (10 ⁻⁵)	+/+/+	+/+/+	+/+/+	ND	+/+/+
CVS (10 ⁻⁶)	+/+/+	-/-/-	-/-/-	ND	+/+/+
CVS (10 ⁻⁷)	+/-/-	-/-/-	-/-/-	ND	-/-/-
CVS (10 ⁻⁸)	-/-/-	-/-/-	-/-/-	ND	-/-/-
D4 (10 ⁻³) [#]	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+
D4 (10 ⁻⁴)	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+
D4 (10 ⁻⁵)	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+
D4 (10 ⁻⁶)	+/+/+	-/+/-	-/-/-	+/+/+	+/+/-
D4 (10 ⁻⁷)	+/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-
D4 (10 ⁻⁸)	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-

ND = not done due to mismatch between probe and target, * RNA concentration = 0.018 ug/μl,

[#] RNA concentration = 0.374 ug/μl, ^a NASBA assay with electrochemiluminescence detection, ^b real-time molecular beacon NASBA performed with the NucliSens EasyQ analyser, ^c real-time molecular beacon NASBA performed with the LightCycler real-time PCR machine, ^d one step TaqMan real-time RT-PCR, ^e RT- heminested PCR

4.2 โครงการศึกษาการตรวจวินิจฉัยไวรัสพิษสุนัขบ้าในสิ่งส่งตรวจที่ไม่ใช่สมอง

เป็นโครงการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าในสุนัข จากตัวอย่างที่ไม่ใช่เนื้อสมอง ด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา เพื่อหาวิธีการที่จะสามารถใช้ทดแทนการตรวจไวรัสพิษสุนัขบ้าจากสมอง สุนัข ที่มีความยุ่งยากในการได้มาซึ่งตัวอย่าง โดยต้องมีการผ่าเปิดกะโหลกศีรษะที่มีอัตราในการติดเชื้อต่ำ และในบางครั้งเจ้าของสัตว์ปฏิเสธที่จะตัดหัวสัตว์เพื่อส่งตรวจ จึงทำให้การตรวจตัวอย่างสัตว์ที่สงสัยว่าเป็นโรคพิษสุนัขบ้าโดยเฉพาะสุนัขและแมว ไม่ได้รับความใส่ใจมากนักต่อเจ้าของสัตว์ จึงทำให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้รับข้อมูลการทดสอบที่ไม่ครบถ้วน หากสามารถพัฒนาเทคนิควิธีการตรวจโดยไม่ต้องเปิดสมองสัตว์ได้ อาจช่วยให้ข้อมูลด้านระบาดวิทยาของโรคพิษสุนัขบ้าในประเทศและภูมิภาคอื่นๆมีความแม่นยำ และสามารถนำไปใช้ในการวางแผนควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไป

ผลที่ได้รับ

การศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่าง Non-neuronal 3 ชนิด ได้แก่ น้ำลาย หนอง และขน สุนัข เพื่อทำการตรวจหาไวรัสพิษสุนัขบ้าด้วยเทคนิค Real-time PCR เปรียบเทียบการตรวจในเนื้อสมองสุนัข โดยมีตัวอย่างสุนัขในโครงการ รวม 101 ตัว แบ่งเป็นสุนัขที่ไม่ได้ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้า จำนวน 35 ตัว และ สุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า จำนวน 66 ตัว จากการวินิจฉัยยืนยันด้วยวิธีการ

ตรวจมาตรฐาน Direct Fluorescent Assay (DFA) ซึ่งสุนัขบ้าทั้ง 66 ตัว ประกอบสุนัขที่มีอาการดุร้าย (Furious form) จำนวน 46 ตัว และชนิดซึม (paralytic form) จำนวน 20 ตัว การเปรียบเทียบผลการตรวจระหว่างตัวอย่าง Non –neuronal 3 ชนิด พบว่า น้ำลาย เป็นสิ่งส่งตรวจที่มีความไวในการตรวจสูงสุด รองลงมาได้แก่ หนอง และขน ตามลำดับ โดย น้ำลายมีความไวในการตรวจ 83.3% คือพบผลบวกจำนวน 55 ใน 66 ตัวอย่าง ในขณะที่หนองมีความไวในการตรวจ 81.8% คือพบผลบวกจำนวน 54 ใน 66 ตัวอย่าง และตัวอย่างขนบริเวณท้ายทอย มีความไวในการตรวจ 66.7% คือพบผลบวกจำนวน 44 ใน 66 ตัวอย่าง โดยไม่พบผลบวกปลอมในตัวอย่างสัตว์ที่ไม่ได้เป็นโรคพิษสุนัขบ้า อย่างไรก็ตามเมื่อรวมผลการตรวจจากตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดวินิจฉัยร่วมกัน พบว่าการตรวจด้วย non-neuronal specimen มีความไวเพิ่มขึ้นเป็น 86.4% แต่ทั้งนี้ความไวของผลการตรวจนี้ไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้สำหรับการวินิจฉัยโรคในสัตว์ เพื่อการตัดสินใจให้การรักษาล้างการถูกกัดได้ (postexposure prophylaxis)

ตารางที่ 2 Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of TaqMan real-time RT-PCR results in 4 specimens

Position	Sensitivity [95% CI]	Specificity [95% CI]	PPV [95% CI]	NPV [95% CI]
Brain	100.0	100.0	100.0	100.0
Saliva	83.3 [76.1, 90.6]	100.0	100.0	76.0 [67.8, 84.4]
Whisker follicles	81.8 [74.3, 89.3]	100.0	100.0	74.4 [66.0, 83.0]
Hair follicles	66.7 [57.5, 75.9]	100.0	100.0	61.4 [51.9, 70.9]

PPV = Positive predictive value, NPV = Negative predictive values

สรุป และวิเคราะห์ผล

ถึงแม้วิธีการตรวจตัวอย่างจาก non-neuronal specimen ในสุนัขจะไม่สามารถนำมาใช้ทดแทนวิธีการมาตรฐาน DFA เพื่อใช้ตรวจประกอบการให้การรักษาก็ได้ แต่วิธีการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดได้แก่ น้ำลาย หนอง และขน เป็นวิธี non-invasive ที่ไม่ทำให้สัตว์เจ็บปวด ทรมานง่ายต่อการเก็บตัวอย่าง และปลอดภัยต่อผู้ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจ จึงน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการศึกษาระบาดวิทยาของโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Wacharapluesadee, S., Hemachudha, T. 2001. Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies. Lancet. 358, 892-893.
2. Wacharapluesadee, S., Sutipanya, J., Damrongwatanapokin, S., Phumesin, P., Chamnanpood, P. Leowijuk, C., Hemachudha, T. 2008. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. J Virol Methods. 151, 317-320.

3. Dacheux, L., Reynes, J.M., Buchy, P., Sivuth, O., Diop, B.M., Rousset, D., Rathat, C., Jolly, N., Dufourcq, J.B., Nareth, C., Diop, S., lehle, C., Rajerison, R., Sadorge, C., Bourhy, H., 2008. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. Clin Infect Dis. 47, 1410-1417.

Output ผลงานตีพิมพ์

1. Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Ante- and post-mortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests. Expert Rev Mol Diagn. 2010 Mar; .18-207:(2)10 Review. [เอกสารแนบ 4]
2. Wacharapluesadee S, Phumesin P, Supavonwong P, Khawplod P, Intarut N, Hemachudha T. Comparative detection of rabies RNA by NASBA, real-time PCR and conventional PCR. J Virol Methods. 2011 Aug;175(2):278-82. [เอกสารแนบ 5]
3. Supaporn Wacharapluesadee, Veera Tepsumethanon, Pornpun Supavonwong, Thongchai Kaewpom, Nirun Intarut, Thiravat Hemachudha. Detection of rabies viral RNA from non-neural specimens of rabies infected dogs by Taqman real-time RT-PCR. (submitted for publication) [เอกสารแนบ 6]

โครงการที่ 5 การสำรวจนําร่อง ciguatoxin ในเนื้อปลาที่นำส่งเข้าตลาดของ กทม.และจังหวัด ใกล้เคียง

ผู้รับผิดชอบโครงการ

ผศ.ดร.จิรพล สินธุนาวา

ดร.สุภาภรณ์ วัชรพฤษชาติ

ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษานําร่องความเป็นไปได้ในการพบปลาซึ่งปนเปื้อนด้วย ciguatera toxins ในแหล่งที่
นำส่งไปยังท้องตลาดใน กทม.และจังหวัดใกล้เคียง

การดำเนินงาน

1. การสุ่มสำรวจเนื้อปลาจากตลาดในกรุงเทพมหานครเพื่อตรวจหา Ciguatoxin ด้วยชุด ตรวจสำเร็จรูป

เนื้อปลาที่ทำการสำรวจแบ่งเป็น 2กลุ่ม ได้แก่ เนื้อปลาที่ได้จากปลาสดเป็นตัวยุ่ จำนวน 69
ตัว และเนื้อปลาที่ได้จากเนื้อปลาแล้สำเร็จรูปแพคในถุง จำนวน 5ถุง โดยทำการสุ่มซื้อใน 3ตลาดสด
ระหว่าง เดือนมีนาคม – ธันวาคม พ.ศ2552 . การตรวจใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป *Cigua–Check test*
(Toxi Tec, Inc, Hawaii, USA)

ผลที่ได้รับ

การตรวจปลาสด 69ตัว ไม่พบว่ามี ciguatoxin ปนเปื้อน ในขณะที่การตรวจเนื้อปลากระพง
แสมแล้ สำเร็จรูปจำนวน 158ตัวอย่าง พบว่ามี 2ตัวอย่างที่ให้ผลบวกแบบ borderline คือ มีสีฟ้า
จางๆเกิดขึ้นแต่ไม่เข้ม โดยทั้ง 2ชิ้นมาจากต่างถุงกัน

วิธีมาตรฐานในการตรวจยืนยัน ciguatoxin ต้องใช้วิธี Mouse bioassay เพื่อศึกษา toxicity
โดยการสกัด ciguatoxin จากเนื้อปลาด้วย ether และฉีด intraperitoneal จากนั้น สังเกตอาการ
hypothermia จากการวัด rectal body temperature, อาการท้องเสีย, มีการเคลื่อนไหวช้า และมี
น้ำหนักตัวลดลงใน 4 วัน และเสียชีวิตต่อมาใน 24 ชั่วโมง ซึ่งมีวิธีการยุ่งยากและใช้เวลานาน เมื่อ
เปรียบกับการตรวจด้วยชุดตรวจที่ใช้หลักการ immunoassay ที่สามารถรู้ผลได้ ภายในเวลาประมาณ
30 นาที และผู้บริโภคสามารถทดสอบเองได้ แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ชุดตรวจสอบจะไม่สามารถรู้
ปริมาณของ ciguatoxinในเนื้อปลาได้

การพบผลบวกของ ciguatoxin จากการสำรวจเนื้อปลาในการศึกษารั้งนี้ แม้จะพบเพียง 2
ตัวอย่าง จาก 227 ตัวอย่าง และเป็นผลบวกแบบ border line ยังเป็นข้อมูลสำคัญบ่งชี้ให้เห็นว่าการ
บริโภคเนื้อปลาในประเทศไทย อาจมีความเสี่ยงที่จะได้รับพิษ ciguatoxin เช่นเดียวกัน แม้จะยังไม่มี
รายงานการระบาดของพิษนี้มาก่อนในประเทศไทย หรือประเทศไทยไม่ได้อยู่ในโซนของการพบพิษ
ชนิดนี้ แต่การสำรวจข้อมูลในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน พบผู้ป่วย 6 ราย ที่มีอาการคล้ายการได้รับพิษ

ชนิดนี้ (หัวข้อที่ 2) ทั้งนี้การสำรวจข้อมูลพบว่าปลาและเนื้อปลาที่บริโภคกันอยู่ในประเทศ ไม่ได้มาจากน่านน้ำของไทยเพียงอย่างเดียว มีทั้งจาก อินโดนีเซีย พม่า และไกลถึงโซมาเลีย เป็นต้น การเฝ้าระวังโรคทั้งจากสาเหตุโดยการสำรวจการพบพิษในเนื้อปลาและการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วย จะทำให้ประเทศไทยได้ข้อมูลในด้านระบาดวิทยาของ ciguatoxin เพิ่มมากขึ้น และสามารถหาทางลดหรือป้องกันการระบาดได้ต่อไปในอนาคต

2. การศึกษาลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่มีลักษณะคล้ายได้รับพิษ ciguatoxin

ในช่วงปี 2552 พบผู้ป่วย 6 ราย ที่มีอาการผิดปกติหลังการบริโภคปลา โดย 2 ราย เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร หลังการบริโภคปลาจากร้านอาหารแห่งเดียวกัน และมีผู้ป่วยอีก 3-2 รายที่มีอาการและได้รับการรักษาตัวที่โรงพยาบาล แต่มาสมาคมสืบข้อมูลประวัติได้ชัดเจน ส่วนอีก 4 ราย เป็นผู้ป่วยที่อาศัยในครอบครัวเดียวกัน และบริโภคปลาจากแหล่งเดียวกัน พร้อมกันที่ จังหวัดภูเก็ต โดยมีอาการโดยสรุปในตาราง

จากข้อมูลที่เคยมีรายงาน หลังการรับพิษ ciguatoxin จะมีอาการแสดงผิดปกติในระบบประสาท ภายในเวลาเป็นชั่วโมงถึง 2 สัปดาห์ หลังการบริโภค โดยมีอาการ ตั้งแต่คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อ่อนเพลีย คัน เวียนและปวดศีรษะ ปวดเมื่อย เย็นชาเจ็บตามปลายมือ-เท้า-รอบปาก และอาการแปรปรวนทางการรับรู้สักร้อน-เย็น มีความผิดปกติทางระบบประสาทอัตโนมัติ มีน้ำลายมาก หัวใจเต้นช้า ความดันโลหิตแปรปรวน กล้องเสียงตึบ รูม่านตาหดหรือขยายอย่างผิดปกติ อ่อนแรง แขน-ขาขยับไม่ได้ ทรงตัวไม่ได้ แขน-ขาสั่น หายใจไม่ออก ไม่รู้สึกตัวจนเข้าขั้นโคม่าหรือชัก

ผลที่ได้รับ

การตรวจวินิจฉัยไม่สามารถตรวจได้ทางห้องปฏิบัติการ แพทย์ผู้ทำการรักษาจะต้องวินิจฉัยตามอาการที่ปรากฏ ประกอบกับประวัติการบริโภคปลาเท่านั้น กรณีผู้ป่วยรายที่ 1 และ 2 นั้น มีอาการใกล้เคียงกับ การรับพิษ ciguatoxin มาก แต่แพทย์ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ไม่สามารถชี้ชัดได้ว่า ผู้ป่วยมีอาการจากสาเหตุใด การรักษาเป็นไปตามอาการและเมื่อผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นก็ให้กลับบ้านได้ กว่าที่ผู้เชี่ยวชาญจะวิเคราะห์หว่าอาจมีสาเหตุจาก ciguatoxin จากปลาที่ผู้ป่วยบริโภคก็เป็นเวลาหลายสัปดาห์ เมื่อลงไปสำรวจแหล่งขายปลาก็ไม่สามารถตรวจสอบปลาที่เป็นสาเหตุได้ เนื่องจากช่วงเวลาในการสอบสวนโรคและตอนเกิดโรคห่างกันนานเกินไป

สรุปและวิเคราะห์ผล

จากกรณีศึกษาผู้ป่วยทั้ง 6 ราย ที่มีอาการป่วยหลังการบริโภคอาหารที่มีปลาเป็นส่วนประกอบนั้น แม้ไม่สามารถชี้ชัดได้ว่า อาการของผู้ป่วยเกิดจากสาเหตุใด แต่จากลักษณะของชนิดปลา อาการที่เมื่อเกิดขึ้น แม้จะรุนแรงจนกระทบการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติ ซึ่งทุกรายมีหัวใจเต้นช้าลงและหายใจไม่ได้ในบางราย สามารถกลับเป็นปกติใน 24 ชั่วโมง และกลับบ้านได้ภายใน 48 ชั่วโมง ทำให้อาจแยกได้จากพิษปลาปักเป้า แพทย์จึงควรรู้จักอาการของโรคนี้เพิ่มมากขึ้น เพื่อให้ตระเตรียมแก้ไขภาวะผิดปกติทางหัวใจ กล้ามเนื้อที่อาจเกิดขึ้นอย่างทันเวลา และเพื่อส่งข้อมูลต่อยังหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการสอบสวนหาปลาต้นเหตุที่แท้จริงต่อไป และแม้ชุดตรวจจะมีความแม่นยำ

ไม่เท่ากับวิธีมาตรฐาน Mouse bioassay แต่ก็เป็นการที่สะดวก รวดเร็ว ที่ผู้บริโภคสามารถตรวจสอบเองได้ก่อนการบริโภคเนื้อปลา โดยเฉพาะปลาที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 3 กิโลกรัม/ตัว ที่อาจมีการสะสมพิษเป็นจำนวนมากกว่าปลานขนาดเล็ก

การร่วมการทดสอบดูแลในทุกภาคส่วน ผู้บริโภค แพทย์ผู้รักษา ผู้ป่วย และงานด้านประมง จะช่วยส่งผลให้การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของ ciguatera ในประเทศไทยสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดอาการของผู้ป่วย 6 รายที่สงสัยว่าได้รับพิษ ciguatera หลังการบริโภคปลา

Patient No.	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Year	2007	2007	2009	2009	2009	2009
Age (year)	20	50	9	24	29	34
Demographic	Bangkok	Bangkok	Phuket	Phuket	Phuket	Phuket
Gender	Female	Female	Male	Male	Female	Female
Onset of symptom	1 hr after meal (16 hrs prior to admission)	30 min after meal(6 hrs prior to admission)	2hrs after meal(4 hrs prior to admission)	2 hrs after meal(4 hrs prior to admission)	4 hrs after meal(4 hrs prior to admission)	2hrs after meal(3hrs prior to admission)
Symptoms	Perioral/hands /feet numbness, ataxia, vertigo, nausea & vomiting	Abdominal pain, diarrhea, perioral numbness, nausea & vomiting	Diarrhea, perioral & tongue numbness, nausea & vomiting	Abdominal pain, perioral /legs numbness, nausea, vomiting ,diarrhea	Diarrhea, Perioral/hands /feet numbness, nausea, vomiting, abdominal pain, cramping	Diarrhea, nausea, vomiting, abdominal pain, cramping, perioral/ hands/feet numbness
History of food taking	Sea bass with Chinese celery	Sea bass with Chinese celery	Red snapper fish curry	Red snapper fish curry	Red snapper fish curry	Red snapper fish curry
Underlying	No	Dyslipidemia	No	No	No	No
Vital signs	Normal	Respiratory failure	Hypotension	Normal	Hypotension	Hypotension
Conscious	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Neurosigns	Normal (improved)	Horseness of voice, quadriparesis with normal reflexes	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant
CBC	Normal	Normal	NA	NA	NA	Leukocytosis
Electrolyte	Normal	Normal	NA	NA	NA	NA
Ventilator support	No	Yes	No	No	No	No
Result	Recover in 1 day	Recover in 3 days	Recover in 1 day	Recover in 1 day	Recover in 1 day	Recover in 1 day

Output ผลงานตีพิมพ์

1. Abhinbhen Saraya, Thiravat Hemachudha, Chirapol Sintunawa, Pornpun Supavonwong, Kusuma Sawangpun, Supaluk Damrongsheaur, Supaporn Wacharapluesadee. Marine Fish Ciguatera toxin: Case series report and survey at fish markets in Bangkok. (submitted for preparation) [เอกสารแนบ 7]
2. Chirapol Sintunawa. Epidemic Marine Fish Ciguatera toxin: special appraisals on global warming and climate changes. (submitted for preparation) [เอกสารแนบ 8]

โครงการที่ 6 Distribution of Rabies Antigen and Inflammatory Response in Furious and Paralytic Rabies of Canine Origin

ผู้รับผิดชอบหลัก ศ.นพ.ชนพ ช่างโชติ

วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาการกระจายตัวของแอนติเจนต่อเชื้อพิษสุนัขบ้า และการอักเสบของระบบประสาทส่วนกลาง ในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า ชนิดคลุ้มคลั่งและอ่อนแรง

การดำเนินงาน

ได้ทำการตรวจชิ้นเนื้อสมองและไขสันหลังของสุนัขบ้าชนิดคลุ้มคลั่งและอ่อนแรง ที่ติดเชื้อมาตามธรรมชาติ ในระยะต่าง ๆ ของโรค อย่างละ 5 ตัว (รวม 10 ตัว) ตำแหน่งที่ศึกษาในสมองได้แก่ frontal lobe, parietal lobe, temporal lobe, occipital lobe, hippocampus, caudate, thalamus, cerebellum, midbrain, pons และ medulla จากนั้นทำการประเมินการอักเสบในบริเวณต่าง ๆ ของระบบประสาท รวมทั้งย้อมพิเศษอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อตรวจดูแอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้า จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์ผลการย้อมพิเศษ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (ที่พัฒนาโดย รศ. ดร. พรชัย พฤษภักทรานนท์ แห่ง คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) เพื่อบอกร้อยละของเซลล์ประสาทในแต่ละบริเวณที่ติดเชื้อ ปริมาณพื้นที่แอนติเจนเชื้อพิษสุนัขบ้าในเซลล์ประสาท และแอนติเจนที่กระจายตัวอยู่ในพื้นของสมอง (neuropil)

ผลที่ได้รับ

จากการศึกษา พบว่าการกระจายตัวของแอนติเจนต่อเชื้อพิษสุนัขบ้า และการอักเสบของระบบประสาทส่วนกลาง ในสุนัขที่เป็นบ้าทั้งสองชนิดในระยะแรกของโรค มีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยในกลุ่มคลุ้มคลั่ง จะพบแอนติเจนเป็นจำนวนมากตั้งแต่วัยแรกของโรค แต่พบการอักเสบของระบบประสาทค่อนข้างน้อย ในกลุ่มอ่อนแรง จะพบแอนติเจนในสมองได้น้อยมากหรือไม่พบเลยในระยะแรกของโรค โดยที่แอนติเจนส่วนใหญ่จะกระจุกตัวอยู่ที่ไขสันหลังแต่มีจำนวนน้อยกว่าที่พบในสุนัขบ้าคลุ้มคลั่งและมีการอักเสบมาก โดยเฉพาะที่ก้านสมอง

สรุปและวิเคราะห์ผล

ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาภาพถ่ายรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า ด้วยวิธีพิเศษ (Diffusion tensor imaging) [Adv Viral Res 2011] ปริมาณของไวรัส และการตอบสนองของชัชไคโมในสุนัขที่เป็นโรคในระยะแรกที่ทางกลุ่มผู้วิจัยได้รายงานไปแล้วก่อนหน้านี้ ใน J Neurovirol 2008 การอักเสบที่ก้านสมองสัมพันธ์กับปริมาณแอนติเจนไวรัส ที่พบน้อยในสมองสุนัขบ้าชนิดอ่อนแรง โดยอาจเป็นไปได้ว่าไวรัสที่ทำให้เกิดอาการบ้าแบบคลุ้มคลั่งและอ่อนแรงมีคุณสมบัติแตกต่างกัน โดยพวกที่ทำให้เกิด

อาการคลุ้มคลั่ง สามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว และเหนือการตรวจพบของเซลล์อักเสบที่ก้านสมอง ในขณะที่ไวรัสที่ทำให้อ่อนแรง กระจายตัวได้ช้ากว่า ถูกกีดขวางที่ก้านสมอง และกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ

Output ผลงานตีพิมพ์

Shuangshoti S, Thepa N, Phukpattaranont P, Ruangvejvoracha P, Jittmittraphap A, Intarut N, Tepsumethanon V, Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Canine furious and paralytic rabies: pattern differences in rabies antigen and inflammation localization in the central nervous system (submitted for publication). [เอกสารแนบ 9]

*หมายเหตุ โครงการนี้ เป็นส่วนเพิ่มเติมจากที่อยู่ในรายละเอียดของข้อเสนอโครงการ ได้เขียนรายงานเสร็จแล้ว ขณะนี้กำลังอยู่ในการพิจารณาเพื่อตีพิมพ์

OUTPUT OF RESEARCH

ผลงานทางวิชาการ

ผลงานตีพิมพ์ในวารสาร ระหว่าง ปี 2008-2011

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ (acknowledge สกว.)

- 1) Wacharapluesadee S, Sutipanya J, Damrongwatanapokin S, Phumesin P, Chamnanpood P, Leowijuk C, Hemachudha T. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. J Virol Methods. 2008 Aug;151(2):317-20. เอกสารแนบ 10
- 2) Wacharapluesadee S, Boongird K, Wanghongsa S, Ratanasetyuth N, Supavonwong P, Saengsen D, Gongal GN, Hemachudha T. A Longitudinal Study of the Prevalence of Nipah Virus in Pteropus lylei Bats in Thailand: Evidence for Seasonal Preference in Disease Transmission. Vector Borne Zoonotic Dis. 2009 Apr 29. เอกสารแนบ 11
- 3) Nopvichai C, Sanpavat A, Sawatdee R, Assanasen T, Wacharapluesadee S, Thorner PS, Shuangshoti S. PCR detection of mycobacterium tuberculosis in necrotizing non-granulomatous lymphadenitis using formalin-fixed paraffin-dmbedded tissue: A study in Thai patients. J Clin Pathol 2009 Sep; 62(9):812-5. เอกสารแนบ 12
- 4) Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Ante- and post-mortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests. Expert Rev Mol Diagn. 2010 Mar; .18-207:(2)10 Review. เอกสารแนบ 4
- 5) Shantavasinkul P, Tantawichien T, Wacharapluesadee S, Jeamanukoolkit A, Udomchaisakul P, Chattranukulchai P, Wongsaroj P, Khawplod P, Wilde H, Hemachudha T. Failure of rabies postexposure prophylaxis in patients presenting with unusual manifestations. Clin Infect Dis. 2010 Jan 1;9-77:(1)50 เอกสารแนบ 13
- 6) Saraya A, Wacharapluesadee S, Khawplod P, Tepsumethanon S, Briggs D, Asawavichienjinda T, Hemachudha T. A preliminary study of chemo- and cytokine responses in rabies vaccine recipients of intradermal and intramuscular regimens. Vaccine. 2010 Jun 23;28(29):4553-7. เอกสารแนบ 14
- 7) Wacharapluesadee S, Phumesin P, Supavonwong P, Khawplod P, Intarut N, Hemachudha T. Comparative detection of rabies RNA by NASBA, real-time PCR and conventional PCR. J Virol Methods. 2011 Aug;175(2):278-82. เอกสารแนบ 5
- 8) Natthapaninee Thanomsridetchai, Nilubon Singhto, Veera Tepsumethanon, Shanop Shuangshoti, Supaporn Wacharapluesadee, Supachok Sinchaikul, Shui-Tein Chen, Thiravat Hemachudha, and Visith Thongboonkerd. Comprehensive proteome analysis of hippocampus, brainstem and spinal cord from paralytic and furious dogs naturally infected with rabies. (submitted for publication) เอกสารแนบ 3

- 9) Shuangshoti S, Thepa N, Phukpattaranont P, Ruangvejvoracha R, Jittmittraphap A, Intarut N, Tepsumethanon V, Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Canine furious and paralytic rabies: pattern differences in rabies viral antigen and inflammation localization in the central nervous system. (submitted for publication) เอกสารแนบ 9
- 10) Supaporn Wacharapluesadee, Veera Tepsumethanon, Pornpun Supavonwong, Thongchai Kaewpom, Nirun Intarut, Thiravat Hemachudha. Detection of rabies viral RNA from non-neural specimens of rabies infected dogs by Taqman real-time RT-PCR. (submitted for publication) เอกสารแนบ 6
- 11) Phatthamon Virojanapirom, Pakamat Khawplod, Arthikaya Sawangwaree, Supaporn Wacharapluesadee, Thiravat Hemachudha, Kinjiro Morimoto and Akira Nishizono. BHK-cell adapted canine rabies virus variant: mutation in intergenic phosphoprotein and matrix protein gene non-coding region may confer higher neurovirulence in adult mice.) submitted for publication) เอกสารแนบ 1
- 12) Preecha Ruangvejvorachai, Chatchai Nopvichai, Veera Tepsumethanon, Supaporn Wacharapluesadee, Thiravat Hemachudha, Shanop Shuangshoti. Role of inhibitory neurons in the pathogenesis of paralytic and furious rabies in canine. (Submitted for publication) เอกสารแนบ 2
- 13) Abhinbhen Saraya, Thiravat Hemachudha, Chirapol Sintunawa, Pornpun Supavonwong, Kusuma Sawangpun, Supaluk Damrongsheaur, Supaporn Wacharapluesadee. Marine Fish Ciguatera toxin: Case series report and survey at fish markets in Bangkok. (submitted for preparation) เอกสารแนบ 7
- 14) Chirapol Sintunawa. Epidemic Marine Fish Ciguatoxin: special appraisals on global warming and climate changes. (submitted for preparation) เอกสารแนบ 8

ผลงานการเขียนตำรา

1. Israsena N, Mahaviahakanont A, Hemachudha T. Rabies virus infection and microRNAs. Adv Virus Res. 2011;79:329-44. เอกสารแนบ 14
2. Laothamatas J, Sungkarat W, Hemachudha T. Neuroimaging in rabies. Adv Virus Res. 2011;79:309-27. เอกสารแนบ 15
3. จิตสุภา ตริทิพย์สถิตย์, **ชนพ ช่างโชติ**. ศัลยพยาธิวิทยาโรคลมชัก (Surgical Pathology of Epilepsy). ใน: วีระเดช ศรีกิจวิไลกุล (บรรณาธิการ). การผ่าตัดโรคลมชัก (Textbook of Epilepsy Surgery). กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553: 144-170.

ผลงานตีพิมพ์อื่น ๆ ของคณะผู้วิจัย ระหว่าง กรกฎาคม 2551-กรกฎาคม 2554

1. Israsena N, Supavonwong P, Ratanasetyuth N, Khawplod P, Hemachudha T. Inhibition of rabies virus replication by multiple artificial microRNAs. *Antiviral Res.* 2009 Jul 29.
2. Laothamatas J, Wacharapluesadee S, Lumlertdacha B, Ampawong S, Tepsumethanon V, Shuangshoti S, Phumesin P, Asavaphatiboon S, Woraprukjaru L, Avihingsanon Y, Israsena N, Lafon M, Wilde H, Hemachudha T. Furious and paralytic rabies of canine origin: neuroimaging with virological and cytokine studies. *J Neurovirol.* 2008 Apr;14(2):119-29.
3. Wilde H, Hemachudha T, Jackson AC. Viewpoint: management of human rabies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 Oct;102(10):979-82.
4. Hemachudha T, Wilde H. Rabies. American College of Physicians. Physicians' Information and Education Resource (PIER). 2008. with continuing update [review, electronic version]
5. Wilde H, Wacharapluesadee S, Hemachudha T, Tepsumethanon V. Rabies. *Intern Encyclopedia of Public Health.* Editor HK Heggenhaugen. Academic Press. San Diego, Cal. 2008. [review]
6. Wilde H, Wacharapluesadee S, Hemachudha T, Tepsumethanon V. Rabies. In: *Encyclopedia of Public Health.* Elsevier. In Print 2008. [review]
7. Wilde H, Hemachudha T. Rabies Vaccines. In: *Travelers Vaccines.* Eds: J.N. Zuckerman and E.C.Jong. Decker 2nd edi 2008. [review]
8. Hemachudha T, Wilde H. Rabies. American College of Physicians. Physicians' Information and Education Resource (PIER). 2009. with continuing update [review, electronic version]
9. Hemachudha T, Wilde H and Wacharapluesadee S. Immune responses might guide therapeutic strategy. *World Neurology.* April 2010.
10. Wilde H, Khawplod P, Hemachudha T. Post-exposure rabies prophylaxis in patients with AIDS. *Vaccine.* 2009 Sep 25;27(42):5726-7
11. Dacheux L, Wacharapluesadee S, Hemachudha T, Meslin FX, Buchy P, Reynes JM, Bourhy H. *PLoS Negl Trop Dis.* More accurate insight into the incidence of human rabies in developing countries through validated laboratory techniques. 2010 Nov 30;4(11):e765. Review.
12. Phokaew C, Kowudtitham S, Subbalekha K, Shuangshoti S, Mutirangura A. LINE-1 methylation patterns of different loci in normal and cancerous cells. *Nucleic Acids Res* 2008 Oct; 36(17): 5704-12.
13. Subbalekha K, Pimkhaokham A, Pavasant P, Chindavijak S, Phokaew C, Shuangshoti S, Matangkasombut O, Mutirangura A. Detection of LINE-1s

- hypomethylation in oral rinses of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 2009 Feb; 45(2): 184-91.
14. Chaiwun B, Sukhamwang N, Ya-in C, Shuangshoti S. Bilateral low-grade B-cell lymphoma of the breast: A case report with cytologic, histologic and immunohistochemical studies. *J Med Assoc Thai* 2009 Jun; 92(6): 865-7.
 15. Keelawat S, Shuangshoti S, Kittikowit W, Lerdlum S, Thorner PS. Epithelioid sarcoma of the parotid gland of a child. *Pediatr Dev Pathol* 2009 Jul-Aug; 12(4):301-6.
 16. Treetipsatit J, Kittikowit W, Zielenska M, Chaipipat M, Thorner PS, Shuangshoti S. Mixed embryonal/alveolar rhabdomyosarcoma of the prostate in a young man: Report of a case with molecular genetic studies and literature review. *Pediatr Dev Pathol* 2009 Sep-Oct; 12(5):383-9.
 17. Shuangshoti S, Thorner PS, Ruangvejvorachai P, Saha B, Groshen S, Taylor CR, Malhotra S, Imam SA. J1-31 protein expression in astrocytes and astrocytomas. *Neuropathology* 2009 Oct; 29(5):521-7.
 18. Pruksakorn P, Shuangshoti S, Siwanuwatn R, Lerdlum S, Sunthornyothin S, Snabboon T. Craniofacial fibrous dysplasia. *Intern Med* 2010; 49(3):249-50.
 19. Tungtasana H, Shuangshoti S, Shuangshoti S, Kanokpanont S, Kaplan DL, Bunaprasert T, Damrongsakkul S. Tissue response and biodegradation of composite scaffolds prepared from Thai silk fibroin, gelatin and hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 2010 Dec; 21(12): 3151-62.
 20. Srikijvilaikul T, Lerdlum S, Tepmongkol S, Shuangshoti S, Lochareernkul C. Outcome of temporal lobectomy for hippocampal sclerosis in older patients. *Seizure* 2011 May; 20(4): 276-9.
 21. Ruchusatsawat K, Wongpiyabovorn J, Protjaroen P, Chaipipat M, Shuangshoti S, Thorner PS, Mutirangura A. Parakeratosis in skin is associated with loss of inhibitor of differentiation 4 via promoter methylation. *Hum Pathol* 2011 Jun 8. [Epub ahead of print]
 22. Shuangshoti S, Shuangshoti S, Nuchprayoon I, Kanjanapongkul S, Marrano P, Irwin M, Thorner PS. Neuroblastoma in Thai children: insight into the natural course of low risk tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2011 (in press).
 23. Nishizono A, Khawplod P, Ahmed K, Goto K, Shiota S, Mifune K, Yasui T, Takayama K, Kobayashi Y, Mannen K, Tepsumethanon V, Mitmoonpitak C, Inoue S, Morimoto K. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. *Microbiol Immunol*. 2008;9-243:(4)52
 24. Tepsumethanon V, Wilde H, Sitprija V. Ten-day observation of live rabies suspected dogs. In: Towards the elimination of rabies in Eurasia. Dodet B, Fooks AR, Muller T, Tordo N and the Scientific & Technical Department of the OIE (eds). *Dev Biol*. Basel,

- Karger, 2008, vol 131, pp .546-543
25. Tepsumethanon V, Lumlertdacha B, Mitmoonpitak C. Does history-taking help for predicting rabies diagnosis in dogs? Asian Biomedicine. Vol. 4 No. 5 October 2010; 811-815.
 26. Takashi Matsumoto; Kentaro Yamada; Kazuko Noguchi; Kantou Nakajima; Kenzo Takada; Pakamat Khawplod; Akira Nishizono Isolation and characterization of novel human monoclonal antibodies possessing neutralizing ability against rabies virus. Microbiology and immunology 2010;54(11):673-83.
 27. Shiota S, Mannen K, Matsumoto T, Yamada K, Yasui T, Takayama K, Kobayashi Y, Khawplod P, Gotoh K, Ahmed K, Iha H, Nishizono A. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies. J Virol Methods. 2009 Oct;62-58:(1)161
 28. Wilde H, Khawplod P, Hemachudha T. Post-exposure rabies prophylaxis in patients with AIDS. Vaccine. 2009 Sep 25;27(42):5726-7.
 29. Shiota S, Khawplod P, Ahmed K, Mifune K, Nishizono A. A pilot study on intradermal vaccination of Japanese rabies vaccine for pre-exposure immunization. Vaccine. 2008 Nov 25; .4-6441:(50)26
 30. Khawplod P, Wilde H, Sriaroon C, Chomchey P, Kamolthum T, Sitprija V. One or three intradermal injections within one week for rabies pre-exposure immunization. Dev Biol (Basel). 2008; .401-131:393
 31. Nishizono A, Khawplod P, Ahmed K, Goto K, Shiota S, Mifune K, Yasui T, Takayama K, Kobayashi Y, Mannen K, Tepsumethanon V, Mitmoonpitak C, Inoue S, Morimoto K. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. Microbiol Immunol. 2008 Apr; 9-243:(4)52
 32. Sintunawa C. Bangkok assessment report on climate change 2009. Bangkok: BMA, GLF and UNEP
 33. จิรพล สินธุนาวา. “ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงภาวะอากาศที่มีต่อประเทศไทย”, จันท์ฉาย คุมพล (บรรณาธิการ), ใน การเปลี่ยนแปลงภาวะอากาศ ความอยู่รอดของมวลมนุษย์. หน้า 103-109.กรุงเทพมหานคร: ปาเจรา, 2551.
 34. จิรพล สินธุนาวา. การเปลี่ยนแปลงภาวะอากาศ ความอยู่รอดของมวลมนุษย์ แปลจาก The Alas of Climate Change. จันท์ฉาย คุมพล (บรรณาธิการ), กรุงเทพมหานคร: ปาเจรา, 2551.
 35. ชีระวัฒน์ เหมะจุฑา และ สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี. โรคสมองอักเสบจากไวรัสชิคาโก.วารสารวงการแพทย์ ฉบับพิเศษ Virus Attack เชื้อก่อโรคแห่งทศวรรษ. ทวี โชติพิทยสุนนท์ บรรณาธิการ. กันยายน 2552. หน้า 17-19.

เอกสารประกอบการประชุมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย: (Abstract-Proceeding)

1. ชีระวัฒน์ เหมะจุฑา Emerging Viral Encephalitis in Global Warming Condition: A Triple Threat Approach การประชุมวิชาการ Integrated Neuroscience: from Basic to Clinical วันที่ 20 พฤษภาคม 2552 จัดโดย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ชีระวัฒน์ เหมะจุฑา " Emerging Viral Encephalitis" การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 18 สมาคมไวรัสวิทยา (ประเทศไทย) 21 พ.ย. พ.ศ.2551 ณ ห้องภาณุรังษี บอลรูม โรงแรมรอยัลริเวอร์
3. ชีระวัฒน์ เหมะจุฑา " Emerging Viral Encephalitis in Global Warming Condition" การประชุมวิชาการร่วมระหว่างคณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ม.มหิดล และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ 22 มิ.ย.52 ณ โรงแรมเซ็นทารา กรุงเทพฯ
4. T.Hemachudha. et al. Pathophysiologic studies of rabies in dogs and role of artificial microRNA in inhibiting viral replication. Journal of Neurological Sciences. 2009; PL03-MO-01:s1-2. Plenary Abstract in 19 th World Congress of Neurology. 24-30 October 2009. Bangkok Thailand.
5. Thiravat Hemachudha. Rabies; Can it be cure ? การประชุมวิชาการ EID 2010-Thailand Conference on Emerging Infectious and Neglected Diseases วันที่ 3-4 มิถุนายน 2553 จัดโดย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
6. Thiravat Hemachudha. Pre-exposure rabies vaccination (PrEP) for Children Pros and cons of PrEP presented by Thiravat Hemachudha, Head, WHO collaborating centres for research and training on viral zoonoses, Chulalongkorn University, Bangkok, and costeffectiveness of PrEP presented on behalf of Chirapol Sinthunawa *et al*, Faculty of environmental science, Mahidol University, Thailand by Thiravat Hemachudha. REPORT OF THE WHO/GATES FOUNDATION CONSULTATION ON HUMAN AND DOG RABIES PREVENTION AND CONTROL ANNECY, FRANCE, 7-9 OCTOBER 2009
7. Thiravat Hemachudha, Lyssavirus pathogenesis, host immune response and human disease therapy. การประชุม RABIES IN ASIA CONFERENCE (RIA CON 2009) Focus on "THE ELIMINATION OF RABIES IN THE ASIA AND THE WORLD
8. สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี " Molecular Diagnosis of Infectious Disease: Viral CNS Infection" การอบรมระยะสั้น ประจำปี 2552 เรื่อง "Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Conventional Microbiology Lab, Serology & Molecular Diagnosis" วันที่ 16 ก.พ.52 จัดโดย สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย ณ รพ.ราชวิถี
9. สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี Molecular diagnosis of infectious disease: Viral CNS infection การประชุมวิชาการ Integrated Neuroscience: from Basic to Clinical วันที่ 20 พฤษภาคม 2552 จัดโดย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. Supaporn Wacharapulsadee. Discovery of Nipah virus in Thailand. การประชุมวิชาการ EID 2010-Thailand Conference on Emerging Infectious and Neglected Diseases วันที่ 3-4 มิถุนายน 2553 จัดโดย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
11. ชนพ ช่างโชติ. ความท้าทายทางประสาทพยาธิวิทยา. ใน: ญัฐ พสุธารชาติ, สุธิดา บุญยะไว โรจน์, นิจศรี ชาญณรงค์ (บรรณาธิการ). (Basic and Clinical Neuroscience 2. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553: 259-63.

การสร้างบุคลากรการวิจัย

1. น.ส.ณัฐภาณินี ถนอมศรีเดชชัย

ระดับปริญญาเอก สาขาชีวเวชศาสตร์(สหสาขาวิชา)บัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาจารย์ที่ปรึกษา ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุทา
จบกำลังศึกษา ระดับปริญญาเอก

2. พญ.อภิษฎา เพ็ญ สาระยา

แพทย์ประจำบ้านประสาทวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุทา
จบศึกษา ระดับปริญญาโท และวุฒิบัตรผู้เชี่ยวชาญประสาทวิทยา

3. น.ส.นิตาชล เทพา

อาจารย์ที่ปรึกษา ศ.นพ.ชนพ ช่างโชติ
จบการศึกษา ระดับปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

4. น.ส.พัทธมน วิโรจนภิรมย์

ระดับปริญญาเอก สาขาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาจารย์ที่ปรึกษา ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุทา
กำลังศึกษา ชั้นปีที่ 5 นักศึกษาทุน คปก.

5. ดร.เอกพล มหาวิหกันนท์

นักศึกษาหลังปริญญาเอก
อาจารย์ที่ปรึกษา ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุทา

6. นส.อกนิษฐ์ จิตต์มิตรภาพ

ระดับปริญญาเอก สาขาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาจารย์ที่ปรึกษา ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุทา

กำลังศึกษา ชั้นปีที่ 2

7. น.สพ.แสงชัย ยิ่งศักดิ์มงคล

ระดับปริญญาเอก สาขาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาจารย์ที่ปรึกษา ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา

กำลังศึกษา ชั้นปีที่ 1

8. ขนิษฐา สุวรรณศรีนนท์

แพทย์ประจำบ้านประสาทวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา

กำลังศึกษา ชั้นปีที่ 1

9. น.สพ.วัลลภ ลิขิตสุนทรวงศ์

ระดับปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาจารย์ที่ปรึกษา ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา

กำลังศึกษา ชั้นปีที่ 1

ประโยชน์ของงานวิจัยในเชิงสาธารณะ

โดย ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา

1. งานเผยแพร่ความรู้วิชาการ: ผลงานตีพิมพ์ในสื่อสิ่งพิมพ์-สัมภาษณ์

บทความในสื่อสิ่งพิมพ์

- บทความเรื่อง ได้ปยาเป็นกำ...ก็ไม่รอด

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 11 สิงหาคม 2551

- บทความเรื่อง ...แล้วเราก็ไม่เข้าใจกัน

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 25 สิงหาคม 2551

- บทความเรื่อง ‘ผ่าสมอง’ นักการเมืองไทย

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 16 กันยายน 2551

- บทความเรื่อง ปรากฏการณ์ทางสมองของคนไทย : อาการคลื่นไส้ อาเจียน และ
สะอิดสะเอียน

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 9 ตุลาคม 2551

- บทความเรื่อง อัจฉริยะ-ชั่วร้าย คุณสมบัติทางสมองของบุรุษ/สตรีหลังฉาก

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 13 ตุลาคม 2551

- บทความเรื่อง หัวใจคุณทำด้วยอะไร (ตอนที่ 1)

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันอังคาร ที่ 28 ตุลาคม 2551

- บทความเรื่อง หัวใจคุณทำด้วยอะไร? (ตอนที่ 2) กำเนิดอาหารธุรกิจ (อำมหิต)

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 10 พฤศจิกายน 2551

- บทความเรื่อง หัวใจคุณทำด้วยอะไร? (ตอนที่ 3) กำเนิดอาหารธุรกิจอำมหิต: โฆษณา

ล้ำลึก พ่วงวิทยา-มารยาศศาสตร์

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 24 พฤศจิกายน 2551

- บทความเรื่อง แม่จำ....หนูกลัว

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ที่ 8 ธันวาคม 2551

- บทความเรื่อง คิดสัณนิตก่อนสั่งและใช้ยา (ตอนที่ 1)

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 22 ธันวาคม 2551

- บทความเรื่อง คิดสัณนิตก่อนสั่งและใช้ยา (ตอนที่ 2)

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ที่ 12 มกราคม 2552

- บทความเรื่อง คุณอนันต์แฝงโทษมหันต์ (ถ้าไม่ระมัดระวัง) ของยาลดไขมันในเลือด

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 26 มกราคม 2552

- บทความเรื่อง การรักษาด้วยคีเลชั่น.....ดีจริงหรือมั่วแน่

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 16 กุมภาพันธ์ 2552

- บทความเรื่อง แหกตา.....ชั้นเทพ

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 2 มีนาคม 2552

- บทความเรื่อง สุรา.....เม...ระยะ
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 16 มีนาคม 2552
- บทความเรื่อง งานนี้ได้มีเฮ..เซลล์สมองงอกใหม่ได้
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 30 มีนาคม 2552
- บทความเรื่อง การรักษาแบบองค์รวมเพื่อสุขภาพประเทศไทย
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 13 เมษายน 2552
- บทความเรื่อง ความเชื่อและศรัทธาเป็นยานานวิเศษ
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 27 เมษายน 2552
- บทความเรื่อง ขั้วพัฒนาการเชื้อ ใช้หัวัดหมู สู่ระดับที่ 5 ติดเชื้อ คนสูดคน
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันพุธ ที่ 29 เมษายน 2552
- บทความเรื่อง ถมเท่าไรก็ไม่พอ.....ถ้าเอาแต่แก้ก็แพ้แต่ยกแรก
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 18 พฤษภาคม 2552
- บทความเรื่อง มียารักษาโรคอัลไซเมอร์จริงหรือ ? (ตอนที่ 1)
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 1 มิถุนายน 2552
- บทความเรื่อง ยารักษาโรคอัลไซเมอร์มีจริงหรือ (2) ตอน : เเคราะห์ซ้ำกรรมชด.....
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันอังคาร ที่ 16 มิถุนายน 2552
- บทความเรื่อง อนาคตสาธารณสุข “ปฐมภูมิ” ท่ามกลางวิกฤติโลก (2)
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 24 สิงหาคม 2552
- บทความเรื่อง แนวรับหวัด 2009 พังเพราะการเมือง
หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ วันเสาร์ ที่ 1 สิงหาคม 2552
- บทความเรื่อง คุณรู้จักโรค GBS ที่เกิดจากวัคซีนไขหวัดใหญ่หรือยัง?
หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ วันอังคาร ที่ 15 กันยายน 2552
- บทความเรื่อง คุณรู้จักโรค GBS ที่เกิดจากวัคซีนไขหวัดใหญ่หรือยัง?
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 21 กันยายน 2552
- บทความเรื่อง หยุด-อย่าขยับ
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันอังคาร ที่ 29 กันยายน 2552
- บทความเรื่อง แอสไพรินไม่....ไวอากร้าใช่ (เลย)
หนังสือพิมพ์ ไทยรัฐ วันศุกร์ ที่ 20 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง สวทช.หนุนนักวิจัยจุฬาฯ พัฒนาวิธีการทำหมันรูปแบบใหม่
สำนักข่าวแห่งชาติ กรมประชาสัมพันธ์ วันพุธที่ 25 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง จุฬาค้นพบวิธีรักษาพิษสุนัขบ้า
หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ วันพฤหัสบดี ที่ 26 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง ปี 2010 “พิษสุนัขบ้า” จะหมดไป ถ้าคนปรับนิสัยเลี้ยงหมา-ควมคุม
ประชากร
ผู้จัดการออนไลน์ วันพฤหัสบดี ที่ 26 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง นักวิจัยไทยเจ๋งคิดยาฉีดทำหมันสุนัขแทนผ่าตัด
หนังสือพิมพ์แนวหน้า วันพฤหัสบดี ที่ 26 พฤศจิกายน 2552

- บทความเรื่อง หวัดระลอกใหม่ตายเพิ่ม 2 ราย
หนังสือพิมพ์มติชน วันพฤหัสบดี ที่ 26 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง นักวิจัยไทยประสบความสำเร็จทำหมันสุนัขเพศผู้โดยใช้ยาฉีด
หนังสือพิมพ์ ไทยรัฐ วันพฤหัสบดีที่ 26 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง วิจัยคุม “โรคพิษสุนัขบ้า” คืบ
โลกวันนี้ วันพฤหัสบดี ที่ 26 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง จุฬายฯ ค้นพบวิธีรักษาพิษสุนัขบ้า
ไทยรัฐออนไลน์ วันศุกร์ ที่ 27 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง พบวิธี “ทำหมัน” ใหม่ลดทารุณกรรมสุนัข
หนังสือพิมพ์ มติชน วันศุกร์ที่ 27 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง ผลโลกร้อนน่าห่วง-หวัด 2009 รอบ 2 พบเป็นแล้วซ้ำได้อีก
สำนักข่าวไทย MCOT.NET วันศุกร์ ที่ 27 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง หอย-ปลา 8 ชนิด มีพิษกินแล้วตาย
หนังสือพิมพ์ คม ชัด ลึก วันเสาร์ที่ 28 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง แพทย์เตือนโรคอุบัติใหม่ระบาดปี 2553
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันเสาร์ ที่ 28 ธันวาคม 2552
- บทความเรื่อง จับตา “ไข้สมองอักเสบ” ระบาดปี 2553
หนังสือพิมพ์ ไทยรัฐ วันเสาร์ที่ 28 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง เตือนปี 2553 ระวังไข้สมองอักเสบ
หนังสือพิมพ์ มติชน วันเสาร์ 28 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง นอกจากปอดบวมยังพบ “สมองอักเสบ” ได้ในผู้ป่วยหวัด 2009
ผู้จัดการออนไลน์ วันอาทิตย์ที่ 29 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง จากหวัดใหญ่ 2009อะไรจะมามากใน 2010?
หนังสือพิมพ์ ไทยรัฐ วันจันทร์ที่ 30 พฤศจิกายน 2552
- บทความเรื่อง รหัสสัญญาณอันตราย “ไวรัสอุบัติใหม่” ภัยโรคร้าย “โลกร้อน”
หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ วันศุกร์ ที่ 4 ธันวาคม 2552
- บทความเรื่อง แพทย์จุฬายฯเตือนไข้สมองอักเสบติดไวรัส “นิปาห์” จากค้างคาวแม่ไก่
แนวหน้า วันอาทิตย์ ที่ 6 ธันวาคม 2552
- บทความเรื่อง ระวัง “โรคร้าย” ปีขาล
โลกวันนี้ วันจันทร์ ที่ 7 ธันวาคม 2552
- บทความเรื่อง ว่าด้วยเรื่องหมาและไขหมา
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 21 ธันวาคม 2552
- บทความเรื่อง ทางที่เลือกไม่ได้
หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 11 มกราคม 2553
- บทความเรื่อง จูบใครคิดว่าจะสำคัญ
หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ 1 กุมภาพันธ์ 2553
- บทความเรื่อง เกิดอะไรขึ้น..... ณ ช่วงเวลาที่สุขของที่สุด

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 15 กุมภาพันธ์ 2553

- บทความเรื่อง บัญญัติ 10 ประการ รู้ทันพิษสุนัขบ้า

หนังสือพิมพ์ ไทยรัฐ วันศุกร์ ที่ 26 กุมภาพันธ์ 2553

- บทความเรื่อง ความเข้าใจผิดเกี่ยวกับโรคพิษสุนัขบ้า

www.cueid.org มี.ค.2553

- บทความเรื่อง บทความลมแดด! ฮีตสโตรก มันมากับความร้อน

หนังสือพิมพ์ ไทยรัฐ วันพฤหัสบดี ที่ 8 เมษายน 2553

- บทความเรื่อง ร้อนนี้ เริ่มตึมน้ำเยอะๆและใส่แว่นตาตากันเถอะ

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 19 เมษายน 2553

- บทความเรื่อง ความจริงที่ไม่มีใครยอมพูดเกี่ยวกับ "ยาสมองเสื่อม"

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 17 พ.ค.2553

- บทความเรื่อง โฆษณาเกินจริง

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 23 พ.ค.2553

- บทความเรื่อง คากากันสมองเสื่อม

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ ที่ 6 มิ.ย.2553

- บทความเรื่อง เห็นค่ายา แทบสลับ

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ ที่ 13 มิ.ย.2553

- บทความเรื่อง ยิ่งอ้วน.... (สมอง) ยิ่งหด

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ ที่ 27 มิ.ย.2553

- บทความเรื่อง วิตามินเสริม เชยแล้วยังตายอีกต่างหาก

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ ที่ 11 ก.ค.2553

- บทความเรื่อง เขี้ยวของรัฐ : ระบบการแพทย์-สาธารณสุขของไทย

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันพุธ ที่ 11 ส.ค.2553

- บทความเรื่อง ดีเลิศประเสริฐแถมยังฟรี.....มีจริงหรือ

หนังสือพิมพ์ มติชนรายวัน วันอาทิตย์ 15 ส.ค.2553

- บทความเรื่อง “ WHO ตรวจสอบเบื้องต้น- เบื้องหลังยา (Tamiflu (Oseltamivir) ดีจริงหรือ?

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ จันทร์ ที่ 23 ส.ค.2553

- บทความเรื่อง มิเห็นโรงศพไม่หลั่งน้ำตา

หนังสือพิมพ์ มติชนรายวัน วันอาทิตย์ ที่ 29 ส.ค.2553

- บทความเรื่อง บทความเรื่อง อิทธิฤทธิ์อาหารเสริม

หนังสือพิมพ์ มติชนรายวัน วันอาทิตย์ ที่ 12 ก.ย.2553

- บทความเรื่อง กว่าจะคลั่งถึงตอ มณีป่วยเบาหวาน

หนังสือพิมพ์ ไทยรัฐออนไลน์ วันอาทิตย์ 26 ก.ย.2553

- บทความเรื่อง 10 ปี ศูนย์ ' โรคทางสมอง รพ.จุฬาฯ' สู่ศูนย์ร่วมมือ WHO 'ไวรัสสัตว์สู่คน'

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 27 ก.ย.2553

- บทความเรื่อง กลูโคซามีนไม่บำรุงข้อเข่า แปะกัวยไม่ป้องกันสมองเสื่อม

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ ที่ 3 ต.ค.2553

- บทความเรื่อง ความดัน...ดันไม่จริง.....อย่าเพิ่งรีบให้ยา

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ ตุลาคม 2553

- บทความเรื่อง สกปรกไว้หน่อย....ก็ไม่เลวนะครับ

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ ตุลาคม 2553

- บทความเรื่อง วิตามิน E เสี่ยงเส้นเลือดแตกในสมอง

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ที่ 14 พฤศจิกายน 2553

- บทความเรื่อง น้ำมันปลาสิ้นท่าก็คราวนี้

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ ธันวาคม 2553

- บทความเรื่อง เรื่องลึก (ลับ) ของยาในประเทศไทย

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ที่ 26 ธันวาคม 2553

- บทความเรื่อง ขี้ยาโปรดฟังทางนี้

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ที่ 16 มกราคม 2554

- บทความเรื่อง สารก่อมะเร็งในบุหรี่ยี่.....มีมากกว่าที่คิด

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 10 มกราคม 2554

- บทความเรื่อง วิตามินบี 12- ทางออกสำหรับสมองเสื่อมอัลไซเมอร์?

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 24 มกราคม 2554

- บทความเรื่อง ไชมันดี HDL ที่ว่าแน่ ยังแยได้

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ กุมภาพันธ์ 2554

- บทความเรื่อง ยาแก้ปวดแรงฤทธิ์ แต่มีพิษต่อหัวใจและสมอง

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ กุมภาพันธ์ 2554

- บทความเรื่อง ลับ ลวง พราง โกหกคำโตทางการแพทย์

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ที่ 20 กุมภาพันธ์ 2554

- บทความเรื่อง คำหาว่าขึ้นเป็นบ้า

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ กุมภาพันธ์ 2554

- บทความเรื่อง “ ดีท็อกซ์ประเทศไทยดีไหม ? ”

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันพุธ ที่ 7 มีนาคม 2554

- บทความเรื่อง ชาย 2 หญิง 1...คำแนะนำใหม่?

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ที่ 13 มีนาคม 2554

- บทความเรื่อง ดีท็อกซ์ประเทศไทยดีไหม? “ หยุดกรองคนดีออกจากกระบบ (2)”

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 26 มีนาคม 2554

- บทความเรื่อง ดีท็อกซ์ประเทศไทย

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ที่ 3 เมษายน 2554

- บทความเรื่อง ระบบการศึกษาไทย.....นับหนึ่งใหม่เลยดีไหม

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ที่ 24 เมษายน 2554

- บทความเรื่อง ดีท็อกซ์ประเทศไทย “ สัมผัสฟ้า....จับน้ำตา คือ ปรัชญาการวิจัย ”

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันพุธ ที่ 25 พฤษภาคม 2554

- เรยา...ความเก็บกด...บทสะท้อนถึงความแตกแยก

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ พฤษภาคม 2554

- ดีท็อกซ์ประเทศไทย (3) ระบบการศึกษา.....นับหนึ่งใหม่ยังไม่สาย (แต่ต้องรออีก 25 ปี)

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ พฤษภาคม 2554

- บทความเรื่อง จริงหรือ? ประเทศไทยจะเจริญ ถ้า.....

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ที่ 5 มิถุนายน 2554

- บทความเรื่อง ดีท็อกซ์ประเทศไทย “ สาธารณสุข” แผนยอด วิสัยทัศน์เยี่ยมแต่.....

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันพุธ ที่ 8 มิถุนายน 2554

- จะรอดมัยเนี่ย.....ประเทศ

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ มิถุนายน 2554

- กล้าพอไหม....รัฐมนตรีคนนอกไม่ใช่นักการเมือง

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ มิถุนายน 2554

- ที่นี่ประเทศไทย....โกง-อมได้แม้แต่ของบริจาค

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ กรกฎาคม 2554

- กลยุทธ์การตลาด.....ชี้ชะตาประเทศ

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ กรกฎาคม 2554

- เรียนหนังสือ แล้วสนุก.....มีจริงหรือ?

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ กรกฎาคม 2554

- คัดลอกกรอบ : โรคติดเชื่ออุบัติใหม่ – อุบัติซ้ำ

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ สิงหาคม 2554

- บทความเรื่อง ดีท็อกซ์ประเทศไทย “ คัดลอกกรอบ : โรคติดเชื่ออุบัติใหม่ – อุบัติซ้ำ ”

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันพุธ ที่ 3 สิงหาคม 2554

สัมภาษณ์

- สัมภาษณ์เพื่อออกอากาศในรายการ " ชีวิต ชีวา" เรื่อง โรคไข้มองอักเสบ JE

ออกอากาศ วันเสาร์ที่ 1 มีนาคม 2551 ทางไทยทีวีสีช่อง 3

- ร่วมสนทนาในประเด็น “โรคพิษสุนัขบ้า” วัน 24 มีนาคม 2552 ในรายการ Goodlife ออกอากาศสด ทางสถานีโทรทัศน์ ASTV FREE TV ผ่านดาวเทียม ช่อง Happy variety Channel

- สัมภาษณ์เพื่อออกอากาศในรายการ " ชีวิต ชีวา" เรื่อง โรคพิษสุนัขบ้า

ออกอากาศ วันเสาร์ที่ 5 เมษายน 2551 ทางไทยทีวีสีช่อง 3

- สัมภาษณ์เพื่อออกอากาศในรายการ " ชีวิต ชีวา" เรื่อง โรคเริ่มขึ้นสมอง

ออกอากาศ วันเสาร์ที่ 9 สิงหาคม 2551 ทางไทยทีวีสีช่อง 3

- สัมภาษณ์สดทางโทรศัพท์ ประเด็นเรื่องไวรัสจาก " สัตว์สู่ คน" ตันตอสารพัดโรคติดเชื้ออุบัติใหม่

วันอังคาร ที่ 12 พ.ค.52 จากสถานีวิทยุกระจายเสียง ม.นคร

- สัมภาษณ์สารคดีเชิงข่าว เรื่อง " โรคระบาด ไข้หวัดใหญ่ 2009"

วันพุธ ที่ 20 พ.ค.52 สถานีโทรทัศน์ทีวีไทย รายการเปิดปม

- สัมภาษณ์เพื่อนำข้อมูลประกอบสารคดีข่าว ประเด็น คนไทยใช้ยาที่ไม่เหมาะสม และถูกทดลองยาจากต่างประเทศหรือไม่

วันศุกร์ ที่ 26 มิถุนายน 2552 จากสถานีโทรทัศน์ทีวีไทย รายการวาระประเทศไทย

- ร่วมสัมภาษณ์พูดคุยในประเด็น เรื่อง “การระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ และแนวทางปกป้องไม่ให้ไข้หวัดระบาดเพิ่มมากขึ้น”

วันศุกร์ ที่ 10 กรกฎาคม 2552 จาก สำนักข่าวไทย ช่อง 9 ออกอากาศสด รายการเช้า ข่าว ช่น

บทความในวารสาร

- บทความเรื่อง ความเข้าใจผิดเกี่ยวกับโรคพิษสุนัขบ้า โดยธีระวัฒน์ เหมะจุฑา และ สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี วารสาร สรรพสารDNA เมษายน 2553 หน้า32
- บทความเรื่อง โลกร้อน ซ่อนโรคร้าย จัปตภัยสาธารณะจากสัตว์และเชื้อโรคกลายพันธุ์วารสารวงการแพทย์ หน้า 20-24

โดย ดร.สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี

- ข่าวเรื่อง วิจัยโรคสมองอักเสบติดจากไวรัสสุนัขบ้า ค้างคาวหนังสือพิมพ์ไทยรัฐ ฉบับวันที่ 11 มกราคม 2553
- ข่าว เรื่อง เตือนสมองอักเสบจากค้างคาวแม่ไก่หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ ฉบับวันที่ 9 ธันวาคม 2552
- บทความเรื่อง ความเข้าใจผิดเกี่ยวกับโรคพิษสุนัขบ้า โดยธีระวัฒน์ เหมะจุฑา และ สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี วารสาร สรรพสารDNA เมษายน 2553 หน้า32
- ร่วมสนทนาในประเด็น “โรคพิษสุนัขบ้า” วัน 24 มีนาคม 2552 ในรายการ Goodlife ออกอากาศสดทางสถานีโทรทัศน์ ASTV FREE TV ผ่านดาวเทียม ช่อง Happy variety Channel
- สัมภาษณ์เพื่อออกอากาศในรายการ ที่นี่...ทีวีไทย เรื่อง นิปาห์ไวรัส ออกอากาศ วันที่ 4 มิถุนายน 2552 ทางทีวีไทย

2.การจัดประชุมเพื่อนำเสนอผลงานวิจัย

1). การจัดเสวนาวิชาการ “โลกร้อน โรคภัย โรคติดต่อที่ต้องติดตาม ”

วันที่จัด	27 พฤศจิกายน 2552
สถานที่	โรงแรมสยามซิตี้ กรุงเทพฯ
กลุ่มเป้าหมาย	สื่อมวลชน นักวิชาการ รวม 70 คน
วิธีการดำเนินการ	การสัมมนาในรูปแบบการบรรยายวิชาการ / แลกเปลี่ยน ความคิดเห็น
ผลที่ได้รับ	1. ผลงานวิจัยได้รับการเผยแพร่แก่นักวิชาการและเกิดการต่อยอดสู่กลุ่มอื่นๆ อาทิ กรมปศุสัตว์ 2. ผลงานวิจัยได้รับการเผยแพร่สู่ประชาชนทั่วประเทศ ผ่านสื่อมวลชนที่รับเชิญมาฟังการบรรยาย ในสื่อหลายแขนง หนังสือพิมพ์ วารสาร วิทยุ โทรทัศน์

2). การจัดสัมมนาวิชาการเรื่อง **Advanced Research in Rabies**

วันที่จัด	23 สิงหาคม 2554
สถานที่	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
กลุ่มเป้าหมาย	อาจารย์ นักวิจัย นักศึกษา นักวิชาการ รวม 100 คน
วิธีการดำเนินการ	การสัมมนาในรูปแบบการบรรยายวิชาการ / แลกเปลี่ยน ความคิดเห็น
ผลที่ได้รับ	1. ผลงานวิจัยได้รับการเผยแพร่แก่นักวิชาการ 2. การสร้างเครือข่ายงานวิจัยด้านโรคสัตว์สู่คน

3. การเผยแพร่ความรู้ วิทยากร บรรยาย โปสเตอร์

3.1 ศ.นพ.ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา

ว/ด/ป	รายการ(หลักสูตร/โครงการที่อบรม)	หน่วยงานที่จัด
8 ก.ค.51	จัดงานอบรมความรู้ เรื่อง โรคสมองอักเสบอุบัติใหม่ แก่อาสาสมัครสาธารณสุขหมู่บ้าน อบต.วัดหลวงชลบุรี	ศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง
7 ส.ค.51	ผู้ร่วมอภิปรายประชุมวิชาการ เรื่อง " Research Misconduct" ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	โครงการ Thai CERTC Consortium จุฬาฯ
25 ส.ค.51	บรรยาย อบรมอายุรศาสตร์ระยะสั้น ครั้งที่ 27 : Evolving Trends in Medicine Symposium:Evolving trends in neurology คณะแพทยฯ จุฬาฯ	ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ
10 ก.ย.51	วิทยากรการประชุมกลุ่มย่อยในหัวข้อ เรื่อง " การหลอม รวมของวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับผลกระทบ ทางจริยธรรม กฎหมายและสังคม : การมองไปข้างหน้าเพื่อเตรียมโครงสร้างพื้นฐานทางกฎหมายรองรับ " ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์	สำนักงานกิจการยุติธรรม
11 ก.ย.51	วิทยากรบรรยายเรื่อง " Human Rabies:Diagnosis and Treatment" ณ โรงแรมนารายณ์ กทม.	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
29 ต.ค.51	วิทยากรร่วมอภิปรายเรื่อง " Medicine in the Future" ในหัวข้อเกี่ยวกับ " Innovation and medicine in the future" (นวัตกรรม กับ การแพทย์ในอนาคต) เนื่องในวัน " ปิยมหาราชล้าลึก" คณะแพทยฯ จุฬาฯ	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
17-20 พ.ย.51	The fifth meeting of the Asian Rabies Expert Bureau (AREB) บรรยายหัวข้อ Experience in coma therapy for rabies cases ณ เมือง Nha Trang ประเทศเวียดนาม	The Asian Rabies Expert Bureau (AREB)
21 พ.ย.51	วิทยากรบรรยายเรื่อง " Emerging Viral Encephalitis " ในงานประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 18 พศ.2551 ณ ห้องภาณุรังษี บอลล์รูม รร.รอยัลริเวอร์	สมาคมไวรัสวิทยา (ประเทศไทย)
9 ม.ค.52	วิทยากรในงานประชุมเสวนาทางวิชาการเพื่อเผยแพร่ความรู้ เรื่อง Ebola-Reston Virus บรรยายในหัวข้อ " ความเป็นไปได้ของการพบเชื้อ อีโบล่า ในประเทศไทย และแนวทางการเฝ้าระวัง	ฝ่ายวิชาการและศูนย์วิจัยโรคอุบัติใหม่ อุบัติซ้ำในสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ

19 ก.พ.52	วิทยากรร่วมอภิปรายในหัวข้อ "แนวทางการจัดการร่วม... สู่ระบบการเฝ้าระวังที่พึงประสงค์" ในเวทีวิชาการ "การเฝ้า ระวังโรคติดต่ออุบัติใหม่ที่พึงประสงค์ของประเทศไทย" ณ รร.รามการ์เด้นส์ กทม.	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี แห่งชาติ (สวทช.)
ว/ด/ป	รายการ(หลักสูตร/โครงการที่อบรม)	หน่วยงานที่จัด
20 ก.พ.52	ร่วมเสวนาเรื่อง "GMOs : ประเทศไทยพร้อมแล้วหรือ ยัง?" ณ โรงแรมสยามซิตี้	มูลนิธิบัณฑิตยสภา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทย
24 ก.พ.52	อภิปราย ข้อคิดเห็นในการดูแลรักษา การป้องกัน ควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าเพื่อนำไปสู่พื้นที่ปลอดโรคพิษ สุนัขบ้า รูปแบบ Round table discussion	กรมควบคุมโรค
3 มี.ค.52	วิทยากรให้ความรู้แก่แพทย์ประจำบ้านกลุ่มงาน ประสาทวิทยา เรื่อง Viral infection in CNS	สถาบันประสาทวิทยา
10 มี.ค.52	วิทยากรให้ความรู้แก่แพทย์ประจำบ้าน กลุ่มงาน ประสาทวิทยา เรื่อง Rabies	สถาบันประสาทวิทยา
17 มี.ค.52	วิทยากรในการบรรยายเรื่อง " Human Rabies and Laboratory Investigation for Rabies "	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
19 มี.ค.52	วิทยากรนำเสนอข้อมูล "ความเสี่ยงและผลกระทบต่อ สุขภาพ จากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศและ มาตรการป้องกัน ด้านสุขภาพใน 10 ปีข้างหน้า" ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์	สำนักงานนโยบายและแผน ทรัพยากรธรรมชาติและ สิ่งแวดล้อม กระทรวง ทรัพยากรธรรมชาติและ สิ่งแวดล้อมและองค์กรภาคี
28 เม.ย.52	วิทยากร "Emerging CNS infection in global warming condition" ณ โรงแรม แอมบาสซาเดอร์ซิตี้ จ.ชลบุรี	ราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่ง ประเทศไทย
6 พ.ค.52	ประชุมหารือความเป็นไปได้ในการผลิตวัคซีนไขหวัด ใหญ่สายพันธุ์ใหม่	สำนักงานคณะกรรมการวัคซีน แห่งชาติ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
15 พ.ค.52	ร่วมเสวนาวิชาการ เรื่อง "ไขหวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009"	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี แห่งชาติ (สวทช.)
20 พ.ค.52	วิทยากรบรรยายการประชุมวิชาการ Chula euroscience forum 2009 หัวข้อ " Integrated Neuroscience from basic to clinical"บรรยายเรื่อง " Paradigm shift in the management of CNS infection "	สาขาประสาทวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ

9 มิ.ย.52	วิทยากรอภิปราย เรื่อง " สภาพปัญหาการป้องกันควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์และในคน และการพัฒนาในก้าวต่อไป	กรมควบคุมโรค
ว/ด/ป	รายการ(หลักสูตร/โครงการที่อบรม)	หน่วยงานที่จัด
22 มิ.ย.52	วิทยากรการจัดประชุมวิชาการร่วมระหว่างคณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ม.มหิดล และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ 2552เรื่อง "Emerging infections agents :H5N1, xdr, TB, and so on.."	คณะกรรมการฝ่ายวิชาการร่วมคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
3 ส.ค.52	วิทยากรในการเสวนาเรื่อง "ทางเลือกใหม่ของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ชนิด A(H1N1) และทางออกของประเทศไทย"	สภาผู้แทนราษฎร ณ รัฐสภา กทม.
4 ส.ค.52	วิทยากร เรื่อง"สถานการณ์ของโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 H1N1 บทบาทความร่วมมือทางวิชาการต่อการแก้ปัญหา"	สำนักวิชาการสาธารณสุข ณ กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก
5 ส.ค.52	วิทยากรบรรยายพิเศษเรื่อง viral infection ณ โรงแรมเจ้าพระยาปาร์ค กรุงเทพฯ	ชมรมรพพยาบาลโรคระบบประสาทแห่งประเทศไทย
20 ส.ค.52	วิทยากรในงานเสวนา เรื่อง"แผนการผลิตวัคซีนไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ 2009 ระดับโรงงานขนาดใหญ่และความเสี่ยงจากการใช้วัคซีน"	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)
9-12 ก.ย.52	RABIES IN ASIA CONFERENCE (RIA CON 2009) Focus on "THE ELIMINATION OF RABIES IN THE ASIA AND THE WORLD"บรรยายเรื่อง "Lyssavirus pathogenesis host immune response and human disease therapy"และ "WHO guidelines for human rabies control and prevention"	National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam ณ Horison Hotel กรุงเทพมหานคร
7-9 ต.ค.52	เข้าร่วมประชุมและบรรยายในการประชุม " WHO Consultation on Human and Dog Rabies Prevention and Control " เพื่อบรรยายเรื่อง "Preventive immunization of children"	(World Health Organization, WHO) ณ Les Pensieres' Conference Center at Fondation Merieux เมือง Annecy ประเทศฝรั่งเศส
26-30 ต.ค.52	บรรยาย ในงานประชุมวิชาการ World Congress of Neurology WCN2009 1. Pathophysiologic studies of rabies in dogs and role of artificial microRNA in inhibiting viral replication	สมาคมประสาทวิทยาแห่งประเทศไทย ณ ไบเทคบางนา

ว/ด/ป	รายการ(หลักสูตร/โครงการที่อบรม)	หน่วยงานที่จัด
9-12 พ.ย. 52	ประชุมและบรรยายในการประชุม The sixth meeting of the Asian Rabies Expert Bureau (AREB) และบรรยายทางวิชาการ ในหัวข้อ Induction of cytokines induced by rabies vaccines administered by the ID and IM routes	The Asian Rabies Expert Bureau (AREB) ณ เมือง Manila ประเทศฟิลิปปินส์
20 พ.ย.52	วิทยาการบรรยายพิเศษ Update on rabies pathogenesis and WHO recommendation for rabies vaccination ณ โรงแรมรอยัลริเวอร์ กทม.	สมาคมไวรัสวิทยา (ประเทศไทย)
25 พ.ย.52	วิทยาการในงานแถลงข่าว เรื่อง "โรคพิษสุนัขบ้า" จะหมดไปจากประเทศไทยได้หรือไม่? บรรยาย เรื่อง "สังคมได้อะไร จากงานวิจัยด้านโรคพิษสุนัขบ้า" ณ สวทช	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)
27 พ.ย.52	วิทยาการงานเสวนาวิชาการ เรื่อง "โลกร้อน โรคภัย โรคติดต่อที่ต้องติดตาม" บรรยายเรื่อง "โลกร้อนสู่โรคภัย"	ศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง ร่วมกับ สกว.
	ภัยรุมล้อมประเทศไทย (จากหวัดใหญ่ 2009.....2010 จะเจออะไรอีก?)"	ณ โรงแรมสยามซิตี้
18 ธ.ค.52	วิทยาการงานประชุมวิชาการประจำปี "Hot Issues in Pediatric Neurology" แก่สมาชิกของชมรมฯกุมารแพทย์ บรรยายเรื่อง "Immunology & Viral Infection of CNS: Update Issues"	ชมรมกุมารแพทย์สาขาประสาท วิทยานโรงพยาบาลศิริราช
21 ธ.ค.52	วิทยาการในการประชุมสัมมนาวิชาการ เรื่อง "วัคซีน: ทิศทางนโยบายที่สำคัญ สำหรับสื่อมวลชนและตัวแทนภาคประชาชน ร่วมอภิปราย เรื่อง วัคซีน : มุมมองใหม่ในอนาคต : การสื่อสารความเสี่ยงประชาชน	กรมควบคุมโรค
	2. Asian encephalitis 3. Emerging Encephalitis	

25 -27 ม.ค.53	บรรยายในการประชุมวิชาการ เรื่อง Rabies บรรยายใน 4 หัวข้อ 1. An overview of human rabies: Pathophysiology and clinical features(Video of a human case) 2. Clinical diagnosis and differential diagnosis of human rabies: Safety issue and infection control 3. Pre-exposure vaccination 4. Management of patients with rabies	The Faculty of Medicine,Udayana University เกาะ Bali, ประเทศอินโดนีเซีย
ว/ด/ป	รายการ(หลักสูตร/โครงการที่อบรม)	หน่วยงานที่จัด
11 ก.พ.53	วิทยาการบรรยายประชุมวิชาการ 2 Chula Neuroscience forum 2010 หัวข้อ"Challenges in Neuroscience" บรรยายเรื่อง"Challenges in viral encephalitis" ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	สาขาประสาทวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ
19 ก.พ.53	วิทยาการในการเสวนาเรื่อง "สิทธิในการเข้าถึงยาคุณภาพ ปัญหาที่รอการแก้ไข" ณ รร.แอมบาสเตอร์	สมาคมไทยอุตสาหกรรมผลิตยาแผนปัจจุบัน
24 ก.พ.53	วิทยาการบรรยายพิเศษในงานสัมมนาของหน่วยบัณฑิตศึกษา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬา เรื่อง "Asian Encephalitis" and "Emerging encephalitis"	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ
5 มี.ค.53	วิทยาการประชุมวิชาการประจำปีสมาคมประสาทวิทยาแห่งประเทศไทย 1. Guest Lecture: Tropical Encephalitis 2. Athasit Oration : Rabies 2010 and Beyond"	สมาคมประสาทวิทยาแห่งประเทศไทย ณ โรงพยาบาล พระมงกุฎเกล้า
10 มี.ค.53	วิทยาการในการสัมมนาวิชาการป้องกันควบคุมโรคแห่งชาติ ประจำปี 2553 Theme ของงาน " ก้าวทันโรคภัย เครือข่ายสุขภาพไทยเข้มแข็ง" อภิปรายเรื่อง " Future Challenge of Zoonotic Disease in Asia: How to response and manage"	กรมควบคุมโรค ณ ไบเทค บางนา
11 มี.ค.53	วิทยาการในการสัมมนาวิชาการป้องกันควบคุมโรคแห่งชาติ ประจำปี 2553 Theme ของงาน " ก้าวทันโรคภัย เครือข่ายสุขภาพไทยเข้มแข็ง" อภิปรายเรื่อง "สามเหลี่ยมเขยื้อนภูเขาชุมชนคือฐานแห่งการพัฒนา กรณีศึกษา: การดำเนินการกวาดล้างพิษสุนัขบ้าโดยชุมชน"	กรมควบคุมโรค ณ ไบเทค บางนา

27 มี.ค.53	วิทยากรบรรยายและร่วมเสวนา ในหัวข้อ " New Global Health Paradigm One World One Health : Can it be possible?. ในโครงการ POSN Science Camp 2010 ให้แก่นักเรียนที่ผ่านการคัดเลือกตัวแทนประเทศไทยให้ไปแข่งขันโอลิมปิกระหว่างประเทศ	มูลนิธิส่งเสริมโอลิมปิกวิชาการและพัฒนามาตรฐานวิทยาศาสตร์ศึกษา (สอวน.) ณ สำนักงานสภาครีตจักรในประเทศไทย
30 มี.ค.53	วิทยากร เรื่อง "โรคติดเชื้ออุบัติใหม่ที่เกิดในระบบประสาทและสมอง" ในงานประชุมวิชาการประจำปี 2553 สวทช.เรื่อง วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อสังคมและโลก	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ณ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย จ.ปทุมธานี
ว/ด/ป	รายการ(หลักสูตร/โครงการที่อบรม)	หน่วยงานที่จัด
3-4 มี.ย.53	วิทยากรบรรยายเรื่อง Rabies; Can it be cure ? และ One world one health paradigm: can it be possible? ในงานประชุมวิชาการเรื่อง Thailand Conference on Emerging Infectious and Neglected Diseases 2010	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ณ อมารี ออร์คิด รีสอร์ท แอนด์ ทาวเวอร์พัตยา จ.ชลบุรี
23 มี.ย.53	บรรยาย เรื่อง Increase inter-sectoral and inter-institutional collaboration ในการประชุม TDR Stakeholders Consultation Meeting on Neglected Tropical Diseases (NTD)	องค์การอนามัยโลกเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และคณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล ณ โรงแรมอิมิเรียลควีนส์ปาร์ค กรุงเทพฯ
24 มี.ย.53	วิทยากรประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 50 คณะแพทย์ จุฬายา เรื่อง " Emerging Infectious Diseases"	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
12 ก.ค.53	วิทยากร เรื่อง "Emerging infectious diseases:Zoonosis" ในงานอบรมระยะสั้นประจำปี 2553 สาขาวิชาโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬายา	สาขาวิชาโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬายา
29 ก.ค.53	เสวนา เรื่อง "ความเป็นไปได้ในการจัดตั้ง ONE HEALTH	องค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
	CONSORTIUM ของไทย" ในงานสัมมนาทางวิชาการสัตว์ป่าสวนสัตว์ ครั้งที่ 4	ณ ศูนย์การประชุมรัตนเจมจรัส 4 (นมส.)
4 ส.ค.53	วิทยากร เรื่อง " Encephalitides including rabies, JE and other potential emerging encephalitis"ในงานประชุมวิชาการ "Multilateral Emerging Infectious Disease Conference"	สำนักงานแพทย์ทหาร(USPACOM) (COE-DMHA) ณ รร.เพนินซูลากทม
19 ต.ค.53	วิทยากร เรื่อง "Research Question" ในงาน	ศูนย์วิจัยทางคลินิก (Chula Clinical

	กิจกรรมวิชาการ วันปียมหาราช "โครงการฝึกอบรมเพื่อพัฒนานักวิจัยสาขา วิทยาศาสตร์ชีวภาพและการแพทย์ (Researcher Training Program in Biomedical Science) ณ อาคารแพทยพัฒน์	Research Center)
20 ต.ค.53	วิทยากร เรื่อง "How to Conduct Research?" ในงานกิจกรรมวิชาการวันปียมหาราช "โครงการฝึกอบรมเพื่อพัฒนานักวิจัยสาขา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ และการแพทย์ (Researcher Training Program in Biomedical Science) ณ อาคารแพทยพัฒน์	ศูนย์วิจัยทางคลินิก (Chula Clinical Research Center)
ว/ด/ป	รายการ(หลักสูตร/โครงการที่อบรม)	หน่วยงานที่จัด
28 ต.ค.53	วิทยากรบรรยายเรื่อง Nipah Virus Infections ณ คณะแพทยศาสตร์เขตร้อน กทม.	คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล
4 พ.ย.53	วิทยากรอภิปรายเรื่อง Rabies : Pathophysiology ในงานประชุม วิชาการนานาชาติทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 36 "The 36th International Conference on Veterinary Science" (36th ICVS 2010) ณ ศูนย์แสดงสินค้าและการประชุมอิมแพ็ค เมืองทองธานี กรุงเทพฯ)	สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ราชูปถัมภ์ ร่วมกับ OIE และ FAO
18 พ.ย.53	วิทยากรบรรยายในหัวข้อ "Current and Future Trends in the Prevention, Treatment and Control of rabies" ในงานวิชาการ เรื่อง Pharmacotherapy Infectious Diseases ครั้งที่ 3 ของคณะเภสัชศาสตร์ ณ รร.เดอะทวิน ทาวเวอร์ กทม.	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
14 ธ.ค.53	วิทยากรฝึกอบรม "3 rd Training on Rabies Intradermal Vaccination and Common Pitfalls in Post-Exposure Rabies Treatment" เรื่อง Rabies Pathophysiology ณ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย	สถานเสาวภา สภากาชาดไทย ร่วมกับ องค์การอนามัยโลก WHO
2-6 ธ.ค.53	บรรยายในการประชุม The Second International Conference on Infections of the Nervous System ณ เกาะ Reunion Island เมือง St Denis ประเทศฝรั่งเศส	International Association of Neuroinfections Studies island 2010
16-18 ธ.ค. 53	ประชุมเชิงปฏิบัติการ Workshop on Collaboration between Human and Animal Health Sectors on Zoonoses Prevention and Control ณ เมือง ซัปโปะโระ ประเทศญี่ปุ่น	WHO / SEARO

21 ม.ค.54	วิทยากรบรรยาย เรื่อง Title : to be annond ในงานสัมมนาโครงการผลิตอาจารย์แพทย์ (Medical Scholars Program) ณ รร.อีสเทิร์น แกรนด์ พาลาเซ พทยา จ.ชลบุรี	สนง.ผลิตอาจารย์แพทย์ฯ ม.มหิดล
24 ก.พ.54	วิทยากรในงานประชุมวิชาการ The 3 rd Chula Neuroscience forum 2011 บรรยายเรื่อง Highlights in CNS infection: The real case discussion ณ อาคาร แพทย์พัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	สาขาประสาทวิทยา ภาควิชาอายุร ศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ
ว/ด/ป	รายการ(หลักสูตร/โครงการที่อบรม)	หน่วยงานที่จัด
10-14 เม.ย.54	วิทยากรเชิงบรรยายในการประชุมเชิงปฏิบัติการ Clinical recognition, diagnosis and case management of zoonotic diseases - Training workshop ณ เมือง มาเล สาธารณรัฐมัลดีฟส์	WHO Maldives และ Center for Community Health and Disease Control,Ministry of Health and Family
15 มิ.ย.54	วิทยากรประชุมวิชาการร่วมคณะแพทยสามสถาบัน 2554 จุฬาฯ, รามา, ศิริราช (Joint Conference In Medical Sciences 2011:Chula-Rama-Siriraj) บรรยายเรื่อง "Emerging Zoonosis in Thailand" (Code sessin:15RRHI 1-2) ณ อิมแพคเมืองทอง ธานี	คณะแพทยศาสตร์ 3 สถาบัน จุฬาฯ , รามา, ศิริราช
26-30 มิ.ย. 54	วิทยากรเรื่อง Human encephalitis and bat surveillance for Nipah virus ในงานประชุม Disease Emergence at the Animal-Human- Ecosystems Interface placing, emphasis on Nipah and Hendra viruses ณ กรุงโรม ประเทศอิตาลี	Animal Health Service FAO of the UN
8 ก.ค.54	วิทยากรร่วมอภิปรายเรื่อง Symposium 8 : โรคติดต่ออุบัติใหม่จากสัตว์สู่คน (Emerging Zoonoses) ในงานสัมมนาระบาดวิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 21 ณ รร.แอมบาซาดอร์ กทม.	กระทรวงสาธารณสุข
21 ก.ค.54	วิทยากรการประชุมวิชาการนานาชาติ เรื่อง The 2nd Food Safety and Zoonoses Symposium for Asia Pacific บรรยาย เรื่อง "โรคระบาดสัตว์สู่คน" ณ โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ เชียงใหม่	ศูนย์สัตว์แพทย์สาธารณสุขเอเชีย แปซิฟิก คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.เชียงใหม่

22 ก.ค.54	วิทยากรในการประชุมจัดทำแผนยุทธศาสตร์โรคติดต่ออุบัติใหม่แห่งชาติ พศ.2555-2559 ในหัวข้อเรื่องผลกระทบของโรคติดต่ออุบัติใหม่ ในมุมมองทางการแพทย์และสาธารณสุข ณ รร. นารายณ์ กทม.	กระทรวงสาธารณสุข
-----------	---	------------------

3.2 ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี

ว/ด/ป	รายการ	หน่วยงานที่จัด
16 ก.พ.52	วิทยากรในการอบรมระยะสั้น ประจำปี 2552 เรื่อง "Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Conventional Microbiology Lab, Serology & Molecular Diagnosis ณ รพ.ราชวิถี	สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย
20 พ.ค.52	วิทยากรบรรยายประชุมวิชาการ Chula Neuroscience forum 2009 บรรยายเรื่อง "Paradigm shift in the management of CNS infection" ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	สาขาประสาทวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
21-22 พ.ค.52	วิทยากร บรรยายเรื่อง Advanced knowledge in Nipah Virus Transmissionในงานอบรมเรื่อง โรคไข้หวัดใหญ่และโรคติดต่ออุบัติใหม่ สำหรับแพทย์และบุคลากรสาธารณสุข ปี 2552 ณ รร.อิมพีเรียล จ.เชียงใหม่	กรมควบคุมโรค
22 พ.ค.52	วิทยากรในงานอบรมเรื่อง โรคไข้หวัดใหญ่และโรคติดต่ออุบัติใหม่ สำหรับแพทย์และบุคลากรสาธารณสุข ปี 2552 บรรยาย เรื่อง "Advanced Knowledge in Nipah Virus Training on Viral Zoonoses" ณ โรงแรมอิมพีเรียล จ.เชียงใหม่	กรมควบคุมโรค
13-16 ต.ค.52	วิทยากรบรรยายใน Joint Intercountry Workshop on Nipah, Hendra and Ebola - Reston viruses, Research and Public Health เรื่อง "Discovery of henipaviruses in Thailand	The World Health Organization (WHO) ณ Maroochy, Queensland ออสเตรเลีย
25 พ.ย.52	บรรยายเรื่อง Discovery of Bat Nipahvirus in	FOOD AND

	Thailand ในงานประชุม National Workshop on Avian Influenza and Wild Birds: From Surveillance to Data Sharing & Publication	AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)
27 พ.ย.52	วิทยากรงานเสวนาวิชาการ เรื่อง "โลกร้อน โรคภัย โรคติดต่อที่ต้องติดตาม" บรรยายเรื่อง "การค้นพบ กลไกการแพร่เชื้อไวรัสในค้างคาว" ณ โรงแรมสยาม ซิตี้	ศูนย์ปฏิบัติการโรคทาง สมอ. ร่วมกับ สกว.
18 ธ.ค.52	สัมภาษณ์รายการ 9ร่วมใจคนไทยไม่ทิ้งกัน เรื่อง ค้างคาวแม่ไก่	สถานีโทรทัศน์ช่อง 9 อสมท.
11 ม.ค.53	สัมภาษณ์รายการสถานีสุขภาพ เรื่อง ค้างคาว สถานีวิทยุประเทศไทย 92.5	สถานีวิทยุประเทศไทย 92.5
ว/ด/ป	รายการ	หน่วยงานที่จัด
26 ม.ค.53	วิทยากรบรรยายเรื่อง Molecular diagnosis and virus sequencing in rabies.ในงานประชุมวิชาการ เรื่อง Rabies	The Faculty of Medicine,Udayana University Bali, อินโดนีเซีย
9 ก.พ.53	บรรยายเรื่อง Henipavirus ในงาน Animal-Human-Environment Interface Workshop	FAO, Thai Department of Livestock Development and the US Center ณ รร.สยามซิตี กทม.
9 มี.ค.53	บรรยายเรื่อง "One World, One Health: The Experience from Thailand ใน งาน"INTERNATIONAL SEMINAR ON THE ONE WORLD, ONE HEALTH: FIGHTING THE DISEASE BATTLES OF THE 21ST CENTURY"	(KOMNAS FBPI) (Indonesia National Committee for Avian Influenza Control and Pandemic Influenza Preparedness) ณ Libra Ballroom,Sultan Hotel, Jakarta
30 มี.ค.53	วิทยากรเสวนาเรื่อง "กินอาหารทะเลอย่างไร ในภาวะวิกฤตโลกร้อน" ในงานประชุมวิชาการ เทคโนโลยี และความปลอดภัยด้านอาหารและน้ำ ครั้งที่ 3/2553เรื่อง ก้าวทันสถานการณ์..ก้าวทันเทคโนโลยีด้านสุขาภิบาลอาหารและน้ำ	กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ณ รร.อมารี ดอนเมืองแอร์พอร์ต กรุงเทพฯ
3-4 มี.ย.53	บรรยาย เรื่อง Discovery of Nipah virus in Thailand ในงานประชุม Thailand Conference on Emerging Infectious and Neglected Diseases 2010	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)ณ อมารี ออร์คิด รีสอร์ท แอนด์ ทาว

		เวอร์, พัทยา จ.ชลบุรี
18 มิ.ย.53	วิทยากรบรรยาย เรื่อง "ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของโลก...สู่สุขภาพ (Global Change to Health Impact)"	สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จ.ขอนแก่น ณ โรงแรมเชนทาราคอน แวนชั่นเซ็นเตอร์ จ.อุดรธานี
29 ก.ค.53	วิทยากรบรรยายพิเศษ เรื่อง "การศึกษาวิจัยไวรัสพิษ ปาห์ในประเทศไทย" ในงานสัมมนาทางวิชาการ สัตว์ป่าสวนสัตว์ ครั้งที่ 4	องค์การสวนสัตว์ ในพระ บรมราชูปถัมภ์ ณ ศูนย์การ ประชุมรัชนี้แจ่มจรัส 4 (นมส.)
ว/ด/ป	รายการ	หน่วยงานที่จัด
2 ก.ย.53	วิทยากรในการประชุมวิชาการโรคพิษสุนัขบ้า ครั้งที่ 5/2553 " Rabies Prevention in Thailand : Safety and Efficacy" บรรยายเรื่อง " Human rabies: Diagnosis and Treatment" ณ โรงแรม นารายณ์ กทม.	สถานเสาวภา สภากาชาด ไทย
15-16 ต.ค.53	วิทยากรอบรมฟื้นฟูเวชปฏิบัติโรคพิษสุนัขบ้า สำหรับแพทย์ และบุคลากรสาธารณสุข บรรยาย เรื่อง "การวินิจฉัยและการดูแล ผู้ป่วยโรคพิษสุนัข บ้าอย่างไรเพื่อพิสูจน์ยืนยันว่า ไม่มีโรคพิษสุนัขบ้า ในพื้นที่" ณ โรงแรมดิเอ็มเพรส จ.เชียงใหม่	กรมควบคุมโรค กระทรวง สาธารณสุข
28 ต.ค.53	วิทยากรบรรยายเรื่อง Nipah Virus Infections คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล	คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม. มหิดล
5 พ.ย.53	วิทยากรอภิปรายเรื่อง Nipah virus Transmission from bats to human- pigs ในงานประชุม วิชาการนานาชาติทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 36 "The 36th International Conference on Veterinary Sciece" (36th ICVS 2010) ณ ศูนย์ แสดงสินค้าและการประชุมอิมแพ็ค เมืองทองธานี	สัตวแพทยสมาคมแห่ง ประเทศไทยในพระบรม ราชูปถัมภ์ ร่วมกับ OIE และ FAO
15 พ.ย.2553	วิทยากรบรรยายงาน Emerging Zoonotic Diseases Laboratory Detection Workshop เรื่อง Overview on rabies detection by TaqMan real- time PCR Laboratory Safety ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	WHO-CC for research and training on viral zoonoses และ WHO- SEARO
14 ธ.ค.53	วิทยากรฝึกอบรม "3 rd Training on Rabies	สถานเสาวภา สภากาชาด

	Intradermal Vaccination and Common Pitfalls in Post-Exposure Rabies Treatment" เรื่อง Diagnosis of Rabies Virus by Nucleic Acid Amplification Tests ณ สถานเสภา	ไทย ร่วมกับ องค์การ อนามัยโลก
11-13 ก.ค.54	วิทยากรบรรยายเรื่อง Coping with deadly viruses ในการอบรมเชิงปฏิบัติการ International workshop on Anticipating Biosecurity Challenges of the Global Expansion of High Containment Biological Laboratories to be held 11-13 July in Istanbul, Turkey.	U.S. National Academy of Sciences
ว/ด/ป	รายการ	หน่วยงานที่จัด
4-7 ต.ค.53	Poster Presentation เรื่อง Simple and safe method for Nipah virus surveillance in Bats ณ ปีนัง ประเทศมาเลเซีย	The USJCMSP EID in Penang
14-16 ก.พ.54	Poster Presentation เรื่อง Ante-mortem diagnosis of human rabies using molecular techniques. งานประชุม 1st International One Health Congress, Victoria, Australia	CSIRO, Australia
15-17 มิ.ย. 54	Poster Presentation เรื่อง Ante- mortem Diagnosis of Human Rabies using Molecular Techniques. งานประชุม Joint Conference in Medical Sciences 2011: Chula-Rama-Siriraj ณ เมืองทองธานี	คณะแพทยศาสตร์ 3 สถาบัน จุฬา-รามาศิริราช
17 มิ.ย. 54	Oral Presentation เรื่อง Ante- mortem Diagnosis of Human Rabies using Molecular Techniques. งานประชุม Joint Conference in Medical Sciences 2011: Chula-Rama-Siriraj ณ เมืองทองธานี	คณะแพทยศาสตร์ 3 สถาบัน จุฬา-รามาศิริราช
15-17 มิ.ย. 54	Poster Presentation เรื่อง Simple and Safe Method for Nipah virus Surveillance in Bats. งานประชุม Joint Conference in Medical Sciences 2011: Chula-Rama-Siriraj ณ เมืองทองธานี	คณะแพทยศาสตร์ 3 สถาบัน จุฬา-รามาศิริราช

3.3 ศ.นพ.ชนพ ช่วงโชติ

ว/ด/ป	รายการ(หลักสูตร/โครงการที่อบรม)	หน่วยงานที่จัด
2552	Pathology of Langerhans Cell Histiocytosis.	Chulalongkorn Annual Medical Congress
5/2552	CNS Tumors: Classification and Contribution of Molecular Genetics.	The First Neuroscience Forum, Chulalongkorn University
5/2552	Malformations of Cortical Development: Neuropathological Aspect.	The First Neuroscience Forum, Chulalongkorn University
7/2552	Overview of WHO Classification of Nervous System Tumors and Astrocytic neoplasms..	Prasat Neurological Institute, Bangkok
7/2552	As a Pathologist, How to Get International Publications. Department of Pathology, , July 2009	Faculty of Medicine, Siriraj Hospital Mahidol University
7/2552	Research in Anatomic Pathology.	Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
2553	KRAS Testing in Colorectal Cancers	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
10/2/2553	Challenging in Imaging Study of the Brain and Brain Pathology	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
7/5/2553	Immunohistochemistry in Surgical Pathology	สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์
26/5/2553	How to do EGFR Testing	AstraZeneca
9/1/2554	Pathogenesis of Furious and Paralytic Rabies Encephalitis	The 6 th Annual Scientific Meeting Asia-Pacific Society of Molecular Immunohistology (APSMI), Sunway Medical Center, Malaysia
6/7/2554	Molecular Pathology of the Clinicians	Bangkok General Hospital, Bangkok, Thailand

3.4 ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล

วันที่	หัวข้อการบรรยาย	หน่วยงานที่จัด
11 สิงหาคม 2551	Protein Bioinformatics	สำนักวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนเรศวร วิทยาเขตพะเยา
20 สิงหาคม 2551	Proteomics and its application	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
25 สิงหาคม 2551	Proteomics and its application	ภาควิชาโภชนศาสตร์เขตร้อนและ วิทยาศาสตร์อาหารคณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
17 กันยายน 2551	Protein Bioinformatics	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
29 กันยายน 2551	Proteomics and its application	ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวช ศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
30 กันยายน 2551	Bioinformatics for beginner	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
11 ตุลาคม 2551	Bioinformatics at proteomics level	GRID617 Hypercourse on Bioinformatics สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ไทย และ มหาวิทยาลัยมหิดล
28 ตุลาคม 2551	Proteomics and its application	สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
19 พฤศจิกายน 2551	Mass spectrometer and protein science	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
17 ธันวาคม 2551	Mass spectrometer and protein science	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
13 มกราคม 2552	Mass spectrometer and protein science	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
16 กุมภาพันธ์ 2552	Protein bioinformatics	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
18 กุมภาพันธ์ 2552	Mass spectrometer and protein science	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
23 กุมภาพันธ์ 2552	Protein bioinformatics	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
25 กุมภาพันธ์ 2552	Proteomics and its application	ภาควิชาโภชนศาสตร์เขตร้อนและ วิทยาศาสตร์อาหาร คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
25 กุมภาพันธ์ 2552	Protein bioinformatics	ภาควิชาโภชนศาสตร์เขตร้อนและวิทยาศาสตร์ อาหาร คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

วันที่	หัวข้อการบรรยาย	หน่วยงานที่จัด
2 มีนาคม 2552	Proteomics and its application	คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2 มีนาคม 2552	Protein bioinformatics	คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
18 มีนาคม 2552	Secondary metabolite	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
3 มิถุนายน 2552	Molecular diagnostic	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3 มิถุนายน 2552	Microbial production of therapeutic agents and vaccines	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
10 มิถุนายน 2552	Bioremediation and biomass utilization	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
10 มิถุนายน 2552	Plant growth promoting bacteria	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
10 มิถุนายน 2552	Large scale production of proteins from recombinant microorganisms	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
1 กรกฎาคม 2552	HPLC and its application	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
10 กรกฎาคม 2552	2D-PAGE MS	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
10 กรกฎาคม 2552	MS and its application	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
17 กรกฎาคม 2552	HPLC-MS	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
27 กรกฎาคม 2552	Proteomics and its application	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
29 กรกฎาคม 2552	Proteomics and its application	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5 สิงหาคม 2552	Protein Bioinformatics	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5 สิงหาคม 2552	Proteomics in Medical Sciences	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
23 สิงหาคม 2552	Proteomics in Biomedical Sciences	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์มหาวิทยาลัยรังสิต
23 สิงหาคม 2552	Protein Bioinformatics	คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
26 สิงหาคม 2552	Proteome analysis	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วันที่	หัวข้อการบรรยาย	หน่วยงานที่จัด
27 สิงหาคม 2552	Proteomics in Medical Sciences I	ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
29 สิงหาคม 2552	Protein Bioinformatics	สำนักกีฬาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนเรศวร วิทยาเขตพะเยา
3 กันยายน 2552	Proteomics in Medical Sciences II	ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
7 กันยายน 2552	Bacterial strain Improvement	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
8 กันยายน 2552	Plant strain Improvement	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
10 กันยายน 2552	Mass spectrometry and protein sciences	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
14 กันยายน 2552	Genomics technology	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
15 กันยายน 2552	Nanotechnology	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
16 กันยายน 2552	Protein Bioinformatics	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
18 กันยายน 2552	Proteomics and Biotechnology	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
18 กันยายน 2552	Mass spectrometry and protein sciences	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
22 กันยายน 2552	From genomics to proteomics	คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
25 กันยายน 2552	Protein Bioinformatics	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
29 กันยายน 2552	Bioinformatics Tools for protein analysis	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
14 ตุลาคม 2552	Bioinformatics at proteomics level	GRID617 Hypercourse on Bioinformatics สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย และ มหาวิทยาลัยมหิดล
5 พฤศจิกายน 2552	Proteomics and its application	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
27 พฤศจิกายน 2552	HPLC	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
16 ธันวาคม 2552	Proteomics: Application in Veterinary Science	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
15 กุมภาพันธ์ 2553	Proteomics and its application	คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วันที่	หัวข้อการบรรยาย	หน่วยงานที่จัด
15 กุมภาพันธ์ 2553	Protein bioinformatics	คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
19 กุมภาพันธ์ 2553	การประยุกต์ใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์สำหรับงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
23 กุมภาพันธ์ 2553	Protein bioinformatics	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
24 กุมภาพันธ์ 2553	Protein bioinformatics	ภาควิชาโภชนศาสตร์เขตร้อนและวิทยาศาสตร์อาหาร คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล
27 กุมภาพันธ์ 2553	Proteomics in Biomedical Research	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
28 กุมภาพันธ์ 2553	Protein Bioinformatics	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
4 มีนาคม 2553	Proteomics and its application	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
31 มีนาคม 2553	การประยุกต์ใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์สำหรับงานวิจัยด้านโปรตีน	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
17 พฤษภาคม 2553	การศึกษาวิเคราะห์และประยุกต์ใช้เทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์ในงานวิจัยกึ่งอุตสาหกรรม	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
15 มิถุนายน 2553	การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์กับงานวิจัยด้านการแพทย์	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
30 มิถุนายน 2553	Molecular diagnostic	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
30 มิถุนายน 2553	Microbial production of therapeutic agents and vaccines	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
7 กรกฎาคม 2553	Bioremediation and biomass utilization	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
7 กรกฎาคม 2553	Plant growth promoting bacteria	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
14 กรกฎาคม 2553	Large scale production of proteins from recombinant microorganisms	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
14 กรกฎาคม 2553	การประยุกต์ใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์สำหรับงานวิจัยด้านโภชนาการ	สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล
11 สิงหาคม 2553	การประยุกต์ใช้ MS ในงานวิจัยด้านการแพทย์	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่	หัวข้อการบรรยาย	หน่วยงานที่จัด
17 สิงหาคม 2553	การประยุกต์ใช้ MS ในงานวิจัยด้านโปรตีน	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
18 สิงหาคม 2553	HPLC	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
25 สิงหาคม 2553	Proteomics and its application	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
1 กันยายน 2553	Proteomics and its application	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
8 กันยายน 2553	Mass spectrometry and protein sciences	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
9 กันยายน 2553	Protein Bioinformatics	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
7 กันยายน 2553	Genomics technology	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
11 กันยายน 2553	Protein Bioinformatics	สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
13 กันยายน 2553	Protein Bioinformatics	คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
14 กันยายน 2553	Nanotechnology	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
15 กันยายน 2553	Protein Bioinformatics	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
16 กันยายน 2553	Proteomics in Medical Sciences I	ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
21 กันยายน 2553	Proteomics and its application	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
22 กันยายน 2553	Proteomics and Biotechnology	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
23 กันยายน 2553	Proteomics in Medical Sciences II	ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
21 ตุลาคม 2553	Proteomics and its application	สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
8 พฤศจิกายน 2553	Mass spectrometry and protein sciences	ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
18 พฤศจิกายน 2553	Mass spectrometry and protein sciences	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

วันที่	หัวข้อการบรรยาย	หน่วยงานที่จัด
8 พฤศจิกายน 2553	Proteomics in Agriculture	ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
20 ธันวาคม 2553	Proteomics in Cancer Research	ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวช ศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
13 มกราคม 2554	Proteomics and its application	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
21 มกราคม 2554	Proteomics in Medical Sciences	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
3 กุมภาพันธ์ 2554	Protein Bioinformatics	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ชีว การแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
11 กุมภาพันธ์ 2554	Proteomics in Medical Sciences	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
16 กุมภาพันธ์ 2554	Proteomics in Medical Sciences	ภาควิชาโภชนศาสตร์เขตร้อนและ วิทยาศาสตร์อาหาร คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม. มหิดล
16 กุมภาพันธ์ 2554	Protein bioinformatics	ภาควิชาโภชนศาสตร์เขตร้อนและ วิทยาศาสตร์อาหาร คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม. มหิดล
22 มิถุนายน 2554	Mass spectrometry and protein sciences	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
24 มิถุนายน 2554	Proteomics in Medical Sciences	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
13 กรกฎาคม 2554	HPLC	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
19 กรกฎาคม 2554	Proteomics and Biotechnology	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 ผศ.ดร.จิรพล สินธุนาวา

วัน / เดือน / ปี	หน่วยงาน / หัวข้อเรื่อง
9 ม.ค. 2552	มูลนิธิใบไม้เขียว / โรงแรมใบไม้เขียว
26 ม.ค. 2552	โรงพยาบาลรามาริบัติ / การประหยัดพลังงาน
27 ม.ค. 2552	คณะเศรษฐศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย / Environmental Problems and policies
29 ม.ค. 2552	มูลนิธิใบไม้เขียว / Greening Tourism Business for New Challenges
4 ก.พ. 2552	คณะมนุษยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ / สิ่งแวดล้อม:บริบทของท้องถิ่นและโลกาภิวัตน์
5 ก.พ. 2552	การประปานครหลวง / สถานการณ์สิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน
24 ก.พ. 2552	ชมรมนักข่าวสิ่งแวดล้อม / ช้าแหละโลกร้อน
26 ก.พ. 2552	โรงพยาบาลจอมทอง / ภาวะโลกร้อน
7 มี.ค. 2552	วิทยาลัยดุสิตธานี / Environmental Management for Hotels
10 มี.ค. 2552	สำนักปลัดกรุงเทพมหานคร / Think Green : การจัดองค์การภายใต้สำนักักรักษ์สิ่งแวดล้อม
17 มี.ค. 2552	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น / โอกาสและบทบาทของนักเทคนิคการแพทย์ และกายภาพบำบัดในยุคแห่งการเปลี่ยนแปลง
19 มี.ค. 2552	คณะรัฐศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย / คุณภาพชีวิต สิ่งแวดล้อม จริยธรรม
21 มี.ค. 2552	สำนักงานพัฒนาข้าราชการพลเรือน (ก.พ.) / กฎหมายเกี่ยวกับทรัพยากรธรรมชาติ และการบริหารจัดการสิ่งแวดล้อม
21 มี.ค. 2552	สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี(สสวท.) / โรคที่มากับโลกร้อน
27 มี.ค. 2552	การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย / ทิศทาง CSR ของ กฟผ.
30 มี.ค. 2552	มูลนิธิใบไม้เขียว / Greening Tourism Business for New Challenges with Health Promotion Hotel
10 เม.ย. 2552	หน่วยกิจการนักศึกษา คณะสิ่งแวดล้อม / Clean Development Mechanism : CDM
16เม.ย. 2552	งานส่งเสริมการวิจัยคณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ ม.มหิดล/ตัวชี้วัดด้านการศึกษาและวิจัย
7 พ.ค. 2552	สถาบันพัฒนาข้าราชการตำรวจ/ การป้องกัน เตรียมรับ และปรับตัวเผชิญกับภาวะโลกร้อน
11 พ.ค. 2552	นิตยสาร A day / "อีโร่" คนไทยที่ทำโครงการดี ๆ เพื่อสิ่งแวดล้อม
15 พ.ค. 2552	สมาคมอุตสาหกรรมไฟฟ้าแห่งประเทศไทย / พลังงานนิวเคลียร์ในเอเชียอาคเนย์
16-17 พ.ค. 2552	งานบริหารการศึกษา ม.มหิดล/ทิศทางการพัฒนาหลักสูตรและวิชาการ
18 พ.ค. 2552	บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) / การจัดหาพัสดุที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ปตท.
20 พ.ค. 2552	บมจ.การบินไทย/สภาวะโลกร้อนมีผลกระทบกับสุขภาพได้อย่างไร/

วัน / เดือน / ปี	หน่วยงาน / หัวข้อเรื่อง
20 พ.ค. 2552	กรมควบคุมโรค/ผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมและเศรษฐกิจที่มีผลต่อโรคติดต่อระหว่างคนและสัตว์
21 พ.ค. 2552	กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม / การบริหารจัดการขยะในบริบทท้องถิ่น (ภาคเหนือ)
25 พ.ค. 2552	สถาบันพัฒนาข้าราชการตำรวจ / การบริหารจัดการทรัพยากรและพลังงานด้านภัยโลกร้อน/161คน
26 พ.ค. 2552	มูลนิธิใบไม้เขียว / Greening Tourism Business for New Challenges with Health Promotion Hotel
28 พ.ค. 2552	มูลนิธิใบไม้เขียว / โครงการสร้างความร่วมมือระหว่างภาคีในห่วงโซ่อุปทานการท่องเที่ยว ยุโรป-ไทย เพื่อส่งเสริมอุตสาหกรรมการท่องเที่ยวที่ยั่งยืน
3 มิ.ย. 2552	สำนักงานแพทย์ กทม. / ภาวะโลกร้อนผลกระทบต่อภาคสาธารณสุข
9 มิ.ย. 2552	กรมควบคุมโรค / สภาพปัญหา การป้องกันควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์และคน และการพัฒนาในก้าวต่อไป
15 มิ.ย. 2552	กรมควบคุมมลพิษ / ภาครัฐ-เอกชน ขับเคลื่อนการผลิตและการบริโภคอย่างยั่งยืน ร่วมผลิต จำหน่าย ใช้สินค้าที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม
19 มิ.ย. 2552	สถาบันพัฒนาข้าราชการตำรวจ / ภาวะโลกร้อน/ผู้ฟัง 130 คน
23 มิ.ย. 2552	Faculty of Environment and Resource Studies and Faculty of Graduate Studies./ Global Environment and Natural Resources forum
25 มิ.ย. 2552	ชมรมผู้บริหารงานวิศวกรรมในโรงแรม / การใช้ทรัพยากรอย่างมีประสิทธิภาพในธุรกิจโรงแรม
30 มิ.ย. 2552	โรงพยาบาลตำรวจ / พลังงานและการลดใช้พลังงาน
10 ก.ค. 2552	สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ / ความท้าทายหลังวิกฤติเศรษฐกิจโลก :โอกาสของประเทศไทย
15 ก.ค. 2552	กรมควบคุมโรค/วิพากษ์แผนยุทธศาสตร์การกำจัดโรคพิษสุนัขบ้า
16 ก.ค. 2552	สำนักงานแพทย์ กทม. / "คนกรุงวันนี้สบายดีหรือ" ผู้ฟัง 500 คน
20 ก.ค. 2552	สถาบันพัฒนาข้าราชการตำรวจ / การป้องกันเตรียมรับและปรับตัวเผชิญภาวะโลกร้อน

วัน / เดือน / ปี	หน่วยงาน / หัวข้อเรื่อง	สถานที่จัด
09 ม.ค. 2553	สถาบันพระปกเกล้า ประเด็นร่วมสมัยเกี่ยวกับทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม	นนทบุรี
25 ม.ค. 2553	โรงพยาบาลจอมทอง สถานการณ์ภาวะโลกร้อน : ผลกระทบต่อโลก สุขภาพ และสิ่งแวดล้อม	เชียงใหม่

วัน / เดือน / ปี	หน่วยงาน / หัวข้อเรื่อง	สถานที่จัด
26 ม.ค. 2553	โรงพยาบาลจอมทอง / สถานการณ์ภาวะโลกร้อน : ผลกระทบต่อโลก สุขภาพ และสิ่งแวดล้อม	เชียงใหม่
02 ก.พ. 2553	โครงการพัฒนาสถานประกอบการปลอดบุหรี่ (ส.พ.ส.) บทบาทของสถานประกอบการในการสนับสนุนให้พนักงานเลิกบุหรี่	กทม.
05 ก.พ. 2553	มูลนิธิใบไม้เขียว มาตรฐานการรักษาสิ่งแวดล้อมและสร้างเสริมสุขภาพของโรงแรม	ประจวบคีรีขันธ์
06 ก.พ. 2553	มูลนิธิใบไม้เขียว มาตรฐานการรักษาสิ่งแวดล้อมและสร้างเสริมสุขภาพของโรงแรม	ประจวบคีรีขันธ์
09 ก.พ. 2553	วิทยาลัยการตำรวจ การป้องกัน เตรียมรับ และปรับตัวเผชิญภาวะโลกร้อน	กทม.
24 ก.พ. 2553	กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ภาวะโลกร้อนกับปัญหาสาธารณสุข	กทม.
25 ก.พ. 2553	คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ม.มหิดล การประหยัดพลังงานและการอนุรักษ์สภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ	กาญจนบุรี
04 มี.ค. 2553	วุฒิสภา / แผนการปรับตัวของพื้นที่ชายฝั่งจากระดับน้ำทะเลที่สูงขึ้น	สมุทรปราการ
05 มี.ค. 2553	โรงพยาบาลตำรวจ / พลังงานและการลดใช้พลังงาน	กทม.
18 มี.ค. 2553	โรงพยาบาลสงฆ์ / ภาวะโลกร้อนกับความอยู่รอดของมนุษย์	กทม.
19 มี.ค. 2553	โรงพยาบาลตำรวจ / ร่วมมือ ร่วมใจ ลดใช้พลังงาน	กาญจนบุรี
24 มี.ค. 2553	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย / คุณภาพชีวิต สิ่งแวดล้อม และจริยธรรม	กทม.
25 มี.ค. 2553	คณะรัฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ชุมชนร่วมสร้าง พลังงานทดแทน ร่วมแรงต้านโลกร้อน	เชียงใหม่
20 เม.ย. 2553	สถาบันส่งเสริมการบริหารกิจการบ้านเมืองที่ดี แนวโน้มและนโยบายที่เกี่ยวข้องกับทรัพยากรธรรมชาติและ สิ่งแวดล้อม	กทม.
27 เม.ย. 2553	สำนักงาน ก.พ. / ชีวิตที่มีความรับผิดชอบ	นนทบุรี
28 เม.ย. 2553	วิทยาลัยการตำรวจ การป้องกัน เตรียมรับ และปรับตัวเผชิญภาวะโลกร้อน	กทม.
01 พ.ค. 2553	มูลนิธิใบไม้เขียว มาตรฐานการรักษาสิ่งแวดล้อมและสร้างเสริมสุขภาพของโรงแรม	ประเทศฮ่องกง
06 พ.ค. 2553	โรงเรียนไผทอุดมศึกษา / TEAM TEACHING	กทม.
08 พ.ค. 2553	โรงเรียนนวมวิทย์ ชนบุรี / การอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและ สิ่งแวดล้อม	กาญจนบุรี
11 พ.ค. 2553	สำนักการแพทย์ / Global Crisis	กทม.
12 พ.ค. 2553	วิทยาลัยการตำรวจ/ การป้องกัน เตรียมรับ และปรับตัวเผชิญภาวะ โลกร้อน	กทม.
18 พ.ค. 2553	โรงพยาบาลราชบุรี / วิกฤตการณ์โลกร้อนและการป้องกัน	กทม.
25 พ.ค. 2553	สถาบันส่งเสริมการบริหารกิจการบ้านเมืองที่ดี / บทบาทของประเทศ ไทยในการจัดการสิ่งแวดล้อมของโลก : ภาวะโลกร้อน	ชลบุรี

วัน / เดือน / ปี	หน่วยงาน / หัวข้อเรื่อง	สถานที่จัด
25 พ.ค. 2553	มหาวิทยาลัยบูรพา / การจัดการสิ่งแวดล้อมและการอนุรักษ์พลังงาน	ชลบุรี
01 มิ.ย. 2553	การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย การลดการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	ฉะเชิงเทรา
03 มิ.ย. 2553	มูลนิธิใบไม้เขียว / Greening Tourism Business for New Challenges	สุโขทัย
04 มิ.ย. 2553	มูลนิธิใบไม้เขียว / Greening Tourism Business for New Challenges	สุโขทัย
05 มิ.ย. 2553	มูลนิธิใบไม้เขียว/ Greening Tourism Business for New Challenges	สุโขทัย
09 มิ.ย. 2553	การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย การลดการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	ขอนแก่น
14 มิ.ย. 2553	มูลนิธิใบไม้เขียว / Healthy Holiday Healthy Stay at Green Hotel	กทม.
16 มิ.ย. 2553	การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย การลดการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	ตาก
21-25 มิ.ย. 2553	Asian Productivity Organization / Training Course on Integrated Waste Management at Resorts, Hotels and Restaurants	สาธารณรัฐ หมู่เกาะฟีจี
30 มิ.ย. 2553	โครงการพัฒนาสถานประกอบการปลอดบุหรี่ (ส.พ.ส.) สังคมไทยทำอะไรให้ปลอดบุหรี่	กทม.
01 ก.ค. 2553	การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย การลดการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	กาญจนบุรี
07 ก.ค. 2553	ศูนย์ฝึกอบรมตำรวจภูธรภาค 7 / วิชาการพัฒนาเศรษฐกิจแบบยั่งยืน	นครปฐม
08 ก.ค. 2553	ศูนย์ฝึกอบรมตำรวจภูธรภาค 7 / วิชาเทคโนโลยีทรัพยากรธรรมชาติ	นครปฐม
14 ก.ค. 2553	กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข / ประเทศไทยกับภัยจากคลื่นความร้อน	นนทบุรี
20 ก.ค. 2553	การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย Green Energy : รู้คุณค่า รู้รักษา พัฒนาสิ่งแวดล้อม	กาญจนบุรี
22 ก.ค. 2553	สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดนครปฐม สถานการณ์ด้านสิ่งแวดล้อมกับการพัฒนาสุขภาพ	เพชรบุรี
23 ก.ค. 2553	สำนักประชาสัมพันธ์เขต 5 / วิถีวิถีโลกร้อนและผลกระทบ	นครศรีธรรมราช
29 ก.ค. 2553	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน / System Thinking	นครปฐม
30 ก.ค. 2553	วิทยาลัยการตำรวจ / การป้องกัน เตรียมรับ และปรับตัวเผชิญภาวะโลกร้อน	กทม.
11 ส.ค. 2553	บริษัทปูนซีเมนต์ไทย(ท่าหลวง) จำกัด การประหยัดพลังงานในบ้านพักและสำนักงาน	สระบุรี
26 ส.ค. 2553	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน การคิดเชิงระบบเพื่อการวางแผนการเกษตรอย่างยั่งยืน	นครปฐม
24 ก.ย. 2553	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Health impact on Global Warming	เชียงใหม่

3.6 นายสัตวแพทย์ วีระ เทพสุเมธานนท์

ว/ด/ป	รายการ(หลักสูตร/โครงการที่อบรม)	หน่วยงานที่จัด
3 กค 51	วิทยากรบรรยายเรื่อง “Zinc gluconate ทางเลือกใหม่ในการทำหมันสุนัขเพศผู้” หลักสูตรเพิ่มศักยภาพการควบคุมสัตว์พาหะนำโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน ณ โรงแรมชลจันทร์พัทยารีสอร์ท จ.ชลบุรี	กรมปศุสัตว์
11 กย 51	วิทยากรบรรยายเรื่อง “Rabies Situation and Trends in Thailand” ในการประชุมวิชาการโรคพิษสุนัขบ้าครั้งที่ 4 ปี 2551 “Rabies in Thailand: Situation and Trends” ณ โรงแรมนารายณ์ กรุงเทพฯ	สถานเสาวภา
14 ตค 51	วิทยากรบรรยายเรื่อง “โรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์และการวินิจฉัย” ให้แก่นักศึกษาสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.มหิดล ปี 4	ณ สถานเสาวภา
19 พย 51 17 ธค 51 21 มค 52	บรรยายเรื่อง “โรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์และการวินิจฉัย” ให้แก่นักศึกษาสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.เกษตรฯ ปี 6	ณ สถานเสาวภา
19 กพ 52	วิทยากรบรรยายเรื่อง “การวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้า” ให้แก่แพทย์ประจำบ้าน สาขาเวชศาสตร์ฉุกเฉินและอาจารย์แพทย์ คณะแพทยศาสตร์ รพ.รามาย	ณ สถานเสาวภา
2-3 Mar 2009	Lecture “Dog Rabies in Thailand” for Dr. Satoshi Inoue. DVM, PhD. Research Laboratory of Zoonosis Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, Japan and Dr Masaru Sato. DVM, The Japan Society of Clinical Study for Rabies, Japan	ณ สถานเสาวภา
20 มีค 52	วิทยากรบรรยายเรื่อง “Animal rabies clinic: Diagnosis and management” ให้แก่ผู้รับทุนองค์การอนามัยโลก 5	ณ สถานเสาวภา
24 กค 52	วิทยากรบรรยายเรื่อง “การวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้า” ให้แก่นิสิตแพทย์ชั้นปีที่ 5 โครงการเวชศาสตร์ชุมชน 2 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	ณ สถานเสาวภา
24 กค 52	วิทยากรบรรยายเรื่อง “วิชาชีพสัตวแพทย์กับการทำงานที่สถานเสาวภา” ให้แก่นักเรียนชั้นม. 4 โรงเรียนสาธิต จุฬาฯ	ณ สถานเสาวภา
27-29 กค 52	วิทยากรเพื่อให้ความรู้ภาควิชาการและร่วมปฏิบัติการณรงค์ท่าหมื่นแก่สุนัขเพศผู้ ณ เทศบาลเมืองชะอำ จ.เพชรบุรี	เทศบาลเมืองชะอำ จ.เพชรบุรี
5 สค.52	วิทยากรบรรยายและฝึกอบรมเรื่อง “การวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้า” ให้แก่นายสัตวแพทย์และเจ้าหน้าที่กรุงเทพมหานคร	ณ สถานเสาวภา
3-4 พย 52	วิทยากรบรรยายเรื่อง “Rabies diagnosis in dogs” ให้แก่ Mr. Saif Saeed Amour Al-Habsi ประเทศโอมาน	ณ สถานเสาวภา

ว/ด/ป	รายการ(หลักสูตร/โครงการที่อบรม)	หน่วยงานที่จัด
27-29 กค 52	วิทยากรเพื่อให้ความรู้ภาควิชาการและร่วมปฏิบัติการรณรงค์ทำหมันแก่สุนัขเพศผู้	เทศบาลเมืองชะอำ จ. เพชรบุรี
22 ธค 52	วิทยากรอบรมเชิงปฏิบัติการฉีดยาเข้าอวัยวะสุนัขเพศผู้โดยไม่ต้องผ่าตัดทำหมัน (Non-surgical sterilization of dogs by intratesticular injection)	เทศบาลตำบลบางเสร่ จ.ชลบุรี
8 มค 53	วิทยากรอบรมเชิงปฏิบัติการฉีดยาเข้าอวัยวะสุนัขเพศผู้โดยไม่ต้องผ่าตัดทำหมัน ให้แก่นายสัตวแพทย์ จาการ.พ.สัตว์พัฒนาการ และเทศบาลตำบลลำลูกกา จ.ปทุมธานี จำนวน 3 คน	ณ สถานเสาวภา
12 และ 19 มค 53	วิทยากรสอนแสดงเรื่อง “โรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์และการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ” ให้แก่นักศึกษาสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.เกษตรฯ ปี 3 ศึกษาดูงาน	ณ สถานเสาวภา
26 กพ 53	วิทยากรอบรมเชิงปฏิบัติการฉีดยาเข้าอวัยวะสุนัขเพศผู้โดยไม่ต้องผ่าตัดทำหมัน ให้แก่นายสัตวแพทย์และสัตวแพทย์ จากเทศบาล จ.ปทุมธานี จำนวน 6 คน	ณ สถานเสาวภา
9 มีค 53	วิทยากรอัตรายการโทรทัศน์ “กาชาดเพื่อคุณ” ของสมาากาชาดไทย เรื่อง “โรคพิษสุนัขบ้า”	สมาากาชาดไทย
25-27 มค 53	วิทยากรบรรยายเรื่อง “Clinical and laboratory diagnosis” และเรื่อง “Dog and cat vaccinations” ในการประชุม International Workshop “Rabies Control : Human and animal perspective”	Udayana University, Bali, Indonesia.
5 – 7 พค 53	วิทยากรให้ความรู้ภาควิชาการและร่วมปฏิบัติการรณรงค์ฉีดสารละลายซิงค์กลูโคเนตเข้าลูกอวัยวะ เพื่อทำหมันถาวรในสุนัขเพศผู้	เทศบาลเมืองชะอำ ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า และสุนัขจรจัดปี 2553
2 กย 53	วิทยากรบรรยายเรื่อง How to control animal rabies ในการประชุมวิชาการโรคพิษสุนัขบ้าระดับชาติ “Rabies Prevention in Thailand : Safety and Efficacy” ณ โรงแรมนารายณ์ กรุงเทพฯ	สถานเสาวภา
15 พย 53	วิทยากรต้อนรับและนำชมแก่ผู้เข้ารับการอบรมเชิงปฏิบัติการนานาชาติ The diagnosis of zoonotic diseases จำนวน 20 คน มาศึกษาดูงานการชันสูตรโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์	ณ สถานเสาวภา
15 –17 ธค 53	วิทยากรให้ความรู้ภาควิชาการและร่วมปฏิบัติการรณรงค์ฉีดสารละลายซิงค์กลูโคเนตเข้าลูกอวัยวะ เพื่อทำหมันถาวรในสุนัขเพศผู้	เทศบาลเมืองชะอำ ปลอดโรคพิษสุนัขบ้า และสุนัขจรจัดปี 2554
18 มค 54	วิทยากรบรรยายเรื่อง Rabies in Thailand and Clinical Diagnosis of Rabid Dogs ให้แก่ Dr. Malcolm Anderson (BVMS, MVPHMgt) Manager Disease Surveillance of Biosecurity - Animal Health , Government of South	ณ สถานเสาวภา

	Australia.	
ว/ด/ป	รายการ(หลักสูตร/โครงการที่อบรม)	หน่วยงานที่จัด
4 กพ 54	วิทยากรบรรยายเรื่อง Animal Rabies in Thailand and Clinical Diagnosis of Rabid Dogs ให้แก่ WHO Fellowships 2 คน คือ Dr. Lionel Harischandra Patrikiri Achchige (D.V.M.) Director of Public Health Veterinary Services, Sri Lanka. and Dr. Darshani Abeysekera (M.D.) from Sri Lanka.	ณ สถานเสาวภา
9 กพ 54	วิทยากรบรรยายต้อนรับและนำชมเรื่อง บทบาทหน้าที่การทำงานสัตวแพทย์ในการป้องกันควบคุมโรค ให้ แก่นักศึกษาสัตวแพทย์ ปี 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2553	ณ สถานเสาวภา
27 - 28 กค 54	วิทยากรเรื่องการให้การเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการเป็นกุญแจสำคัญในการกวาดล้างโรคพิษสุนัขบ้า ณ โรงแรมทีเค พาเลซ กรุงเทพฯ	สำนักกระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข

3.7 ดร.พกามาต ขาวปลอด

- 28-30 มค 2551 วิทยากรบรรยายหัวข้อเรื่อง “ความรู้ใหม่เกี่ยวกับโรคพิษสุนัขบ้า” ในงานประชุมวิชาการโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนรับภาวะโลกร้อน กรมปศุสัตว์ร่วมกับกระทรวงสาธารณสุขประจำปี 2551 ณ โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ อำเภอเมือง จ.เชียงใหม่
- 22-22 กค 2552 วิทยากรบรรยายหัวข้อเรื่อง “ความก้าวหน้าของโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์และคน” ในงานประชุมวิชาการโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประจำปี 2552 ณ โรงแรมแอร์พอร์ท จ.อุดรธานี
- วิทยากรบรรยายหัวข้อเรื่อง “ Maternal immunity and interferences on rabies vaccination in Thai dogs ” คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยโออิตะ ประเทศญี่ปุ่น 5 กพ. 2552
- ร่วมประชุมวิชาการและแสดงผลงานทางวิชาการในการประชุม 3rd Vaccine Global Congress ประเทศสิงคโปร์ 4-6 ตุลาคม 2552
 - 1) “ Can Pre-exposure rabies vaccination be shortened?”
Pakamat Khawplod, Wipaporn Jaicharoensub, Artikaya awangvaree, Sompop Prakongsri, Thiravat Hemachudha, Henry Wilde, Tirapong Tantawichien, Visith Sitprijia.
 - 2) “ The suppressive effect on antibody responses when ERIG or HRIG is administered with various rabies post-exposure WHO recommended regimens” Pakamat Khawplod, Praphan Phanuphak, Maneerat Benjawongkulchai, Wantanit Pairoj

รายชื่อผู้ทำงานในโครงการ

1. ศ.นพ.วีระวัฒน์ เหมะจุฑา

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พระราม 4
โทรศัพท์ 0 2256 4000 ต่อ 3598 โทรสาร 0 2652 3122
E-mail address: fmedthm@gmail.com, th-cu@usa.net

2. ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี

สถานที่ติดต่อ ศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พระราม 4
โทรศัพท์ 0 2256 4000 ต่อ 3561 โทรสาร 0 2652 3122
E-mail address: spwa@hotmail.com

3. ผศ.ดร.จิรพล สินธุนาวา

สถานที่ติดต่อ คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา
โทรศัพท์ 0-2800-2442 โทรสาร 0-2800-2442
E-mail address encsi@mahidol.ac.th

4. ศ.นพ.ชนพ ช่างโชติ

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 0-2256-4235 โทรสาร 0-2652- 4208
E-mail address shanop@gmail.com

5. ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล

สถานที่ติดต่อ ห้องปฏิบัติการโปรตีนโอมิกส์ สถาบันจีโนม
สถาบันศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
โทรศัพท์ 0-2564-6700 ต่อ 3253 โทรสาร 0-2564-6584
E-mail address sittiruk@biotec.or.th

6. นายสัตวแพทย์ วีระ เทพสุเมธานนท์

สถานที่ติดต่อ ฝ่ายชันสูตรและวิจัยโรคในสัตว์
สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
โทรศัพท์ 0-2252-0161, 252 0167 ext. 127 โทรสาร 0-2254-0212
E-mail address tepsumethanonv@yahoo.com

7. ดร.ผกามาศ ขาวปลอด

สถานที่ติดต่อ ฝ่ายวิจัยและพัฒนา
สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
โทรศัพท์ 0-2252-0161, 252 0167 ext. 152 โทรสาร 0-2254-0212
E-mail address pakamatv@yahoo.com

8. น.ส.ณัฐภาณินี ถนอมศรีเดชชัย

สถานที่ติดต่อ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 0-2256-4000 ต่อ 3576 โทรสาร 0-2652-3122
E-mail address tnatt_ninee@yahoo.com

9. น.ส.พัทธมน วิโรจนภิรมย์

สถานที่ติดต่อ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 0-2256-4000 ต่อ 3576 โทรสาร 0-2652-3122
E-mail address phatthamon@gmail.com

10. น.ส.นิศาชล เทพา

สถานที่ติดต่อ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 0-2256-4000 ต่อ 3576 โทรสาร 0-2652-3122
E-mail address nisaaohn@hotmail.com

11. น.ส. พรพรรณ สุวรรณวงศ์

สถานที่ติดต่อ ศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 0-2256-4000 ต่อ 3576 โทรสาร 0-2652-3122
E-mail address mtpornpun@gmail.com

12. พญ.อภิษฎา พิเศษ สาระยา

สถานที่ติดต่อ ศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 0-2256-4000 ต่อ 3576 โทรสาร 0-2652-3122
E-mail address

13. ดร.เอกพล มหาวีหกันนท์

สถานที่ติดต่อ ศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 0-2256-4000 ต่อ 3576 โทรสาร 0-2652-3122
E-mail address

14. น.ส.อภินิษฐ์ จิตต์มิตรภาพ

สถานที่ติดต่อ ศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 0-2256-4000 ต่อ 3576 โทรสาร 0-2652-3122
E-mail address

15. พ.ญ.ชนิษฐา สุวรรณศรีนันท์

สถานที่ติดต่อ ศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 0-2256-4000 ต่อ 3576 โทรสาร 0-2652-3122

E-mail address

16. อ.น.สพ.แสงชัย ยิ่งศักดิ์มงคล

สถานที่ติดต่อ

ศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 0-2256-4000 ต่อ 3576 โทรสาร 0-2652-3122

E-mail address

17. น.สพ.วัลลภ ลิขิตสุนทรวงศ์

สถานที่ติดต่อ

ศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 0-2256-4000 ต่อ 3576 โทรสาร 0-2652-3122

E-mail address

ภาคผนวก

เอกสารแนบ

1. Phatthamon Virojanapirom, Pakamat Khawplod, Arthikaya Sawangwaree, Supaporn Wacharapluesadee, Thiravat Hemachudha, Kinjiro Morimoto and Akira Nishizono. BHK-cell adapted canine rabies virus variant: mutation in intergenic phosphoprotein and matrix protein gene non-coding region may confer higher neurovirulence in adult mice. (submitted for publication)
2. Preecha Ruangvejvorachai, Chatchai Nopvichai, Veera Tepsumethanon, Supaporn Wacharapluesadee, Thiravat Hemachudha, Shanop Shuangshoti. Role of inhibitory neurons in the pathogenesis of paralytic and furious rabies in canine. (submitted for publication)
3. Natthapaninee Thanomsridetchai, Nilubon Singhto, Veera Tepsumethanon, Shanop Shuangshoti, Supaporn Wacharapluesadee, Supachok Sinchaikul, Shui-Tein Chen, Thiravat Hemachudha, and Visith Thongboonkerd. Comprehensive proteome analysis of hippocampus, brainstem and spinal cord from paralytic and furious dogs naturally infected with rabies. (submitted for publication)
4. Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Ante- and post-mortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests. Expert Rev Mol Diagn. 2010 Mar;10(2):207-18. Review.
5. Wacharapluesadee S, Phumesin P, Supavonwong P, Khawplod P, Intarut N, Hemachudha T. Comparative detection of rabies RNA by NASBA, real-time PCR and conventional PCR. J Virol Methods. 2011 Aug;175(2):278-82.
6. Supaporn Wacharapluesadee, Veera Tepsumethanon, Pornpun Supavonwong, Thongchai Kaewpom, Nirun Intarut, Thiravat Hemachudha. Detection of rabies viral RNA from non-neural specimens of rabies infected dogs by Taqman real-time RT-PCR. (submitted for publication)
7. Abhinbhen Saraya, Thiravat Hemachudha, Chirapol Sintunawa, Pornpun Supavonwong, Kusuma Sawangpun, Supaluk Damrongsheaur, Supaporn Wacharapluesadee. Marine Fish Ciguatera toxin: Case series report and survey at fish markets in Bangkok. (submitted for preparation)
8. Chirapol Sintunawa. Epidemic Marine Fish Ciguatera toxin: special appraisals on global warming and climate changes. (submitted for preparation)

9. Shuangshoti S, Thepa N, Phukpattaranont P, Ruangvejvoracha R, Jittmittraphap A, Intarut N, Tepsumethanon V, Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Canine furious and paralytic rabies: pattern differences in rabies viral antigen and inflammation localization in the central nervous system. (submitted for publication)
10. Wacharapluesadee S, Sutipanya J, Damrongwatanapokin S, Phumesin P, Chamnanpood P, Leowijuk C, Hemachudha T. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. *J Virol Methods*. 2008 Aug;151(2):317-20.
11. Wacharapluesadee S, Boongird K, Wanghongsa S, Ratanasetyuth N, Supavonwong P, Saengsen D, Gongal GN, Hemachudha T. A Longitudinal Study of the Prevalence of Nipah Virus in *Pteropus lylei* Bats in Thailand: Evidence for Seasonal Preference in Disease Transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2009 Apr 29.
12. Nopvichai C, Sanpavat A, Sawatdee R, Assanasen T, Wacharapluesadee S, Thorner PS, Shuangshoti S. PCR detection of mycobacterium tuberculosis in necrotizing non-granulomatous lymphadenitis using formalin-fixed paraffin-embedded tissue: A study in Thai patients. *J Clin Pathol* 2009 Sep; 62(9):812-5.
13. Shantavasinkul P, Tantawichien T, Wacharapluesadee S, Jeamanukoolkit A, Udomchaisakul P, Chattranukulchai P, Wongsaroj P, Khawplod P, Wilde H, Hemachudha T. Failure of rabies postexposure prophylaxis in patients presenting with unusual manifestations. *Clin Infect Dis*. 2010 Jan 1;50(1):77-9.
14. Saraya A, Wacharapluesadee S, Khawplod P, Tepsumethanon S, Briggs D, Asawavichienjinda T, Hemachudha T. A preliminary study of chemo- and cytokine responses in rabies vaccine recipients of intradermal and intramuscular regimens. *Vaccine*. 2010 Jun 23;28(29):4553-7.
15. Israsena N, Mahaviahakanont A, Hemachudha T. Rabies virus infection and microRNAs. *Adv Virus Res*. 2011;79:329-44.
16. Laothamatas J, Sungkarat W, Hemachudha T. Neuroimaging in rabies. *Adv Virus Res*. 2011;79:309-27.

BHK-cell adapted canine rabies virus variant: mutation in intergenic phosphoprotein and matrix protein gene non-coding region may confer higher neurovirulence in adult mice.

Phatthamon Virojanapirom^a, Pakamat Khawplod^b, Arthikaya Sawangwaree^b, Supaporn Wacharapluesadee^a, Thiravat Hemachudha^a, Kinjiro Morimoto^c and Akira Nishizono^d

^a WHO Collaborating Centre for Research and Training on Viral Zoonoses, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand

^b Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand

^c Yasuda Women's University, Hiroshima 731-0153, Japan

^d Department of Microbiology, School of Medicine, Oita University, Yufu, Oita, Japan.

Introduction

Rabies virus is a non-segmented negative-stranded RNA virus. It belongs to order mononegavirales, family Rhabdoviridae, genus *Lyssavirus*. Rabies virus is a neurotropic virus, causing fatal neurological disease. It infects animals mainly through bites contaminated with rabies virus containing saliva. Once rabies virus enters the wound, it multiplies at muscle cells then travels to central nervous system (CNS) by retrograde axonal transport.

Genome of rabies virus consists of 11,923 or 11,928 nucleotides, containing a leader sequence at the 3' end, followed by five monocistronic genes that encode the nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G) and RNA transcriptase (L). At the center of the bullet-shaped virus particle is a core of helical RNA, ribonucleoprotein (RNP), which in turn is surrounded by a lipid-protein envelope. RNP core consists of single-stranded genome RNA encapsidated with nucleoprotein N, polymerase cofactor phosphoprotein P and virion-associated RNA polymerase L. After progeny genome RNA is encapsidated to form RNP structures, M protein binds to the RNP and condenses into the bullet-shaped structures. Then they interact with trimeric G proteins anchored in the plasma membrane and assemble into virus particles that bud out of infected cells [1, 2].

Passage of rabies virus obtained from dog brain in heterologous cell types, such as BHK cells, results in the selection of genotypically and phenotypically different variant from that present in mouse-brain passage. The latter is more pathogenic for adult mice than the BHK cell passage variant which grows faster in BHK cells [3]. Serial passages of Street-Albama-Dufferin (SAD) strain resulted to oral vaccine strain (SAD-B19) [4].

QS05-BHK-P7 is a virus variant obtained from 7 serial passages of QS05 Thai canine street rabies virus isolated from a rabid dog brain into baby hamster kidney cells (BHK-21). Comparison of pathogenicity between QS05-BHK-P7 and QS05-SMB-P2, it was found that the former had increased neurovirulence. It was able to infect adult mice by both intracerebral (IC) and peripheral intramuscular (IM) challenges. Parental strain, QS05-SMB-P2, infected adult mice only by IC route.

In this study, we here reported the phenotypic differences as visualized in BHK-21 cells among these 3 variants, QS05, QS05-SMB-P2 and QS05-BHK-P7. Greater number and larger size of viral particles were demonstrated in the case of QS05-BHK-P7 as compared to its counterparts passaged in neuronal cells. Results of whole genome sequencing and aligned sequences of these 3 variants were compared. Genetic alteration located at polyadenylation signal between phosphoprotein and matrix protein intergenic region (IGR) was demonstrated. This may emphasize the significance of IGR noncoding region in determining neurovirulence and pathogenicity.

Materials and Methods

Viruses and cells

The rabies virus QS-05 strain was directly isolated from the brain of a Thai rabid dog. It was amplified once in suckling mice brain (SMB) to obtain 20% brain suspension of stock seed virus. This isolate was then passaged twice in suckling mouse brain, designated as QS-SMB P2, or 7 times in baby hamster kidney (BHK)-21 cells, designated as QS-BHK-P7.

BHK-21 cells were maintained in Minimum Essential Medium Eagle (MEM) with 10% fetal bovine serum.

Immunofluorescence staining

BHK-21 cells were infected with QS-05, QS-SMB-P2 or QS-BHK-P7 viruses. One day post infection, cells were washed twice with phosphate buffer saline, acetone-fixed and stained with FITC conjugated antibody to rabies nucleoprotein.

Viral Infection of mice

A group of five 6-week-old female mice were inoculated intracerebrally (IC) or intramuscularly (IM). The clinical disease signs and symptoms were observed daily for at least 4 weeks, and, based on the percentage of surviving animals in each group; the lethal dose or LD50 was calculated as previously described.

Whole genome sequencing

Primer design

Primers were designed based on rabies virus strain 8743THA (accession number EU293121) (Table 1).

RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was extracted from brain suspension or cell supernatant using High Pure Viral RNA Kit (Roche) according to manufacturer's protocol. For reverse transcription, cDNA was synthesized using 1 ug of total RNA and 1 ul of random primer (Promega) heated at 70 °C for 5 min, then immediately chilled on ice for 5 min. The reaction was transferred to ImProm-IITM Reverse Transcription reaction tube and incubated at 25 °C for 5 min followed by 42 °C for 1 hour and 70 °C for 15 min.

Table 1: Primers used in the whole genome sequencing

Fragment	Sequences	Primers Name	Length	Location as on QS05
1	CTA CAA TGG ATG CCG AC	CN1	17	66-82 (F)
	GGA TTG AC(AG) AAG ATC TTG CTC AT	CN4	23	1514-1536 (R)
2	TTA CTT CTC CGG TGA (GA)AC (GA)AG GAG	RabPfor	24	1247-1272 (F)
	GAG G(GA)T TTT TGA GTG TCC TC(GA) TC	RabPrev	23	2532-2554 (R)
3	TGA TCT GAA CCG TTA TAC ATC CC	RabM (F)	23	2381-2403 (F)
	AAA CAA AAG AGC CTG AGG AAT C	RabM (R)	22	3318-3339 (R)
4	TCT GGT GTA TCA ACA TGA AC	RabG1.2a	20	2998-3016 (F)
	GAC TTG GTG GTC ATG ATA GAC	RabG1.2b	21	4236-4256 (R)
5	AGA CCT GTG GAT TTG TGG ACG A	RabG1.5a	22	3986-4007 (F)
	GTT CAG CCT CTA ACT CGA TT	RabG1.5b	20	5451-5470 (R)
6	CTG TGG AAC AGA AGG ACA AT	RabL1 F	20	5356-5375 (F)
	CCT GAA CTT CTC TGC CCT CT	RabL1 R	20	6341-6360 (R)
7	CTC CGG TTA TGA AGT CAT TAA AAT	RabL2 F	24	6285-6309 (F)
	ACA TCT TCT GTT GAC TCC AAC C	RabL2 R	22	7289-7310 (R)
8	GGT TAC ATA TGC CTT TCA CCT G	RabL3 F	22	7239-7260 (F)
	CTC TCC AAG ATC TGG ATT CC	RabL3 R	20	8243-8262 (R)
9	ATC TGG CTG AGC TCC CAT GA	RabL4 F	20	8191-8210 (F)
	CTG TAC TTA CGG AGA TAT GAG AGA G	RabL4 R	25	9190-9214 (R)
10	CAA GTC TGC TAG ATA CAG TGA AGG	RabL5 F	24	9138-9161 (F)
	AGA TTC TAA GGT GTC CTC TCC ATG	RabL5 R	24	10147-10160 (R)
11	GCA TGA GAA CTA ACC TGC GA	RabL6 F	20	10091-10110 (F)
	GCC CTC TGC ATC TCA CTC TT	RabL6 R	20	11119-11138 (R)
12	GCT GTA CCT CAG ATT CTC CAA G	RabL7 F	22	11010-11031 (F)
	CAG CTA GAG GTT CTG ACT TGA G	RabL7 R	22	11861-11882 (R)
3'RACE	AGG AGT GAT CTT GTC TCC TTT	CN10	21	385-365(R)
	CGA CAA GAT TCC ATA ACT GGT CCA G	RabN 334R	25	334-355 (R)
5'RACE	CCG TCT GAC CCC AAG ATC TTG A	RabL 11389F	22	11389-11410 (F)
	GGC ACT TCA ATA TCT GCT GCA GT	RabL 11411F	23	11411-11433 (F)
	TGA TGTCCC CAG CTT TGC AAG	RabL11463 F	21	11463-11483 (F)

Amplification

Polymerase chain reaction (PCR) was performed using GoFlexiTaq DNA polymerase (Promega) on GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems). Briefly, 10 µl of cDNA was amplified with 1x PCR buffer, 10 pmol of each primer (forward and reverse), 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP and 1 Unit of Taq DNA polymerase. The cycling profile was as followed; 94 °C for 5 min, initial denaturation, followed by 30 cycles at 94 °C for 30s, 55 °C for 30s and 72 °C for 2 min, and final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were confirmed by agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining (under UV illumination) with 1 kb DNA marker (Fermentas). The gels containing expected PCR products were excised and DNA was purified using QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) according to manufacturer's protocol.

3' and 5' untranslated region (UTR) amplification

3' and 5' end of rabies genome were amplified using 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends and 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0 (Invitrogen), respectively. Briefly, 1 µg of total RNA was used in first strand cDNA synthesis along with oligo(dT)-containing adapter primer, SuperScript[™] II RT and reaction buffer. 2 µl of cDNA was then added to PCR reaction containing Abridged Universal Amplification Primer (AUAP) and CN10 reverse primer. Heminested PCR was performed using PCR product and AUAP and RabN334R (reverse primer), cycling profile as described above.

For 5' RACE, first strand cDNA was synthesized from total RNA using RabL11389 forward primer, gene-specific primer (GSP1), and SuperScript[™] II RT. The RNase Mix was added to remove mRNA template. Next, the homopolymeric tail was added to the 3'-end of cDNA using TdT and dCTP following the separation of cDNA from unincorporated dNTPs, GSP1 and proteins by S.N.A.P Column. The dC-tailed cDNA was amplified using AUAP and RabL11411 forward primer. Heminested PCR was performed using PCR product and AUAP and RabL11463 forward primer, cycling profile as described above.

Indirect sequencing (TA cloning of full-length PCR products)

The G1.2 and G1.5 PCR fragments were obtained from 1 µg of cDNA with RabG1.2a and RabG1.2b, and RabG1.5a and RabG1.5b, respectively. The second round PCR was performed using the combination of G1.2 and G1.5 as template with RabG1.2a and RabG1.5b primers. PCR products were cloned into pGEM-T[®] easy vector system (Promega). Twenty white colonies were picked up and the purification of plasmids was performed using Nucleospin[®] Plasmid (Macherey-Nagel). The purified plasmids were sequenced.

Sequencing

Purified DNAs or plasmids were commercially sequenced (1st Base, Malaysia).

Sequence alignment and Analysis

The sequences were analyzed using Chromas, multiple sequence alignment was performed using ClustalW. The identity of nucleotide and amino acid were performed using GENEDOC.

Results

Passages of canine street rabies virus in non-neuronal and neuronal (SMB) cells yielded in vitro (BHK-21 infected cells) and in vivo phenotypic differences

Immunofluorescent staining of rabies viral nucleoprotein was performed 1 day post infection. Tiny dot-like immunofluorescent staining viral particles were observed in both QS-05 and QS05-SMB-P2 infected cells, the latter being slightly increased in numbers and size in the cytoplasm. Large viral particles of greater number were demonstrated in QS05-BHK-P7 infected cells (Figure 1).

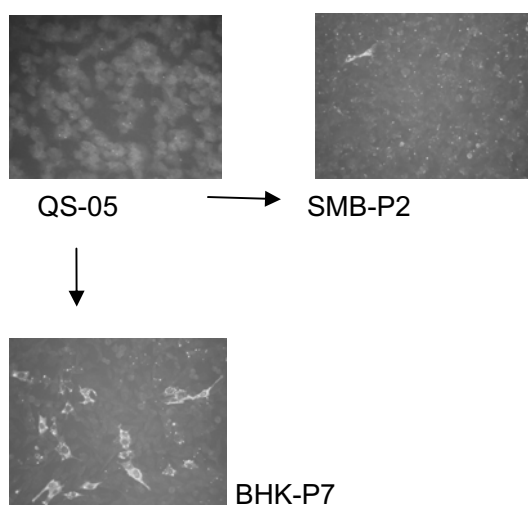
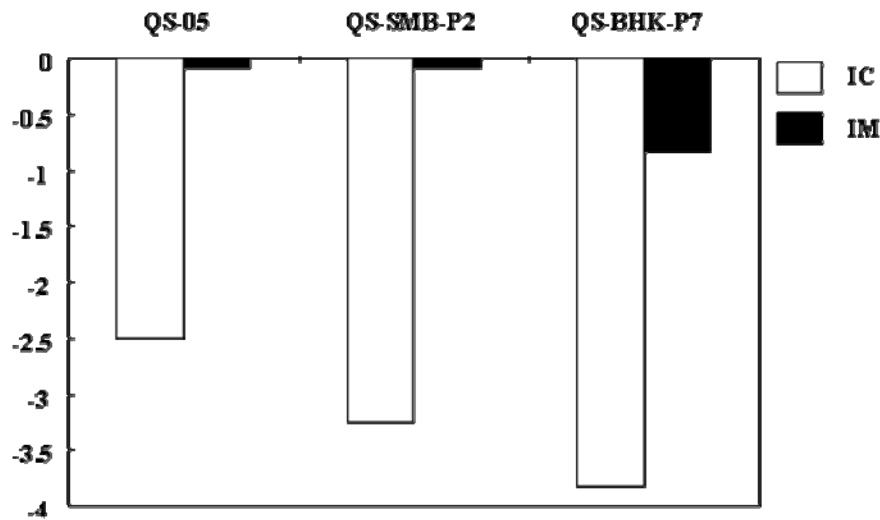


Figure 1 morphological difference under microscopy

To study whether neuronal and non-neuronal cell passaged viruses have different pathogenicity, QS-05, SMB-P2 and BHK-P7 viruses were injected IC and IM to group of mice. The differences in susceptibility to lethal infection among these 3 viruses were demonstrated (Figure 2). Parental QS-05 strain could cause death only by IC inoculation. This was similar in the case of neuronal-adapted strain, QS05-SMB-P2. Increased neurovirulence was observed in non-neuronal adapted strain, QS05-BHK-P7. Following IC or IM inoculation, BHK-P7 caused a 100% mortality rate. Virulence of BHK-P2 could not be determined due to insufficient viral amount.



	IC	IM	Peripheral susceptibility index (IC LD ₅₀ /IM LD ₅₀)
QS-05	10 ^{-2.5}	no death(5/5)	-
QS-SMB-P2	10 ^{-3.25}	no death(5/5)	0.006
QS-BHK-P7	10 ^{-3.83}	10 ^{-0.83}	0.079

Figure 2 Comparison of pathogenicity

Sequence organization of whole genome

Three viral strains, QS-05, QS-SMB-P2 and QS-BHK-P7, were subjected to whole genome sequencing. All three strains of rabies viruses were 11,923 base pairs consisting of five coding regions, nucleoprotein 71-1423, phosphoprotein 1515-2408, matrix protein 2496-3104, glycoprotein 3316-4896 and RNA-dependent RNA polymerase 5407-11793. The first 58 base pairs were 3' untranslated region (UTR) or leader and the last 70 base pairs were 5'UTR or trailer sequences. Intergenic region (IGR)s located at each gene junction were 2, 5, 5, 24 base pairs, respectively.

As shown in Table 2, we found that there were 2 nucleotides changes in nucleoprotein, one silent mutation, 898C>T, and one missense mutation, 994G>C which caused amino acid substitution, A332P (alanine to proline), in QS-SMB-P2 comparing to QS-05 and QS-BHK-P7. The identity of nucleotide and amino acid was 99% (data not shown). There was no mutation among these three strains in P and M genes. We found 2 missense mutations, located both in the ectodomain of glycoprotein in QS-BHK-P7, causing 2 amino acid substitutions, S23R (serine to arginine) and H424P (histidine to proline). The identity of QS-BHK-P7 at nucleotide and amino acid levels was 99% as

compared to other two strains (data not shown). One missense mutation, 6352A>G resulted in K316E (lysine to glutamate), and two silent mutations, 6351G>A and 6354G>A, were observed in QS-SMB-P2 of RNA-dependent RNA polymerase (L gene). One missense mutation, 10537A>G resulted in I1711V (isoleucine to valine), and silent mutation, 9189C>T, were found in QS-BHK-P7. Gene junctions of QS-05 and QS05-SMB-P2 were identical. One point mutation, 2475A>G, located at non-coding region between P and M genes of QS-BHK-P7. This mutation lay at the 7th adenine residue of polyadenylation sequence. The identity of nucleotides between all 3 strains and 8743THA, Thai street strain, was 98%. No mutation was found in leader and trailer sequences.

Table 2 Nucleotide and amino acid changes of SMB-P2 and BHK-P7 in comparison to QS05

Position	Amino acid	Gene	Nucleotide		Amino acid	
			SMB-P2	BHK-P7	SMB-P2	BHK-P7
1-70		Leader	-	-	-	-
71-1423	450	N	898C>T 994G>C	-	A332P	-
1424-1514		inter N-P	-	-	-	-
1515-2408	297	P	-	-	-	-
2509-2495		inter P-M	-	2475A>G	-	-
2496-3104	202	M	-	-	-	-
3105-3315		inter M-G	-	-	-	-
3316-4890	524	G	-	3441T>G 4643A>C	-	S23R H424P
4891-5406		pseudogene	-	-	-	-
5407-11793	2128	L	6351G>A 6352A>G 6354G>A	9189C>T 10537A>G	K316E	I1711V
11794-11923		Trailer	-	-	-	-

Genetic diversity of glycoprotein gene

To determine whether the amino acid substitution at positions 23 and 424 of G protein was the result of viral quasiespecies or the adaptation to the new environment, indirect sequencing of QS-05 and QS-BHK-P7 clones of G gene was performed. In QS-05, all 20 clones were identical in nucleotide sequences with no amino acid substitution at positions 23 and 424. All 20 clones of QS-BHK-P7, had amino acid substitution, S23R, located at the ectodomain of rabies glycoprotein. This amino acid substitution at position 23 of glycoprotein could also be found in mouse brain-adapted

rabies virus, challenge virus standard (CVS)-24, that had been passaged in BHK-21 cells (CVS-B2c). Therefore, this substitution might represent the adaptation in non-neuronal cells. We found H424P (histidine to proline) substitution in 19 out of 20 clones of BHK-P7. One clone had proline at position 424 as in QS-05 and QS-SMB-P2.

Discussion

We showed here that adaptation of dog virus variant in non-neuronal cell line resulted in morphologic appearance of viral particles as examined by fluorescent antibody staining of infected BHK cells. Viral particles (QS05-BHK-P7) in cytoplasm appeared larger in size and increased in number; this became obvious by 7th passage. Further, QS05-BHK-P7 was able to cause mortality in adult mice by both IC and peripheral IM challenges whereas parental strain QS05 as well as its neuronal adapted strain, QS-SMB-P2 could only by IC route.

Such finding was intriguing since rabies viral pathogenicity usually became attenuated following passages in non-neuronal cell. These included SAD-B19 (oral vaccine strain) [passages of SAD (Street-Albama-Dufferin) strain in BHK cells] [4], CVS-B2c (CVS-N2c in non-neuronal cells, BHK-21 cells) [3]. The latter contained S23R mutation in glycoprotein gene; with higher replication rate than parental strain. CVS-B2c was less neurotropic both in vitro and in vivo comparing to CVS-N2c. Nishigahara stain was derived from the original Pasteur stain before 1915, had divergence at noncoding pseudogene region [5]. It was serially passaged through several kinds of animals and cell cultures and was used as seed strain for animal vaccine production. Non-pathogenic Ni-CE was resulted from Nishigahara strain after passages in chicken embryo fibroblast cells [6].

Alteration of viral transcription/replication, budding and immune evasive mechanism and spreading can affect the pathogenicity of virus [7-12]. This has been clearly demonstrated by modification of rabies viral gene(s) by reverse genetic technique [1, 2,13]. Higher replication rate and degree of apoptosis are inversely correlated and how well that the virus can evade immune system is directly correlated with pathogenicity [8,14-16]. Enhancement of neuroinvasiveness following IM inoculation has been observed after replacement of G or G and M genes of SAD-B19 with those of silver-haired bat-associated rabies virus strain 18 (SHBRV-18) [15].

Homeostasis in rabies virus replication/transcription is balanced by interaction between N, P and L genes. Failure to phosphorylate N resulted in the reduction of replication and transcription [9,17]. Overexpression of L gene resulted in enhanced RNA replication and virus titer. Such imbalanced protein expression also resulted in degree of cytopathic effect of infected cells expression [7]. Multifunctional M protein can regulate the transcription and replication. By attenuation of M expression, by shifting M gene to downstream L gene, lower replication level can be achieved [8]. As previously mentioned, Ni-CE was derived from Nishigahara strain. Clear cytopathic effect in mouse neuroblastoma cells has been clearly demonstrated after infection with Ni-CE but not with parental Nishigahara strain infection. Matrix protein of Ni-CE stain has a single amino acid substitution at position 95. This is a cytopathic determinant in mouse neuroblastoma cells [6]. Apoptosis also partly plays role in this.

Budding of rabies virus occurs at plasma membrane of the host cells. This process requires

glycoprotein and matrix protein expression. Although recombinant SAD-L16 strain (lacking of the entire G gene) could produce a non-infectious spike-less virion, virus release was decreased by 30-fold. M-deleted mutant has been shown to increase G expression at infected-cell surface with a drastic decrease in infectious virion [18].

Evasion of host immune response is one of the important characteristic of pathogenic rabies virus. This is influenced by both glycoprotein expression and sequence. An inverse relationship between pathogenicity and the amount of glycoprotein produced in infected cells has been documented. Comparing to the pathogenic SHBRV strain, the attenuated rabies virus strain, laboratory-adapted virus B2c, expressed higher glycoprotein level and triggered greater immune response [14]. A reshuffled Evelyn-Rokitnicki-Abelseth (ERA) rabies virus with the G gene switched with the M gene (N-P-G-M-L versus N-P-M-G-L of parental strain) conferred higher G expression according to the transcription gradient mechanism and resulted in less virulent phenotype comparing to parental strain [19].

Expression level of the G gene is not sufficient in attenuating pathogenicity [20, 21]. Sequences within the G gene also play role in determining the virulence of the virus. Recombinant nonpathogenic live rabies virus vaccine which has two G genes with Arg333Glu is able to control Asn194Lys mutation. Mutation at position 194 is associated with a reversion to the pathogenic phenotype [20]. Recombinant viruses with glycoprotein sequence unaltered from highly pathogenic wild type parental strain but with 2-3 folds more of the glycoprotein expression remain pathogenic [21].

Recently, ERA strain of rabies virus has been demonstrated to encode a carboxyl-terminal PDZ domain-binding motif within cytoplasmic domain of G gene that interacts with cellular PDZ proteins; serine-threonine kinases, MAST1 and MAST2 [16, 22]. These cellular protein targets control neuronal survival which promotes spreading and virulence of rabies virus. Only single amino acid change in this domain triggered apoptotic death of infected neurons resulted to attenuation of rabies virus. However, the difference in the degree of pathogenicity between QS-05 and QS05-BHK-P7 strains should not be explained by alteration of functional cellular PDZ proteins, since both of them share identical sequences of cytoplasmic G domain.

Both mutations at G gene ectodomain should not be responsible for an increased neurovirulence of QS05-BHK-P7. Amino acid substitution located at position 23 of glycoprotein gene has already been shown to be the non-neuronal adaptation marker of CVS-adapted strain, CVS-B2C, with attenuated pathogenicity [3]. This finding was consistent with the indirect sequencing result of all 20 colonies of QS05-BHK-P7 that possessed S23R mutation. Owing to the lack of supporting study, the impact of the another mutation, H424P, on pathogenicity is still unknown.

The mutations in L gene are intriguing. D1671V mutation within domain VI and G1481R between domains V and VI of vesicular stomatitis virus (VSV) L protein inhibited viral mRNA cap methylation and further reduced transcription and replication *in vitro* [23,24]. In the case of Sendai virus, alanine substitution at charged residues in conserved domain III affected viral protein stability and might attenuate pathogenicity [25]. Abrogation of polymerase activity in rabies virus was accomplished by altering the GDN motif in motif C [26]. However, replacement of L gene of pathogenic strain, SHBRV-18, with vaccine strain, SAD-B19, did not alter pathogenicity of the recombinant virus [27]. Besides, one amino acid substitution in L gene which was found following 4th passage of SAD-B19 strain in foxes did not affect the virulence *in vivo* [28]. Thus, the importance of synonymous and nonsynonymous mutations in polymerase (L) gene of QS05-BHK-P7 (both of which not residing in 6 documented functional domains) on virulence is still inconclusive.

Non-coding sequences located between coding gene regions or IGR has been reported to play role in viral pathogenicity and gene expression. Transcription gradient occurs as a result of the dissociation of polymerase complex when it reaches transcription stop signal between each gene junction in rabies [29]. Re-initiation of downstream gene transcription, therefore, is lower than the predecessor at approximately 30%. The IGR length has impact on rabies gene expression. Overexpression of polymerase gene was achieved by replacing G/L (24 nucleotides) with N/P (2 nucleotides) IGR [7]. Relocation of M with G gene in ERA recombinant virus resulting in increased glycoprotein expression and attenuated phenotype [19]. This emphasized the importance of the gene order. The sequences per se involved in viral virulence. In the case of VSV, mutation of the intergenic dinucleotide sequences increased read-through mechanism across the P/M gene junction [30]. Deletion of conserved AUACU₇ sequences, polyadenylation signal of VSV, resulted in the loss of transcription termination of upstream transcripts [31]. Seven U residues was the minimum number required for transcription termination of upstream mRNA. The shortened or complete deletion of U7 tract or nucleotide substitution at the 7thU of U7 tract gave rise to the readthrough transcripts [32].

We hypothesize that A>G mutation at the 7th polyadenylation sequence located between P and M gene junction may cause the read-through mechanism with the consumption that glycoprotein of QS05-BHK-P7 strain is well adapted to support the spread of the virus. Owing to the transcription gradient and the read-through mechanism of polymerase across P/M IGR, we hypothesize that this may lead to attenuation of matrix protein expression but may increase in glycoprotein expression in QS05-BHK-P7 strain. The former should have an impact on viral budding, transcription/replication and immune evasive strategy that overcome the effect of over-expression of glycoprotein. The precise mechanism on how these mutations involved in the increased virulence of non-neuronal adapted strain remains to be further elucidated.

References

1. Albertini AA, Ruigrok RW, Blondel D. Rabies virus transcription and replication. *Adv Virus Res.* 2011;79:1-22.
2. Okumura A, Harty RN. Rabies virus assembly and budding. *Adv Virus Res.* 2011;79:23-32.
3. Morimoto K, Hooper DC, Carbaugh H, Fu ZF, Koprowski H, Dietzschold B. Rabies virus quasispecies: implications for pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 17;95(6):3152-6.
4. Vos A, Neubert A, Aylan O, Schuster P, Pommerening E, Müller T, Chivatsi DC. An update on safety studies of SAD B19 rabies virus vaccine in target and non-target species. *Epidemiol Infect.* 1999 Aug;123(1):165-75.
5. Sakamoto S, Ide T, Nakatake H, Tokiyoshi S, Yamamoto M, Kawai A, Smith JS. Studies on the antigenicity and nucleotide sequence of the rabies virus Nishigahara strain, a current seed strain used for dog vaccine production in Japan. *Virus Genes.* 1994 Jan;8(1):35-46.
6. Mita T, Shimizu K, Ito N, Yamada K, Ito Y, Sugiyama M, Minamoto N. Amino acid at position 95 of the matrix protein is a cytopathic determinant of rabies virus. *Virus Res.* 2008 Oct;137(1):33-9. Epub 2008 Jun 18.
7. Finke S, Cox JH, Conzelmann KK. Differential transcription attenuation of rabies virus genes by intergenic regions: generation of recombinant viruses overexpressing the polymerase gene. *J Virol.* 2000 Aug;74(16):7261-9.
8. Finke S, Mueller-Waldeck R, Conzelmann KK. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *J Gen Virol.* 2003 Jun;84(Pt 6):1613-21.
9. Shoji Y, Inoue S, Nakamichi K, Kurane I, Sakai T, Morimoto K. Generation and characterization of P gene-deficient rabies virus. *Virology.* 2004 Jan 5;318(1):295-305.
10. Cenna J, Hunter M, Tan GS, Papaneri AB, Ribka EP, Schnell MJ, Marx PA, McGettigan JP. Replication-deficient rabies virus-based vaccines are safe and immunogenic in mice and nonhuman primates. *J Infect Dis.* 2009 Oct 15;200(8):1251-60.
11. Masatani T, Ito N, Shimizu K, Ito Y, Nakagawa K, Sawaki Y, Koyama H, Sugiyama M. Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response. *J Virol.* 2010 Apr;84(8):4002-12. Epub 2010 Feb 3.
12. Masatani T, Ito N, Shimizu K, Ito Y, Nakagawa K, Abe M, Yamaoka S, Sugiyama M. Amino acids at positions 273 and 394 in rabies virus nucleoprotein are important for both evasion of host RIG-I-mediated antiviral response and pathogenicity. *Virus Res.* 2011 Jan;155(1):168-74. Epub 2010 Sep 25.
13. Lafon M. Evasive strategies in rabies virus infection. *Adv Virus Res.* 2011;79:33-53.
14. Wang ZW, Sarmiento L, Wang Y, Li XQ, Dhingra V, Tsegge T, Jiang B, Fu ZF. Attenuated

- rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host innate immune responses in the central nervous system. *J Virol.* 2005 Oct;79(19):12554-65.
15. Pulmanausahakul R, Li J, Schnell MJ, Dietzschold B. The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread. *J Virol.* 2008 Mar;82(5):2330-8. Epub 2007 Dec 19.
 16. Préhaud C, Wolff N, Terrien E, Lafage M, Mégret F, Babault N, Cordier F, Tan GS, Maitrepierre E, Ménager P, Choppy D, Hoos S, England P, Delepierre M, Schnell MJ, Buc H, Lafon M. Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. *Sci Signal.* 2010 Jan 19;3(105):ra5.
 17. Wu X, Gong X, Foley HD, Schnell MJ, Fu ZF. Both viral transcription and replication are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. *J Virol.* 2002 May;76(9):4153-61.
 18. Mebatsion T, Weiland F, Conzelmann KK. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J Virol.* 1999 Jan;73(1):242-50.
 19. Wu X, Rupprecht CE. Glycoprotein gene relocation in rabies virus. *Virus Res.* 2008 Jan;131(1):95-9. Epub 2007 Sep 11.
 20. Faber M, Faber ML, Li J, Preuss MA, Schnell MJ, Dietzschold B. Dominance of a nonpathogenic glycoprotein gene over a pathogenic glycoprotein gene in rabies virus. *J Virol.* 2007 Jul;81(13):7041-7. Epub 2007 Apr 25.
 21. Wirblich C, Schnell MJ. Rabies virus (RV) glycoprotein expression levels are not critical for pathogenicity of RV. *J Virol.* 2011 Jan;85(2):697-704. Epub 2010 Nov 10.
 22. Javier RT, Rice AP. Emerging Theme: Cellular PDZ Proteins as Common Targets of Pathogenic Viruses. *J Virol.* 2011 Jul 20. [Epub ahead of print]
 23. Grdzlishvili VZ, Smallwood S, Tower D, Hall RL, Hunt DM, Moyer SA. A single amino acid change in the L-polymerase protein of vesicular stomatitis virus completely abolishes viral mRNA cap methylation. *J Virol.* 2005 Jun;79(12):7327-37.
 24. Grdzlishvili VZ, Smallwood S, Tower D, Hall RL, Hunt DM, Moyer SA. Identification of a new region in the vesicular stomatitis virus L polymerase protein which is essential for mRNA cap methylation. *Virology.* 2006 Jul 5;350(2):394-405. Epub 2006 Mar 13.
 25. Smallwood S, Easson CD, Feller JA, Horikami SM, Moyer SA. Mutations in conserved domain II of the large (L) subunit of the Sendai virus RNA polymerase abolish RNA synthesis. *Virology.* 1999 Sep 30;262(2):375-83.
 26. Schnell MJ, Conzelmann KK. Polymerase activity of in vitro mutated rabies virus L protein. *Virology.* 1995 Dec 20;214(2):522-30.

27. Faber M, Pulmanausahakul R, Nagao K, Prosniak M, Rice AB, Koprowski H, Schnell MJ, Dietzschold B. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 16;101(46):16328-32. Epub 2004 Nov 1.
28. Beckert A, Geue L, Vos A, Neubert A, Freuling C, Müller T. Genetic stability (in vivo) of the attenuated oral rabies virus vaccine SAD B19. *Microbiol Immunol*. 2009 Jan;53(1):16-21.
29. Jackson AC, Wunner WH: Rabies. Amsterdam: Academic Press; 2002.
30. Stillman EA, Whitt MA. Mutational analyses of the intergenic dinucleotide and the transcriptional start sequence of vesicular stomatitis virus (VSV) define sequences required for efficient termination and initiation of VSV transcripts. *J Virol*. 1997 Mar;71(3):2127-37.
31. Hwang LN, Englund N, Pattnaik AK. Polyadenylation of vesicular stomatitis virus mRNA dictates efficient transcription termination at the intercistronic gene junctions. *J Virol*. 1998 Mar;72(3):1805-13.
32. Barr JN, Whelan SP, Wertz GW. cis-Acting signals involved in termination of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis include the conserved AUAC and the U7 signal for polyadenylation. *J Virol*. 1997 Nov;71(11):8718-25.

Role of inhibitory neurons in the pathogenesis of paralytic and furious rabies in canine

¹Preecha Ruangvejvorachai

²Chatchai Nopvichai

³Veera Tepsumethanon

⁴Supaporn Wacharapluesadee

^{4,5}Thiravat Hemachudha

^{1,2,4,*}Shanop Shuangshoti

¹Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

²Chulalongkorn GenePRO Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

³Queen Saovabha Memorial Institute, Bangkok, Thailand

⁴WHO Collaborating Center for Research and Training on Viral Zoonoses, Bangkok, Thailand

⁵Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Running Title: Inhibitory neurons in paralytic and furious rabies.

***Correspondence:** Professor Shanop Shuangshoti, MD, Department of Pathology and WHO Collaborating Center for Research and Training on Viral Zoonoses, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama 4 Road, Bangkok 10330, Thailand. Phone: +66-2-256-4235; Fax: +66-2-652-4208

e-mail: Shanop@gmail.com

Abstract

Reduction of inhibitory neurons have been observed in cerebral cortex of mice experimentally infected with rabies virus, and in some human psychiatric and neurological diseases such as schizophrenia and epilepsy. To investigate the possible role of inhibitory neurons in the contribution of paralytic and furious symptoms in rabies, postmortem examination of the brain was performed in 15 rabies infected dogs (8 furious and 7 paralytic cases). Parvalbumin-positive neurons were countered at several brain regions, including neocortex (frontal, parietal, temporal, and occipital lobes), caudate nucleus, thalamus and hippocampus. Significant difference in the number of inhibitory neurons between the two clinical forms of rabies was found only at the frontal cortex where greater number of inhibitory neurons was observed in the furious canine. It remains to be further investigated whether or not the inhibitory neurons in both forms of rabies carry the same rate of rabies viral infection.

Keywords: Rabies, furious rabies, paralytic rabies, inhibitory neuron, parvalbumin

Introduction

Rabies is an almost universally fatal infectious disease of the central nervous system (CNS), caused by a neurotropic RNA virus of genotype 1 in the family *Rhabdoviridae*, genus *Lyssavirus* [1]. The worldwide number of rabies deaths as estimated by the World Health Organization survey in 1998 was 55,000 annually, with the highest incidence found in Asia [2]. Based on the recent report in Thailand, about 21 patients (0.03 per 100,000 population) die of rabies each year in Thailand [3].

In humans and dogs, rabies can manifest either as furious or paralytic forms. Limbic symptoms dominate the clinical picture in the former, whereas paralysis of lower motor neuron type is the salient feature of the latter [4]. The ratio between furious and paralytic rabies in human cases is approximately 3: 1 [5]. Furious rabies patients tend to die faster (average within 5.7 days compared to 11 days in paralytic form) [4]. The mechanisms contributing to the two distinct clinical forms remain poorly understood.

CNS neurons are divided into two main subgroups, excitatory (~80%) and inhibitory (~20%) neurons. The former uses glutamate as a key neurotransmitter while the other uses GABA (gamma-aminobutyric acid). Reduction of inhibitory neurons was demonstrated in the prefrontal cortex of schizophrenic brains [6, 7] and in the temporal lobe of epilepsy [8, 9].

Studies of inhibitory neurons in rabies have been sparse, and were done only in mice [10-12]. Significant reduction of inhibitory neurons in the cerebral cortex was found in mice experimentally infected with rabies [10], suggesting the role of inhibitory neurons in rabies encephalitis. Since mice do not have the 2 clinical symptoms (furious and paralytic) as observed in human and dog, the current study was conducted to determine whether the inhibitory neuron was affected equally or not between the furious and paralytic rabid dogs.

Materials and Methods

Animals

15 naturally rabies-infected dogs (8 furious and 7 paralysis) were enrolled in the study. Each animal was observed for rabies signs at the quarantine and diagnostic unit of the Queen Saovabha Memorial Institute. The diagnosis was confirmed by identification of rabies viral RNA in saliva by nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) [13]. Categorization of canine furious or paralytic rabies was based on the following clinical features: aggression and biting behavior in furious, and hind limb paresis with none or only mild degree of aggression in paralytic rabies [14].

Collection of samples and tissue preparations

All brains were fixed with 10% buffered formalin. The regions studied included neocortices (frontal, parietal, temporal, and occipital regions), caudate nucleus, thalamus and hippocampus. One section was taken from each brain and brainstem regions. All specimens were routinely processed and embedded in paraffin wax. Four-micrometer-thick sections of all paraffin blocks were stained with hematoxylin and eosin. Standard indirect immunohistochemical method was carried out by automated stainer (Ventana Benchmark LT, Tucson, USA), using anti-parvalbumin antibody (Abcam, Canbridge, UK, at dilution of 1: 100,000) as an inhibitory neuronal marker. Negative control was performed by omission of the primary antibody.

Analysis of parvalbumin-positive neurons

Parvalbumin-positive neurons were viewed under a light microscope (Olympus, BX41TF, Japan) at 400x magnification (high-power field, HPF). All positive neurons in 10-20 consecutive HPF were manually counted. Analysis was performed blind to the clinical data.

Statistical analysis

Number of parvalbumin-positive neurons at each brain region was compared between the furious and paralytic groups of rabid dogs using the Mann-Whitney U test for a two-tailed test. Statistical analyses were performed using Statistical Package for Social Science software (SPSS version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

Results

In the cerebral cortex of paralytic rabies (Table 1), parvalbumin-positive neurons were mostly frequently found in the occipital, followed by the parietal, frontal, and temporal cortices. In furious rabies, parvalbumin-positive neurons were most populated also in the occipital cortex, followed by the frontal, parietal, and temporal cortices. The midline structures (thalamus, caudate, and hippocampus) contain few inhibitory neurons in both clinical forms. When the number of parvalbumin-positive neurons was compared between the paralytic and furious rabies, significant difference was observed only at the frontal cortex, 7.31 ± 3.21 positive neurons per HPF for furious and 3.95 ± 2.23 for paralytic rabies ($p=0.029$).

Table 1. Distribution of parvalbumin-positive neurons in various brain regions in canine paralytic and furious rabies

Brain Regions	Paralytic rabies (N=7)	Furious Rabies (N=8)	
	Parv-positive neurons/HPF (Mean $\pm$ SD)	Parv-positive neurons/HPF (Mean $\pm$ SD)	<i>p</i> -value
Frontal lobe	3.95 ± 2.23	7.31 ± 3.21	0.029
Temporal lobe	0.79 ± 0.78	4.02 ± 3.36	0.054
Parietal lobe	6.64 ± 3.54	6.70 ± 2.69	0.955
Occipital lobe	16.06 ± 6.65	16.20 ± 3.40	0.694
Thalamus	0.14 ± 0.38	0.11 ± 0.18	0.397
Hippocampus	0.13 ± 0.16	0.05 ± 0.53	0.536
Caudate nucleus	0.96 ± 1.2	0.71 ± 0.78	0.955

Parv = Parvalbumin, HFP = high-power field, SD = standard deviation

Discussion

The basic mechanism of furious or paralysis symptoms in human and canine rabies remains unknown. The observation that the same rabid dog transmitted paralytic rabies to one and furious to another may suggest differential response of host [15]. Sequence analysis of glycoprotein (G), nucleoprotein and phosphoprotein genes of rabies virus isolated from human patients and dogs with furious and paralysis did not show any specific pattern [16]. Study of genetic diversity of the G gene of rabies virus within a single rabies infected dog by comparing the cloned sequences in the virus population showed closely related heterogeneous populations with minor substitutions at nucleotide and amino acid levels [17].

Although previous magnetic resonance imaging (MRI) studies in human rabies patients revealed no differences between both clinical forms [18], our recent study in canine rabies at the early stage of disease has shown otherwise [19]. Abnormal lesion localization was similar in both clinical forms at the inferomedial temporal lobes, hippocampi, hypothalami, brainstem, and upper spinal cord; however, it was more pronounced in paralytic cases particularly at the brainstem. Nevertheless, the neuroimaging and neuropathological findings do not explain the furious or paralytic symptoms.

Role of inhibitory neurons in rabies encephalitis has been suggested by demonstration of reduced inhibitory neurons in the cerebral cortex of mice experimentally infected with rabies virus [10-12]. Interestingly, reduction of inhibitory neurons was also observed in human diseases such as schizophrenia and epilepsy [6-9]. We, therefore, hypothesized whether the reduction of inhibitory neurons could explain the furious or paralytic symptoms in rabies. Based on our results, significant difference was only found at the canine frontal cortex where greater number of inhibitory neurons was observed in furious rabies. It, however, remains to be further investigated if the inhibitory neurons show different or comparable rate of rabies viral infection by double-labeling (rabies viral antigen and parvalbumin) immunohistochemical study.

In conclusion, the number of inhibitory neurons is generally comparable in canine paralytic and furious rabies, except for the frontal lobe where greater number of inhibitory neurons was demonstrated in furious form. It remains to be investigated

whether or not the inhibitory neurons in both forms of rabies carry the same rate of rabies infection.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund (DBG5180026).

References

1. Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T (2002). Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis* **2**: 327-43.
2. Knobel DL, Cleaveland S, Coleman PG, Fevre EM, Meltzer MI, Miranda ME, Shaw A, Zinsstag J, Meslin FX (2005). Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull World Health Organ* **83**: 360-8.
3. Chuxnum T, Choomkasien P (2010). Epidemiology of Human Rabies in Thailand, B.E.2546 - 2550 (2003 - 2007 AD). *Tren Res Sci Technol* **2**: 71-5.
4. Mitrabhakdi E, Shuangshoti S, Wannakrairot P, Lewis RA, Susuki K, Laothamatas J, Hemachudha T (2005). Difference in neuropathogenetic mechanisms in human furious and paralytic rabies. *J Neurol Sci* **238**: 3-10.
5. Hemachudha T, Laothamatas J, Rupprecht CE (2002). Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Neurol* **1**: 101-9.
6. Konopaske GT, Sweet RA, Wu Q, Sampson A, Lewis DA (2006). Regional specificity of chandelier neuron axon terminal alterations in schizophrenia. *Neuroscience* **138**: 189-96.
7. Pierri JN, Chaudry AS, Woo TU, Lewis DA (1999). Alterations in chandelier neuron axon terminals in the prefrontal cortex of schizophrenic subjects. *Am J Psychiatry* **156**: 1709-19.
8. Andrioli A, Alonso-Nanclares L, Arellano JI, DeFelipe J (2007). Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus. *Neuroscience* **149**: 131-43.
9. DeFelipe J (1999). Chandelier cells and epilepsy. *Brain* **122**: 1807-22.
10. Rengifo AC, Torres-Fernández O (2007). Decreased number neurons expressing GABA in the cerebral cortex of rabies-infected mice. *Biomedica* **27**: 548-58.

11. Torres-Fernández O, Yepes GE, Gómez JE, Pimienta HJ (2005). Calbindin distribution in cortical and subcortical brain structures of normal and rabies-infected mice. *Int J Neurosci* **115**: 1375-82.
12. Torres-Fernández O, Yepes GE, Gómez JE, Pimienta HJ (2004). Effect of rabies virus infection on the expression of parvalbumin, calbindin and calretinin in mouse cerebral cortex. *Biomedica* **24**: 63-78.
13. Wacharapluesadee S, Hemachudha T (2001). Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies. *Lancet* **358**: 892-3.
14. Tepsumethanon V, Wilde H, Meslin FX (2005). Six criteria for rabies diagnosis in living dogs. *J Med Assoc Thai* **88**: 419-22.
15. Hemachudha T, Phanuphak P, Sriwanthana B, Manutsathit S, Phanthumchinda K, Siriprasomsup W, Ukachoke C, Rasameechan S, Kaoroptham S (1988). Immunologic study of human encephalitic and paralytic rabies. Preliminary report of 16 patients. *Am J Med* **84**: 673-7.
16. Hemachudha T, Wacharapluesadee S, Lumlertdaecha B, Orciari LA, Rupprecht CE, La-Ongpant M, Juntrakul S, Denduangboripant J (2003). Sequence analysis of rabies virus in humans exhibiting encephalitic or paralytic rabies. *J Infect Dis* **188**: 960-6.
17. Khawplod P, Shoji Y, Ubol S, Mitmoonpitak C, Wilde H, Nishizono A, Kurane I, Morimoto K (2006). Genetic analysis of dog rabies viruses circulating in Bangkok. *Infect Genet Evol* **6**: 235-40.
18. Laothamatas J, Hemachudha T, Mitrabhakdi E, Wannakrairot P, Tulayadaechanont S (2003). MR imaging in human rabies. *AJNR Am J Neuroradiol* **24**: 1102-9.
19. Laothamatas J, Wacharapluesadee S, Lumlertdacha B, Ampawong S, Tepsumethanon V, Shuangshoti S, Phumesin P, Asavaphatiboon S, Woraprukjaru L, Avihingsanon Y, Israsena N, Lafon M, Wilde H, Hemachudha T (2008). Furious and paralytic rabies of canine origin: neuroimaging with virological and cytokine studies. *J Neurovirol* **14**: 119-29.

Comprehensive proteome analysis of hippocampus, brainstem and spinal cord from paralytic and furious dogs naturally infected with rabies

Natthapaninee Thanomsridetchai¹, Nilubon Singhto², Veera Tepsumethanon³, Shanop Shuangshoti⁴, Supaporn Wacharapluesadee⁴, Supachok Sinchaikul⁵, Shui-Tein Chen⁵, Thiravat Hemachudha^{4,*}, and Visith Thongboonkerd^{2,5,*}

¹*Inter-Department Program of Biomedical Sciences, Faculty of Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

²*Medical Proteomics Unit, Office for Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

³*Queen Saovabha Memorial Institute, Bangkok, Thailand*

⁴*Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and WHO Collaborating Center for Research and Training on Viral Zoonoses, Bangkok, Thailand*

⁵*Institute of Biological Chemistry and Genomic Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwan*

⁶*Center for Research in Complex Systems Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

Running Title: Proteomic analysis of Rabies

Keywords: Brainstem; Furious; Hippocampus; Paralytic; Proteomics; Rabies; Spinal cord

***Correspondence to:**

Visith Thongboonkerd

Head of Medical Proteomics Unit, Office for Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, 12th Floor Adulyadejvikrom Building, 2 Prannok Rd., Bangkoknoi, Bangkok 10700, Thailand. Phone/Fax: +66-2-4184793

e-mail: thongboonkerd@dr.com (or) vthongbo@yahoo.com

(or to)

Thiravat Hemachudha

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and WHO Collaborating Centre for Research and Training on Viral Zoonoses, Rama 4 Road, Bangkok 10330, Thailand. Phone: +66-2-6523122; Fax: +66-2-6523122

e-mail: fmedthm@gmail.com (or) th-cu@usa.net

ABSTRACT

Paralytic and furious forms are unique clinical entities of rabies in humans and dogs. However, molecular mechanisms underlying these disorders remained unclear. We investigated changes in proteomes of hippocampus, brainstem and spinal cord of paralytic and furious dogs naturally infected with rabies compared to non-infected controls. Proteins were extracted from these tissues and analyzed by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) (n=6 gels/region in each group, a total of 54 gels were analyzed). From >1,000 protein spots visualized in each gel, spot matching, quantitative intensity analysis and ANOVA with Tukey's post-hoc multiple comparisons revealed 32, 49 and 67 protein spots that were differentially expressed among the three clinical groups in hippocampus, brainstem and spinal cord, respectively. These proteins were then identified by quadrupole time-of-flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry (Q-TOF MS and MS/MS), including anti-oxidants, apoptosis-related proteins, cytoskeletal proteins, heat shock proteins/chaperones, immune regulatory proteins, metabolic enzymes, neuron-specific proteins, transcription/translation regulators, ubiquitination/proteasome-related proteins, vesicular transport proteins, and hypothetical proteins. Among these, 13, 17 and 41 proteins in hippocampus, brainstem and spinal cord, respectively, significantly differed between paralytic and furious forms, and thus may potentially be biomarkers to differentiate these two distinct forms of rabies. In summary, we report herein for the first time a large dataset of changes in proteomes of hippocampus, brainstem and spinal cord in dogs naturally infected with rabies. These data will be useful for better understanding of molecular mechanisms of rabies and for differentiation of its paralytic and furious forms.

INTRODUCTION

Rabies remains an important public health problem in some regions as the fatal outcome is expected to almost all cases once symptoms and signs develop. Only three survivors with no or non-significant complications have been reported, all of which were associated with bat variants.¹⁻³ Comparing between dog- and bat-related rabies, patients who are associated with dog variants exhibit more unique clinical manifestations, including paralytic and furious forms. Also, lesser degree of immune response to rabies virus has been shown in dog-associated cases.⁴ None of the patients with dog-associated rabies in Thailand, Cambodia and Africa had positive test for rabies antibody in cerebrospinal fluid (CSF).^{5,6} Additionally, the detection of antibody against rabies virus in serum is also unpredictable in dog-associated cases. In contrast, CSF and serum levels of anti-rabies antibody appear to be correlated with duration of survival in bat-associated cases.⁷

Comparing the two unique forms of rabies, different anatomical involvements of the nervous system have been shown in patients with paralytic versus furious rabies. In paralytic form, peripheral nerve axonopathy or myelinopathy, not the defect of motor neuron in spinal cord, is responsible for muscle weakness.⁸ In furious form, although anterior horn cells of spinal cord are affected, clinical deficits from these defective cells are not found and their defects can be detected only by electrophysiological investigations.⁸ Innate immune response in the brain of paralytic dogs have been detected with greater degree as compared to that of furious dogs, and is inversely correlated with viral amount in the brain.⁹ Also, disturbance of magnetic resonance imaging (MRI) signals of the brain in paralytic is greater than that of furious rabies-infected patients and dogs.⁵ The faster time to death is another characteristic of furious rabies. Despite dissimilarity of clinical manifestations, imaging features, clinical courses and the amount of viral load in the brain, they share similar pathologies of the central nervous system (CNS), including scant inflammation.^{4,8,10}

Lack of apoptosis in the CNS has been shown to be a marker for virulence of wild-type or street rabies virus in order to escape immune recognition and to facilitate spreading.¹¹⁻¹⁶ In contrast, fixed virus, such as the challenged virus standard (CVS) strain, induces marked degree of apoptosis in the infected neurons.¹⁷⁻²⁰ Intriguingly, neurons of different regions display diverse degrees of resistance to cell death. It has been demonstrated that motor neurons of spinal cord resist to apoptosis and cytolysis, and remain functioning several days after CVS infection.²¹ However, hippocampal neurons become apoptotic shortly after the infection.²¹ Midline CNS structures, i.e. thalamus, brainstem, basal ganglia and spinal cord, have been shown to be preferentially infected with rabies in both humans and dogs.^{9,10,22} Therefore, the survival of neurons may depend not only on the viral strain but also on differential site-specific responses.

Despite the aforementioned knowledge on rabies, its molecular mechanisms remained unclear. We therefore performed a proteomic study of three regions of the CNS, including hippocampus, brainstem and spinal cord, of dogs naturally infected with rabies. Proteins were extracted from CNS tissues obtained from paralytic and furious dogs and then subjected to proteomic analysis using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) compared to the non-infected controls.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

The CNS tissues were taken from rabies-infected paralytic (n = 3) and furious (n = 3) dogs, as well as non-infected controls (n = 6). Each animal was observed at the Quarantine and Rabies Diagnostic Unit of the Queen Saovabha Memorial Institute (QSMI). The animals were suspected of having furious or paralytic rabies according to criteria previously reported.⁹ The animals died naturally without receiving any supportive treatment. From each animal, three locales of the CNS tissues, including hippocampus, brainstem (midbrain, pons and medulla) and spinal cord were taken and were saved at -70°C until used.

Immunoperoxidase staining of rabies antigen

The diagnosis of rabies was confirmed by the presence of rabies antigen in the CNS tissues. Paraffin-embedded sections of formalin-fixed tissues (3-µm-thick) were stained with anti-rabies nucleocapsid polyclonal antibody (Bio-Rad; Marnes-la-Coquette, France) at a dilution of 1:80. After rinsing with PBS, the sections were incubated with respective secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase in the DAKO EnVision™-System kit (DAKO Corporation; CA) for 30 min. The slides were then washed with PBS and incubated for 10 min with a peroxidase substrate containing 0.5 mg/ml diaminobenzidine (Sigma; St. Louis, MO), 30% H₂O₂ and 1 M imidazole in Tris-HCl buffer. After rinsing by tap water, the tissues were counterstained with hematoxylin.

Protein extraction

The tissues were briskly frozen in liquid nitrogen, ground to powder, resuspended in a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 120 mM dithiothreitol (DTT), 2% (v/v) ampholytes (pH 3-10)

and 40 mM Tris-base, and incubated at 4°C for 30 min. Unsolubilized nuclei, cell debris, and particulate matters were removed by a centrifugation at 10,000 rpm, 4°C for 5 min. Protein concentrations were determined by the Bradford method using Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA).

Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

For the controlled group, each gel was derived from each sample (n = 6 gels/region). For the paralytic and furious groups, duplicated 2-D gels were derived from each sample to have 6 gels/region in each group. Overall, a total of 54 gels were analyzed in this study. For each 2-D gel, Immobiline DryStrip (non linear pH gradient of 3-10, 7 cm long; GE Healthcare, Uppsala, Sweden) was rehydrated overnight with an equal amount of 150 µg total protein that was premixed with a rehydration buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2% (v/v) ampholytes (pH 3-10), 120 mM DTT, 40 mM Tris-base, and bromophenol blue (to make the final volume of 150 µl per strip). The first dimensional separation or isoelectric focusing (IEF) was performed in Ettan IPGphor III System (GE Healthcare) at 20°C, using a stepwise mode to reach 9,083 Vh with limiting current of 50 mA/ strip. After completion of the IEF, the strips were first equilibrated for 15 min in an equilibration buffer containing 6 M urea, 130 mM DTT, 112 mM Tris-base, 4% SDS, 30% glycerol and 0.002% bromophenol blue, and then in another similar buffer that replaced DTT with 135 mM iodoacetamide, for further 15 min. The second dimensional separation was performed in 12% polyacrylamide gel using SE260 Mini-Vertical Electrophoresis Unit (GE Healthcare) at 150V for approximately 2 h. The resolved protein spots were stained with SYPRO Ruby fluorescence dye (Invitrogen/Molecular Probes; Eugene, OR) overnight and then visualized using Typhoon 9200 laser scanner (GE Healthcare).

Spot matching and quantitative intensity analysis

Image Master 2D Platinum software (GE Healthcare) was used for matching and analysis of protein spots in 2-D gels. Parameters used for spot detection were (i) minimal area = 10 pixels; (ii) smooth factor = 2.0; and (iii) saliency = 2.0. A reference gel was created from an artificial gel combining all of the spots presenting in different gels into one image. The reference gel was then used for determination of existence and difference of protein expression between gels. Background subtraction was performed and the intensity volume of each spot was normalized with total intensity volume (summation of the intensity volumes obtained from all spots within the same 2-D gel).

Statistical analysis

All the quantitative data are reported as mean $\pm$ SEM. Intensity volumes of individual spots matched across different gels were compared among groups by multiple comparisons using one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc test (SPSS; version 13.0). P values less than 0.05 were considered as statistical significant. Significantly differed protein spots were subjected to in-gel tryptic digestion and identification by mass spectrometry.

In-gel tryptic digestion

All the protein spots whose intensity levels significantly differed among groups were excised from 2-D gels, washed twice with 200 μ l of 50% acetonitrile (ACN)/25 mM NH_4HCO_3 buffer (pH 8.0) at room temperature for 15 min, and then washed once with 200 μ l of 100% ACN. After washing, the solvent was removed, and the gel pieces were dried by a SpeedVac concentrator (Savant; Holbrook, NY) and rehydrated with 10 μ l of 1% (w/v) trypsin (Promega; Madison, WI) in 25 mM NH_4HCO_3 . After rehydration, the gel pieces were

crushed and incubated at 37°C for at least 16 h. Peptides were subsequently extracted twice with 50 µl of 50% ACN/5% trifluoroacetic acid (TFA); the extracted solutions were then combined and dried with the SpeedVac concentrator. The peptide pellets were resuspended with 10 µl of 0.1% TFA and purified using ZipTip_{C18} (Millipore; Bedford, MA). The peptide solution was drawn up and down in the ZipTip_{C18} ten times and then washed with 10 µl of 0.1% formic acid by drawing up and expelling the washing solution three times. The peptides were finally eluted with 5 µl of 75% ACN/0.1% formic acid.

Protein identification by Q-TOF MS and MS/MS analyses

The trypsinized samples were premixed 1:1 with the matrix solution containing 5 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in 50% ACN, 0.1% (v/v) TFA and 2% (w/v) ammonium citrate, and deposited onto the 96-well MALDI target plate. The samples were analyzed by Q-TOF UltimaTM mass spectrometer (Micromass; Manchester, UK), which was fully automated with predefined probe motion pattern and the peak intensity threshold for switching over from MS survey scanning to MS/MS, and from one MS/MS to another. Within each sample well, parent ions that met the predefined criteria (any peak within the m/z 800 – 3,000 range with intensity above 10 count $\pm$ include/exclude list) were selected for CID MS/MS using argon as the collision gas and a mass dependent $\pm$ 5 V rolling collision energy until the end of the probe pattern was reached. The MS and MS/MS data were extracted and outputted as the searchable *.txt* and *.pkl* files, respectively, for independent searches using the MASCOT search engine (<http://www.matrixscience.com>), assuming that peptides were monoisotopic. Fixed modification was carbamidomethylation at cysteine residues, whereas variable modification was oxidation at methionine residues. Only one missed trypsin cleavage was allowed, and peptide mass tolerances of 100 and 50 ppm were allowed for peptide mass fingerprinting and MS/MS ions search, respectively.

RESULTS

We investigated changes in tissue proteomes of hippocampus, brainstem and spinal cord of paralytic ($n = 3$) and furious ($n = 3$) dogs naturally infected with rabies compared to the non-infected controls ($n = 6$). Rabies infection was confirmed in paralytic and furious dogs by positive immunoperoxidase staining of rabies nucleocapsid protein in their CNS tissues (as illustrated in brown in **Figure 1**). Proteins were extracted from these tissues and analyzed by 2-DE ($n = 6$ gels/region for each group, with or without replication of individual samples; a total of 54 gels were analyzed). From >1,000 protein spots visualized in each gel, spot matching, quantitative intensity analysis and ANOVA with Tukey's post-hoc multiple comparisons revealed 32, 49 and 67 protein spots that were differentially expressed among the three clinical groups in hippocampus (**Figure 2**), brainstem (**Figure 3**) and spinal cord (**Figure 4**), respectively. These differentially expressed proteins were then identified by Q-TOF MS and/or MS/MS analyses. Their mass spectrometric data (identities, identification scores, sequence coverage, number of matched peptides, isoelectric point or pI, molecular weight or MW, etc.), quantitative intensity data, and p values obtained from ANOVA as well as Tukey's post-hoc multiple comparisons are summarized in **Supplementary Tables S1-S3**, respectively.

These identified proteins were classified into 11 main categories, namely anti-oxidants, apoptosis-related proteins, cytoskeletal proteins, heat shock proteins/chaperones, immune regulatory proteins, metabolic enzymes, neuron-specific proteins, transcription/translation regulators, ubiquitination/proteasome-related proteins, vesicular transport proteins, and hypothetical proteins (**Figure 5**). Among these, the top three of most changes (in term of number of differentially expressed proteins in each functional category) were metabolic enzymes (32%), vesicular transport (20%) and cytoskeletal proteins (15%), respectively (**Figure 5**). Some proteins were identified as more than one form of the same

protein. For example, annexin A2 was identified from spots #1215 and #1408 derived from spinal cord with a slight difference of their molecular masses in the 2-D proteome map (spot #1215 had a slightly greater molecular mass) (**Figure 4**). Similarly, annexin A6 was identified from both hippocampus (spot #258) and brainstem (spot #246) with a slight difference of their molecular masses in the 2-D proteome map (spot #258 had a slightly greater molecular mass) (**Figures 2 and 3**). These were most likely due to post translational modifications (PTMs) or cleavage that could alter molecular masses, isoelectric points and cellular function of different forms of the same protein.²³

DISCUSSION

Natural infection of rabies virus in dog is an ideal animal model for studying the pathogenesis of rabies.⁹ Paralytic and furious manifestations can be found in rabies-infected dogs, resembling those of humans. Our results indicate that paralytic and furious rabies had a marked degree of alterations in their proteome profiles of three different locales of the CNS, including hippocampus, brainstem and spinal cord, as compared to the non-infected controls. The differentially expressed proteins were involved in many biological processes in response to stress and to the process of rabies viral infection (**Figure 5**).

Among 11 main functional categories of significantly altered proteins affected by rabies, some functional groups drew our attention as they might be directed to better understanding of the molecular mechanisms of rabies (both paralytic and furious forms). These included: (i) anti-oxidants, (ii) apoptosis-related proteins; (iii) cytoskeletal proteins; (iv) heat shock proteins/chaperones; (v) immune regulatory proteins; and (vi) neuron-specific proteins (**Table 1**). Functional significance and potential roles of these proteins are highlighted as follows.

(i) Anti-oxidants: Oxidative stress has been reported in rabies.²⁴⁻²⁶ Jackson and colleagues²⁷ have demonstrated that rabies virus infection in cultured DRG neurons derived from adult mice caused axonal injury through oxidative stress. Protective proteins (i.e. anti-oxidants) have been shown to be up-regulated to counteract the oxidative stress induced by rabies infection.²⁸ *In vivo*, oxidative stress may explain previous observations of the neuronal degeneration processes in the study of transgenic mice.²⁹ In our present study, we found both up- and down-regulations of anti-oxidants in brainstem and spinal cord of paralytic dogs, and down-regulation of one antioxidant protein in the spinal cord of furious dogs (**Table 1**). These data implicate that the disease process might be at the later stage than anti-oxidants

could handle to protect the CNS from oxidative stress (i.e. irreversible deterioration stage). Analysis of the brains at an earlier stage will be helpful to address this hypothesis.

(ii) Apoptosis-related proteins: Even with severe clinical entities of both paralytic and furious dogs, there were only 1-2 apoptosis-related proteins that were significantly altered in each region of the CNS, including two forms of annexin A2, two forms of annexin A6, and cytochrome P450 2B12 (CYP11B12) (**Table 1**). These data were consistent with previous findings, demonstrating that apoptosis was almost undetectable in wild-type rabies virus infection.¹¹⁻¹⁵ Interestingly, one form of annexin A2 (spot #1215; full-length) was up-regulated in spinal cord of paralytic dogs, whereas another form (spot #1408; cleavage or fragmented) was down-regulated in spinal cord of furious dogs. Similarly, one form of annexin A6 (spot #258; full-length) was up-regulated in hippocampus of furious dogs, whereas another form (spot #246; cleavage or fragmented) was down-regulated in brainstem of furious dogs. These disparate results underscore the important role of PTMs and/or cleavage on the functional roles of differential forms of the same protein.³⁰

(iii) Cytoskeletal proteins: Most of cytoskeletal proteins were down-regulated in the CNS of paralytic and furious dogs (**Table 1**). The decreased amount of cytoskeletal proteins is likely the result of CNS damage by rabies virus infection. These data were consistent with those reported in our previous studies on magnetic resonance imaging of the brains of furious and paralytic dogs during an early stage, which showed tract integrity and macro-structural damage in brainstem of paralytic rabies and in cerebral cortex of furious rabies.³¹ This process undoubtedly led the animals to further stage with widespread extent of CNS damage, thereby coma and death. In contrast, two forms of glial fibrillary acidic protein (GFAP), tubulin alpha-1 isoform 9, vinculin and xin actin-binding repeat containing 2 isoform 1 were up-regulated. These increases might be due to reorganization of cytoskeletal assembly in the CNS as a part of host response to the CNS infection. However, as there were much fewer up-

regulated proteins, this compensatory mechanism failed to cope with the deterioration of CNS damage by rabies virus.

(iv) Heat shock proteins/chaperones: Heat shock proteins or chaperones play important roles in cellular stress responses, protein folding (to ensure the proper protein conformation), and presentation of antigens for the immune system.^{32,33} In rabies, heat shock proteins, especially heat shock protein 70 kDa (Hsp70), are known as the functional molecules for replication found in Negri body, working in concert with Toll-like receptor 3 (TLR3) and ubiquitylated proteins.³⁴⁻³⁶ Our data showed up-regulation of Hsp70 in spinal cord of paralytic dogs. In addition to Hsp70, there were many heat shock proteins or chaperones that were significantly altered in the CNS tissues of both paralytic and furious dogs. However, their levels were either increased or decreased (**Table 1**). These disparate results might be due to the balance between deteriorated effects of virus infection and their counter-balances as the compensatory mechanisms of host to cope with diseases/disorders.

(v) Immune regulatory proteins: There were concordant changes in immune regulatory proteins in CNS tissues of both paralytic and furious dogs. These included up-regulation of immunoglobulin heavy chain in brainstem of paralytic dogs and up-regulations of interferon alpha-4 and SARM1 protein in hippocampus of furious dogs (**Table 1**). Our data were consistent with the previous findings indicating the involvement of innate immune response in the brain of rabies-infected dogs.⁹

(vi) Neuron-specific proteins: Collapsin response mediator proteins (CRMPs) are members of the family of cytosolic phosphoproteins. They are strongly expressed throughout the developing nervous system.³⁷ CRMP-2 has been shown to bind with tubulin heterodimers and promote microtubule assembly, thereby enhancing axonal growth and branching.³⁸ CRMP2 can induce neuronal differentiation in hippocampal cultures.³⁹ In addition, CRMP-2 is also expressed in immune cells and plays a crucial role in T lymphocyte migration as the

increased expression of CRMP-2 is associated with the increase in migratory rate of peripheral T lymphocytes.⁴⁰ Therefore, CRMP2 expression may serve as an indicator for neuroinflammation.⁴¹ Interestingly, we found that CRMP-2 was down-regulated in spinal cord of both paralytic and furious forms of rabies, but was up-regulated in brainstem of paralytic dogs (**Table 1**). These data might be an evidence of ingress of activated T cells in the brainstem, consistent with our observation that inflammatory T cells could be demonstrated only in the brainstem of paralytic rabies (Shuangshoti et al., unpublished data).

In addition, we also focused our attention to significant differences between the two forms of rabies in individual CNS tissues, as these data may lead to further identification of tissue biomarkers for differentiation of these two distinct clinical entities of rabies and may also facilitate understanding of factors determining clinical manifestations of rabies. All these significant differences are summarized in **Table 2**. A total of 13, 17 and 41 proteins in hippocampus, brainstem and spinal cord, respectively, significantly differed between paralytic and furious forms, and thus may potentially be biomarkers to differentiate these two distinct forms of rabies.

It should be noted that there is a previous proteomics study on CVS rabies virus infection in kidney, not neuronal, cells.²⁸ In this previous study, baby hamster kidney cell line (BHK-21) was infected with CVS rabies virus and alterations in cellular proteome were identified by 2-DE followed by liquid chromatography (LC) coupled to MS/MS. Limited but significant changes were found in expression of viral and host cellular proteins with different functions, including those involved in cytoskeletal assembly, oxidative stress and protein synthesis. Another study was done in rabies-infected mice using 2-DE followed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS.⁴² In the latter study, ICR mice were intracerebrally inoculated with attenuated CVS-B2C or wild-type silver-haired bat rabies virus (SHBRV). Animals were sacrificed when they developed severe

paralysis and the brains were removed. The expression of host brain proteins, particularly those involved in ion homeostasis and docking and fusion of synaptic vesicles to presynaptic membranes in the CNS, were altered in the animals infected with SHBRV. On the other hand, attenuated rabies virus CVS-B2C up-regulated the expression of proteins involved in the induction of apoptosis. Comparing the data reported in these two aforementioned studies to ours, there were not much identical changes observed. This was not surprising as there were many differences in the study design and models of rabies infection, as well as the affected tissues/cells for proteome analysis. Integrative analysis of several models of rabies virus infection at different stages and in different affected organs/tissues or their locales would be very helpful to obtain the larger and clearer picture of pathophysiology or pathogenic mechanisms of rabies in humans.

In summary, we report herein for the first time a large dataset of changes in proteomes of hippocampus, brainstem and spinal cord in dogs naturally infected with rabies. These data will be useful for better understanding of molecular mechanisms of rabies and for differentiation of its paralytic and furious forms.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the technical assistance of Phattara-orn Havanapan and Siriwan Mungdee. This work was supported by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), the National Science and Technology Development Agency (Thailand); The Thailand Research Fund (DBG5180026 & RTA5380005); The National Research University Project of CHE and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (HR1160A); Office of the Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research Universities Initiative. V. Thongboonkerd is also supported by “Chalermphrakiat” Grant, Faculty of Medicine Siriraj Hospital.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Table S1: Summary of differentially expressed proteins in hippocampus identified by Q-TOF MS and/or MS/MS analyses.

Table S2: Summary of differentially expressed proteins in brainstem identified by Q-TOF MS and/or MS/MS analyses.

Table S3: Summary of differentially expressed proteins in spinal cord identified by Q-TOF MS and/or MS/MS analyses.

REFERENCES

1. Hattwick, M. A.; Weis, T. T.; Stechschulte, C. J.; Baer, G. M.; Gregg, M. B. Recovery from rabies. A case report. *Ann. Intern. Med.* **1972**, *76*, 931-942.
2. Willoughby, R. E., Jr.; Tieves, K. S.; Hoffman, G. M.; Ghanayem, N. S.; Amlie-Lefond, C. M.; Schwabe, M. J.; Chusid, M. J.; Rupprecht, C. E. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J Med.* **2005**, *352*, 2508-2514.
3. Presumptive abortive human rabies - Texas, 2009. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2010**, *59*, 185-190.
4. Hemachudha, T.; Laothamatas, J.; Rupprecht, C. E. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Neurol.* **2002**, *1*, 101-109.
5. Hemachudha, T.; Mitrabhakdi, E. Rabies. Davis, L.; Kennedy, P. G. E., Eds.; Oxford: Butterworth-Heinemann, **2000**; pp 401-444.
6. Dacheux, L.; Reynes, J. M.; Buchy, P.; Sivuth, O.; Diop, B. M.; Rousset, D.; Rathat, C.; Jolly, N.; Dufourcq, J. B.; Nareth, C.; Diop, S.; Iehle, C.; Rajerison, R.; Sadorge, C.; Bourhy, H. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *47*, 1410-1417.
7. Hemachudha, T. Human rabies: clinical aspects, pathogenesis, and potential therapy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1994**, *187*, 121-143.
8. Mitrabhakdi, E.; Shuangshoti, S.; Wannakrairot, P.; Lewis, R. A.; Susuki, K.; Laothamatas, J.; Hemachudha, T. Difference in neuropathogenetic mechanisms in human furious and paralytic rabies. *J Neurol. Sci* **2005**, *238*, 3-10.
9. Laothamatas, J.; Wacharapluesadee, S.; Lumlertdacha, B.; Ampawong, S.; Tepsumethanon, V.; Shuangshoti, S.; Phumesin, P.; Asavaphatiboon, S.; Woraprukjaru, L.; Avihingsanon, Y.; Israsena, N.; Lafon, M.; Wilde, H.; Hemachudha, T. Furious and paralytic rabies of canine origin: neuroimaging with virological and cytokine studies. *J Neurovirol.* **2008**, *14*, 119-129.
10. Laothamatas, J.; Hemachudha, T.; Mitrabhakdi, E.; Wannakrairot, P.; Tulayadaechanont, S. MR imaging in human rabies. *AJNR Am. J Neuroradiol.* **2003**, *24*, 1102-1109.
11. Yan, X.; Prosnjak, M.; Curtis, M. T.; Weiss, M. L.; Faber, M.; Dietzschold, B.; Fu, Z. F. Silver-haired bat rabies virus variant does not induce apoptosis in the brain of experimentally infected mice. *J Neurovirol.* **2001**, *7*, 518-527.
12. Sarmiento, L.; Li, X. Q.; Howerth, E.; Jackson, A. C.; Fu, Z. F. Glycoprotein-mediated induction of apoptosis limits the spread of attenuated rabies viruses in the central nervous system of mice. *J Neurovirol.* **2005**, *11*, 571-581.
13. Suja, M. S.; Mahadevan, A.; Madhusudhana, S. N.; Vijayasarathi, S. K.; Shankar, S. K. Neuroanatomical mapping of rabies nucleocapsid viral antigen distribution and

- apoptosis in pathogenesis in street dog rabies--an immunohistochemical study. *Clin. Neuropathol.* **2009**, *28*, 113-124.
14. Jackson, A. C.; Randle, E.; Lawrance, G.; Rossiter, J. P. Neuronal apoptosis does not play an important role in human rabies encephalitis. *J Neurovirol.* **2008**, *14*, 368-375.
 15. Schnell, M. J.; McGettigan, J. P.; Wirblich, C.; Papaneri, A. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 51-61.
 16. Prehaud, C.; Wolff, N.; Terrien, E.; Lafage, M.; Megret, F.; Babault, N.; Cordier, F.; Tan, G. S.; Maitrepierre, E.; Menager, P.; Choppy, D.; Hoos, S.; England, P.; Delepierre, M.; Schnell, M. J.; Buc, H.; Lafon, M. Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. *Sci Signal* **2010**, *3*, ra5.
 17. Jackson, A. C.; Rossiter, J. P. Apoptosis plays an important role in experimental rabies virus infection. *J Virol.* **1997**, *71*, 5603-5607.
 18. Jackson, A. C.; Park, H. Apoptotic cell death in experimental rabies in suckling mice. *Acta Neuropathol.* **1998**, *95*, 159-164.
 19. Morimoto, K.; Hooper, D. C.; Spitsin, S.; Koprowski, H.; Dietzschold, B. Pathogenicity of different rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures. *J Virol.* **1999**, *73*, 510-518.
 20. Weli, S. C.; Scott, C. A.; Ward, C. A.; Jackson, A. C. Rabies virus infection of primary neuronal cultures and adult mice: failure to demonstrate evidence of excitotoxicity. *J Virol.* **2006**, *80*, 10270-10273.
 21. Guigoni, C.; Coulon, P. Rabies virus is not cytolytic for rat spinal motoneurons in vitro. *J Neurovirol.* **2002**, *8*, 306-317.
 22. Tirawatnpong, S.; Hemachudha, T.; Manutsathit, S.; Shuangshoti, S.; Phanthumchinda, K.; Phanuphak, P. Regional distribution of rabies viral antigen in central nervous system of human encephalitic and paralytic rabies. *J Neurol. Sci* **1989**, *92*, 91-99.
 23. Jensen, O. N. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 33-41.
 24. Koprowski, H.; Zheng, Y. M.; Heber-Katz, E.; Fraser, N.; Rorke, L.; Fu, Z. F.; Hanlon, C.; Dietzschold, B. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 3024-3027.
 25. Hooper, D. C.; Ohnishi, S. T.; Kean, R.; Numagami, Y.; Dietzschold, B.; Koprowski, H. Local nitric oxide production in viral and autoimmune diseases of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 5312-5316.
 26. Shin, T.; Weinstock, D.; Castro, M. D.; Hamir, A. N.; Wampler, T.; Walter, M.; Kim, H. Y.; Acland, H. Immunohistochemical localization of endothelial and inducible nitric oxide synthase within neurons of cattle with rabies. *J Vet. Med. Sci* **2004**, *66*, 539-541.

27. Jackson, A. C.; Kammouni, W.; Zhrebetskaya, E.; Fernyhough, P. Role of oxidative stress in rabies virus infection of adult mouse dorsal root ganglion neurons. *J Virol.* **2010**, *84*, 4697-4705.
28. Zandi, F.; Eslami, N.; Soheili, M.; Fayaz, A.; Gholami, A.; Vaziri, B. Proteomics analysis of BHK-21 cells infected with a fixed strain of rabies virus. *Proteomics* **2009**, *9*, 2399-2407.
29. Scott, C. A.; Rossiter, J. P.; Andrew, R. D.; Jackson, A. C. Structural abnormalities in neurons are sufficient to explain the clinical disease and fatal outcome of experimental rabies in yellow fluorescent protein-expressing transgenic mice. *J Virol.* **2008**, *82*, 513-521.
30. Oueslati, A.; Fournier, M.; Lashuel, H. A. Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. *Prog. Brain Res.* **2010**, *183*, 115-145.
31. Laothamatas, J.; Sungkarat, W.; Hemachudha, T. Neuroimaging in human rabies. In: *Advances in virus research*; Jackson, A. C., Ed.; 79; Academic Press/Elsevier: New York, **2011**; pp In Press.
32. Latchman, D. S. Protective effect of heat shock proteins in the nervous system. *Curr. Neurovasc. Res.* **2004**, *1*, 21-27.
33. Pockley, A. G. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* **2003**, *362*, 469-476.
34. Sagara, J.; Kawai, A. Identification of heat shock protein 70 in the rabies virion. *Virology* **1992**, *190*, 845-848.
35. Lahaye, X.; Vidy, A.; Pomier, C.; Obiang, L.; Harper, F.; Gaudin, Y.; Blondel, D. Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J Virol.* **2009**, *83*, 7948-7958.
36. Menager, P.; Roux, P.; Megret, F.; Bourgeois, J. P.; Le Sourd, A. M.; Danckaert, A.; Lafage, M.; Prehaud, C.; Lafon, M. Toll-like receptor 3 (TLR3) plays a major role in the formation of rabies virus Negri Bodies. *PLoS. Pathog.* **2009**, *5*, e1000315.
37. Charrier, E.; Reibel, S.; Rogemond, V.; Aguera, M.; Thomasset, N.; Honnorat, J. Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiol.* **2003**, *28*, 51-64.
38. Fukata, Y.; Itoh, T. J.; Kimura, T.; Menager, C.; Nishimura, T.; Shiromizu, T.; Watanabe, H.; Inagaki, N.; Iwamatsu, A.; Hotani, H.; Kaibuchi, K. CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, 583-591.
39. Inagaki, N.; Chihara, K.; Arimura, N.; Menager, C.; Kawano, Y.; Matsuo, N.; Nishimura, T.; Amano, M.; Kaibuchi, K. CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 781-782.

40. Vincent, P.; Collette, Y.; Marignier, R.; Vauillat, C.; Rogemond, V.; Davoust, N.; Malcus, C.; Cavagna, S.; Gessain, A.; Machuca-Gayet, I.; Belin, M. F.; Quach, T.; Giraudon, P. A role for the neuronal protein collapsin response mediator protein 2 in T lymphocyte polarization and migration. *J Immunol.* **2005**, *175*, 7650-7660.
41. Vauillat, C.; Varrin-Doyer, M.; Bernard, A.; Sagardoy, I.; Cavagna, S.; Chounlamountri, I.; Lafon, M.; Giraudon, P. High CRMP2 expression in peripheral T lymphocytes is associated with recruitment to the brain during virus-induced neuroinflammation. *J Neuroimmunol.* **2008**, *193*, 38-51.
42. Dhingra, V.; Li, X.; Liu, Y.; Fu, Z. F. Proteomic profiling reveals that rabies virus infection results in differential expression of host proteins involved in ion homeostasis and synaptic physiology in the central nervous system. *J Neurovirol.* **2007**, *13*, 107-117.

Table 1: Some interesting changes in furious and paralytic dogs compared to non-infected controls.

Protein name	Spot no.	NCBI ID	Region	Alterations (vs. Control)	
				Paralytic (P)	Furious (F)
Anti-oxidants					
150 kDa oxygen-regulated protein precursor (Orp150) (Hypoxia up-regulated 1)	73	gi 73955046	Spinal cord	↑*	NS
Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTM3-3) (GST class-mu 3) (hGSTM3-3) isoform 1	807	gi 57088159	Brainstem	↑*	NS
Oxygen-regulated protein 1; AltName: Full=Retinitis pigmentosa RP1 protein homolog	157	gi 62900882	Spinal cord	↓*	NS
Peroxiredoxin 1	932	gi 4505591	Spinal cord	↓*	↓*
Apoptosis-related proteins					
Annexin A2	1215	gi 18645167	Spinal cord	NS	↓*
Annexin A2	1408	gi 50950177	Spinal cord	↑*	NS
Annexin A6 (Annexin VI) (Lipocortin VI) (P68) (P70) (Protein III) (Chromobindin 20) (67 kDa calelectrin) (Calphobindin-II) (CPB-II) isoform 2	246	gi 73953627	Brainstem	NS	↓*
Annexin A6 (Annexin VI) (Lipocortin VI) (P68) (P70) (Protein III) (Chromobindin 20) (67 kDa calelectrin) (Calphobindin-II) (CPB-II) isoform 2	258	gi 73953627	Hippocampus	NS	↑*
Cytochrome P450 2B12 (CYP11B12)	192	gi 62639273	Hippocampus	↓*	NS
Cytoskeletal proteins					
Dynamin	164	gi 181849	Hippocampus	↓*	NS
Fascin 1	366	gi 4507115	Brainstem	↓*	NS
Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) isoform 1	459	gi 73965500	Spinal cord	NS	↑*
Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) isoform 1	602	gi 73965500	Spinal cord	NS	↑*
Myosin, heavy chain 2, skeletal muscle, adult	208	gi 115947178	Brainstem	↓*	NS
Nebulin-related anchoring protein isoform 2	132	gi 114632883	Brainstem	↓*	↓*
NEFM protein	1185	gi 148342538	Spinal cord	↓*	↑*
Neurofilament, heavy polypeptide 200kDa	37	gi 50979202	Brainstem	↓*	↓*
Septin-8	460	gi 73971156	Spinal cord	↓*	↓*
TUBB2B protein	1000	gi 133778299	Hippocampus	NS	↓*
Tubulin, alpha-1 isoform 9	579	gi 73996547	Brainstem	↑*	NS
Tubulin, alpha-2 chain (Alpha-tubulin 2) isoform 7	623	gi 73996522	Brainstem	↓*	NS
Vinculin (Metavinculin)	1259	gi 73953587	Spinal cord	↑*	↑*
Xin actin-binding repeat containing 2 isoform 1	1260	gi 66841385	Spinal cord	↑*	NS
Heat shock proteins/chaperones					
Alpha-crystallin B chain (Alpha(B)-crystallin)	960	gi 149716488	Spinal cord	↓*	↑*
Alpha crystallin B chain (Alpha(B)-crystallin) (Rosenthal fiber component) (Heat-shock protein beta-5) (HspB5) isoform 1	895	gi 57085977	Brainstem	NS	↑*
Alpha crystallin B chain (Alpha(B)-crystallin) (Rosenthal fiber component) (Heat-shock protein beta-5) (HspB5) isoform 1	1385	gi 57085977	Spinal cord	↑*	↑*
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15 (predicted), isoform CRA_b	1055	gi 149050007	Spinal cord	↓*	↓*
Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)	327	gi 123647	Spinal cord	↑*	NS
Heat shock protein 90kDa beta, member 1	96	gi 50979166	Brainstem	↑*	NS
Heat shock protein 90kDa beta, member 1	182	gi 50979166	Spinal cord	NS	↓*
Heat shock protein beta-1	874	gi 50979116	Spinal cord	NS	↑*
Heat shock protein beta-1	1512	gi 50979116	Spinal cord	↑*	NS
Immune regulatory proteins					
Immunoglobulin heavy chain variable region	1023	gi 112700066	Brainstem	↑*	NS
Interferon alpha 4	107	gi 18767673	Hippocampus	NS	↑*
SARM1 protein	1359	gi 114325428	Hippocampus	NS	↑*
Neuron-specific proteins					

Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (CRMP-2) isoform 6 (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2)	364	gi 73993705	Spinal cord	NS	↓*
Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMP-2) isoform 6	314	gi 73993705	Brainstem	↑*	NS
Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMP-2) isoform 4	373	gi 73993699	Spinal cord	↓*	↓*
Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMP-2) isoform 6	375	gi 73993705	Spinal cord	↓*	↓*
Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMP-2) isoform 6	382	gi 73993705	Hippocampus	NS	↑*

NCBI = National Center for Biotechnology Information

↑ = Increased levels as compared to the control (non-infected)

↓ = Decreased levels as compared to the control (non-infected)

* p < 0.05 vs. control

Table 2: Summary of significant differences between furious and paralytic rabies.

Protein name	NCBI ID	Spot no.	Intensity (Mean ± SEM)			ANOVA p value	Multiple comparisons		
			Control [C]	Paralytic [P]	Furious [F]		P vs. C	F vs. C	P vs. F
Hippocampus									
Beta globin	gi 57113367	1084	3.2760 ± 0.6120	3.1782 ± 0.2172	5.6296 ± 0.0810	NS	0.0014	0.0010	
Cytochrome P450 2B12 (CYP11B12)	gi 62639273	192	0.1120 ± 0.0081	0.0798 ± 0.0014	0.1251 ± 0.0082	0.0111	NS	0.0007	
Cytokeratin type II	gi 73996498	255	0.0253 ± 0.0055	0.0357 ± 0.0022	0.0173 ± 0.0056	NS	NS	0.0390	
Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMP-2) isoform 3	gi 73993697	371	0.4072 ± 0.1000	0.2610 ± 0.0174	0.5731 ± 0.0446	NS	NS	0.0095	
FBXW10 protein	gi 20306882	736	0.2409 ± 0.0428	0.2500 ± 0.0288	0.1221 ± 0.0148	NS	0.0406	0.0271	
Guanine deaminase	gi 73946803	1267	0.0424 ± 0.0139	0.0456 ± 0.0102	0.1045 ± 0.0042	NS	0.0018	0.0028	
Guanine nucleotide-binding protein G(o), alpha subunit 2 isoform 1	gi 73949832	600	0.1778 ± 0.0254	0.1457 ± 0.0104	0.2802 ± 0.0271	NS	0.0141	0.0019	
Interferon alpha 4	gi 18767673	107	0.1034 ± 0.0076	0.1106 ± 0.0066	0.1439 ± 0.0101	NS	0.0092	0.0313	
Keratin 1	gi 160961491	264	0.0330 ± 0.0027	0.0358 ± 0.0050	0.0625 ± 0.0049	NS	0.0007	0.0016	
Peroxisredoxin 2 (Thioredoxin peroxidase 1) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 1) (Thiol-specific antioxidant protein) (TSA) (PRP) (Natural killer cell enhancing factor B) (NKEF-B) isoform 1	gi 73986497	888	0.2700 ± 0.0363	0.2982 ± 0.0272	0.4202 ± 0.0262	NS	0.0084	0.0311	
Protein C9orf55 isoform 1	gi 73971036	106	0.0696 ± 0.0106	0.0623 ± 0.0055	0.0964 ± 0.0097	NS	NS	0.0410	
Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor (Pyruvic carboxylase) (PCB) isoform 1	gi 73982897	95	0.0881 ± 0.0107	0.0907 ± 0.0041	0.0410 ± 0.0185	NS	0.0456	0.0346	
SARM1 protein	gi 114325428	1359	0.0231 ± 0.0118	0.0180 ± 0.0030	0.0535 ± 0.0116	NS	0.0308	0.0204	
Brainstem									
Actin-related protein 2 isoform 4	gi 73969820	490	0.1348 ± 0.0067	0.1785 ± 0.0249	0.1128 ± 0.0063	NS	NS	0.0216	
Annexin A6 (Annexin VI) (Lipocortin VI) (P68) (P70) (Protein III) (Chromobindin 20) (67 kDa calelectrin) (Calphobindin-II) (CPB-II) isoform 2	gi 73953627	246	0.0739 ± 0.0071	0.0722 ± 0.0074	0.0456 ± 0.0023	NS	0.0127	0.0193	
ATPase, H+ transporting, V1 subunit B, isoform 2 isoform 2	gi 73993820	338	0.3896 ± 0.0345	0.2466 ± 0.0090	0.5235 ± 0.0593	NS	NS	0.0005	
ATPase, H+ transporting, V1 subunit B, isoform 2 isoform 2	gi 73993820	341	0.2130 ± 0.0295	0.0973 ± 0.0214	0.2944 ± 0.0141	0.0066	NS	0.0001	
Centrosomal protein 63kDa isoform 2	gi 194221623	754	0.1721 ± 0.0061	0.3377 ± 0.0335	0.2202 ± 0.0244	0.0007	NS	0.0098	
Chain A, Solution Structure Of The Twelfth Cysteine-Rich Ligand-Binding Repeat In Rat Megalin	gi 159164645	128	0.0365 ± 0.0077	0.0699 ± 0.0118	0.0339 ± 0.0044	0.0160	0.0363	0.0241	
Creatine kinase B-type (Creatine kinase, B chain) (B-CK) isoform 1	gi 73964131	508	0.0802 ± 0.0087	0.1289 ± 0.0137	0.0846 ± 0.0072	0.0076	NS	0.0209	
Cytosolic purine 5-nucleotidase (5-nucleotidase cytosolic II) isoform 8	gi 73998435	993	0.3931 ± 0.0260	0.6284 ± 0.0636	0.4158 ± 0.0390	0.0041	0.0063	0.0128	
GDP dissociation inhibitor 2	gi 50978926	429	0.1042 ± 0.0063	0.0839 ± 0.0096	0.0335 ± 0.0150	NS	0.0010	0.0135	
Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTM3-3) (GST class-mu 3) (hGSTM3-3) isoform 1	gi 57088159	807	0.1705 ± 0.0128	0.2736 ± 0.0398	0.1591 ± 0.0229	0.0186	NS	0.0257	
GTP-binding protein alpha o	gi 8394152	550	0.1927 ± 0.0220	0.3018 ± 0.0375	0.1850 ± 0.0118	0.0104	0.0164	0.0248	

Immunoglobulin heavy chain variable region	gi112700066	1023	0.2323 ± 0.0192	0.4159 ± 0.0349	0.2525 ± 0.0302	0.0007	0.0012	NS	0.0031
Silent information regulator 2	gi73697550	566	0.1672 ± 0.0204	0.1711 ± 0.0177	0.0590 ± 0.0072	0.0002	NS	0.0007	0.0005
Tubulin, alpha 1 isoform 9	gi73996547	579	0.2392 ± 0.0452	0.5260 ± 0.0861	0.2565 ± 0.0414	0.0074	0.0122	NS	0.0018
Unidentified	NA	275	0.0747 ± 0.0070	0.0338 ± 0.0020	0.0627 ± 0.0023	0.0000	0.0000	NS	0.0009
Unidentified	NA	813	0.4906 ± 0.0173	0.3973 ± 0.0308	0.5654 ± 0.0213	0.0006	0.0360	NS	0.0004
Unidentified	NA	1000	0.0931 ± 0.0101	0.1017 ± 0.0117	0.2252 ± 0.0550	0.0216	NS	0.0321	0.0457
Spinal cord									
40S ribosomal protein S3a (V-fos transformation effector protein) isoform 11	gi73977917	1394	0.1508 ± 0.0410	0.0887 ± 0.0187	0.2208 ± 0.0126	0.0152	NS	NS	0.0116
Alpha-crystallin B chain (Alpha(B)-crystallin)	gi1149716488	960	0.5524 ± 0.0525	0.2190 ± 0.0289	0.7896 ± 0.0898	0.0001	0.0054	0.0452	0.0000
Alpha crystallin B chain (Alpha(B)-crystallin) (Rosenthal fiber component) (Heat-shock protein beta-5) (HspB5) isoform 1	gi57085977	1385	0.0076 ± 0.0076	0.4507 ± 0.0203	0.1978 ± 0.0448	0.0000	0.0000	0.0011	0.0001
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d isoform a	gi57108097	913	0.3123 ± 0.0156	0.2056 ± 0.0114	0.2918 ± 0.0095	0.0001	0.0001	NS	0.0009
Carbonic anhydrase I (Carbonate dehydratase I) (CA-I) (Carbonic anhydrase B)	gi57108007	1395	0.1720 ± 0.0571	0.1475 ± 0.0069	0.0000 ± 0.0000	0.0048	NS	0.0063	0.0178
Chaperonin containing TCP1, subunit 2 isoform 1	gi73968673	469	0.1049 ± 0.0087	0.0837 ± 0.0081	0.1453 ± 0.0194	0.0173	NS	NS	0.0146
Chromosome 1 open reading frame 27	gi1126306536	711	0.1848 ± 0.0194	0.2134 ± 0.0278	0.3747 ± 0.0224	0.0002	NS	0.0003	0.0013
Collagen, type VI, alpha 1 isoform 1	gi1119887130	1251	0.0041 ± 0.0041	0.0881 ± 0.0190	0.0050 ± 0.0050	0.0006	0.0014	NS	0.0016
Complement component 1, q subcomponent binding protein precursor	gi73955331	821	0.3736 ± 0.0209	0.2669 ± 0.0160	0.4236 ± 0.0577	0.0270	NS	NS	0.0238
Creatine kinase B-type (Creatine kinase, B chain) (B-CK) isoform 1	gi73964131	553	0.6536 ± 0.0330	0.6194 ± 0.0661	0.8821 ± 0.0517	0.0110	NS	0.0330	0.0144
Creatine kinase B-type (Creatine kinase, B chain) (B-CK) isoform 1	gi73964131	579	0.4507 ± 0.0290	0.4179 ± 0.0323	0.6666 ± 0.0596	0.0023	NS	0.0093	0.0033
Cytoplasmic beta-actin isoform 2	gi73958067	814	0.0935 ± 0.0197	0.1495 ± 0.0279	0.0139 ± 0.0139	0.0037	NS	NS	0.0028
Dihydropyrimidinase-like 2	gi40254595	408	0.2805 ± 0.0384	0.1761 ± 0.0329	0.3310 ± 0.0298	0.0244	NS	NS	0.0212
Dihydrouridine synthase 1-like (S. cerevisiae)	gi123288584	1065	0.1881 ± 0.0199	0.1801 ± 0.0299	0.2720 ± 0.012	0.0329	NS	NS	0.0449
Fructose-bisphosphate aldolase C (Brain-type aldolase) isoform 1	gi57091277	629	0.4337 ± 0.0392	0.2344 ± 0.0208	0.3765 ± 0.0454	0.0055	0.0050	NS	0.0425
Fructose-bisphosphate aldolase C (Brain-type aldolase) isoform 2	gi73966974	634	0.0640 ± 0.0110	0.0090 ± 0.0076	0.0703 ± 0.0200	0.0149	0.0381	NS	0.0207
Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) isoform 1	gi73965500	459	0.0620 ± 0.0050	0.0517 ± 0.0032	0.1421 ± 0.0210	0.0003	NS	0.0013	0.0004
Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) isoform 1	gi73965500	602	0.0585 ± 0.0379	0.1897 ± 0.1438	4.3635 ± 0.4024	0.0000	NS	0.0000	0.0000
Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) isoform 2	gi73965502	445	0.0174 ± 0.0059	0.0371 ± 0.0069	0.0000 ± 0.0000	0.0017	NS	NS	0.0012
Glycogen phosphorylase, muscle form (Myophosphorylase)	gi17305556	1514	0.0906 ± 0.0323	0.0644 ± 0.0049	0.1619 ± 0.0258	0.0319	NS	NS	0.0304
Heat shock protein 90kDa beta, member 1	gi50979166	182	0.3857 ± 0.0451	0.3422 ± 0.0475	0.1595 ± 0.0373	0.0090	NS	0.0101	0.0370
Heat shock protein beta-1	gi50979116	1512	0.0000 ± 0.0000	0.1178 ± 0.0105	0.0191 ± 0.0191	0.0000	0.0000	NS	0.0003
Hypothetical rhabdomyosarcoma antigen Mu-RMS-40.6c	gi48476968	159	0.0630 ± 0.0070	0.0087 ± 0.0048	0.0411 ± 0.0100	0.0007	0.0005	NS	0.02

Oxygen-regulated protein 1; AltName: Full=Retinitis pigmentosa RP1 protein homolog	gi 62900882	157	0.0231 ± 0.0035	0.0000 ± 0.0000	0.0214 ± 0.0071	0.0047	0.0076	NS	0.0130
Peroxisome oxidase 2 (Thioredoxin peroxidase 1) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 1) (Thiol-specific antioxidant protein) (TSA) (PRP) (Natural killer cell enhancing factor B) (NKEF-B) isoform 1 rCG47063	gi 73986497	918	0.3579 ± 0.0243	0.2140 ± 0.0242	0.4055 ± 0.046	0.0035	0.0247	NS	0.0035
Septin-8	gi 149028757	158	0.0375 ± 0.0045	0.0000 ± 0.0000	0.0332 ± 0.0095	0.0010	0.0015	NS	0.0042
Seroferritin precursor (Transferrin) (Siderophilin) (Beta-1-metal binding globulin) isoform 1	gi 73971156	460	0.0907 ± 0.0047	0.0126 ± 0.0106	0.0516 ± 0.0047	0.0000	0.0000	0.0118	0.0118
Silent information regulator 2	gi 73990142	1220	0.0647 ± 0.0102	0.1730 ± 0.0231	0.0849 ± 0.0173	0.0033	0.0039	NS	0.0166
Thymopoietin II	gi 73697550	661	0.1419 ± 0.0139	0.1653 ± 0.0132	0.0792 ± 0.0254	0.0167	NS	NS	0.0158
Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	gi 229542	1283	0.0000 ± 0.0000	0.1248 ± 0.0057	0.1722 ± 0.0153	0.0000	0.0000	0.0000	0.0091
Unidentified	gi 73951868	872	0.5050 ± 0.0347	0.3185 ± 0.0398	0.5122 ± 0.0482	0.0105	0.0226	NS	0.0180
Werner helicase interacting protein 1, isoform CRA_b	NA	436	0.0494 ± 0.0051	0.0468 ± 0.0050	0.0092 ± 0.0060	0.0002	NS	0.0005	0.0009
Zinc finger protein 615	gi 148700412	304	0.0527 ± 0.0031	0.0363 ± 0.0072	0.1077 ± 0.0110	0.0001	NS	0.0008	0.0001
	gi 197102729	693	0.1327 ± 0.0094	0.1273 ± 0.0073	0.1698 ± 0.0141	0.0316	NS	NS	0.0394

NCBI = National Center for Biotechnology Information

NA = Not applicable

NS = Not statistically significant

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Immunoperoxidase staining of rabies antigen. Hippocampus, brainstem and spinal cord from non-infected dogs and those naturally infected with rabies (both paralytic and furious forms) were subjected to immunohistochemical study for rabies antigen using polyclonal antibody against rabies nucleocapsid as the primary antibody and hematoxylin as the counterstain. Immunoreactive locales of rabies nucleocapsid are shown in brown, whereas nuclei are illustrated in blue.

Figure 2: 2-D Proteome maps of differentially expressed proteins in hippocampus of dogs naturally infected with rabies. Proteins that significantly differed among groups, including non-infected control, paralytic form of rabies and furious form of rabies, are labeled with numbers that correspond to those reported in **Tables 1 and 2**, and **Supplementary Table S1**.

Figure 3: 2-D Proteome maps of differentially expressed proteins in brainstem of dogs naturally infected with rabies. Proteins that significantly differed among groups, including non-infected control, paralytic form of rabies and furious form of rabies, are labeled with numbers that correspond to those reported in **Tables 1 and 2**, and **Supplementary Table S2**.

Figure 4: 2-D Proteome maps of differentially expressed proteins in spinal cord of dogs naturally infected with rabies. Proteins that significantly differed among groups, including non-infected control, paralytic form of rabies and furious form of rabies, are labeled with numbers that correspond to those reported in **Tables 1 and 2**, and **Supplementary Table S3**.

Figure 5: Summary of all differentially expressed proteins in hippocampus, brainstem and spinal cord of dogs naturally infected with rabies. These significantly differed proteins were

classified based on their molecular functions. More details of individual proteins, including mass spectrometric data (identities, identification scores, sequence coverage, number of matched peptides, isoelectric point or pI, molecular weight or MW, etc.), quantitative intensity data, and p values obtained from ANOVA as well as Tukey's post-hoc multiple comparisons are summarized in **Supplementary Tables S1-S3**.

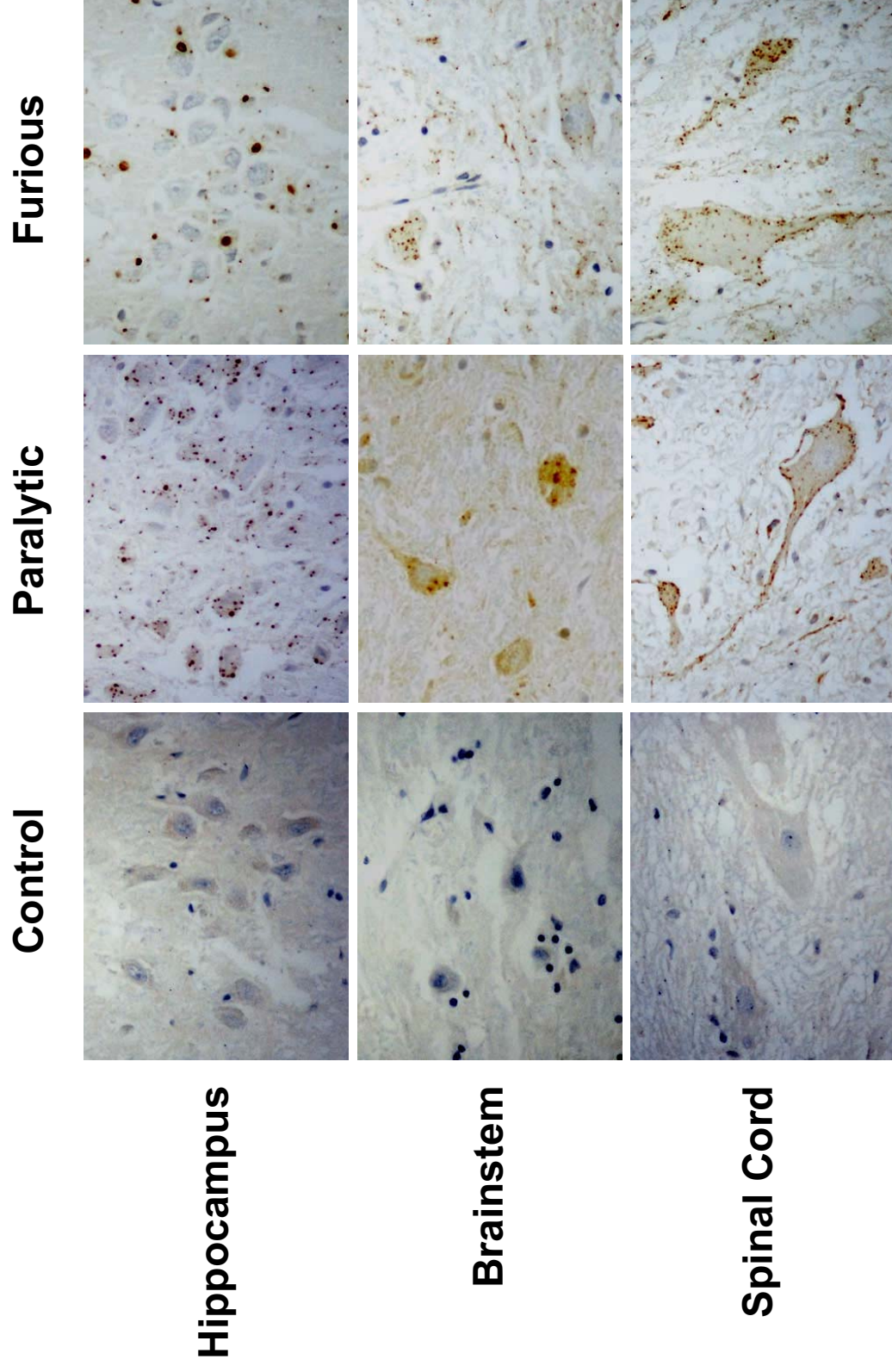


Figure 1

Hippocampus

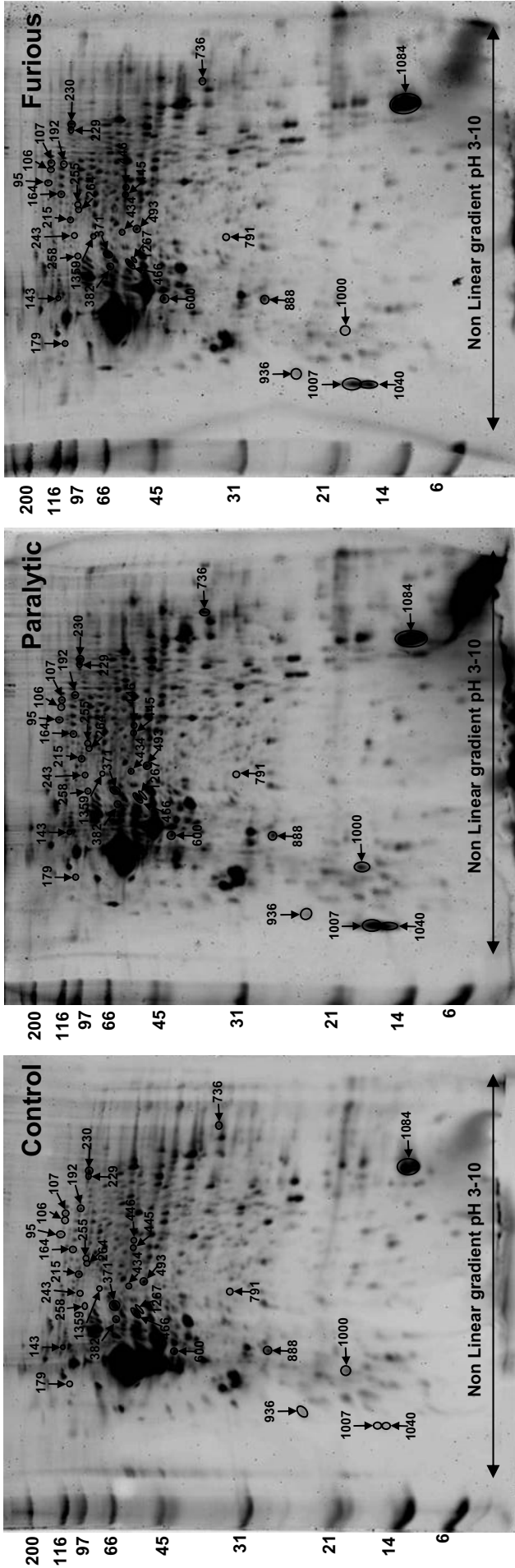


Figure 2

Brainstem

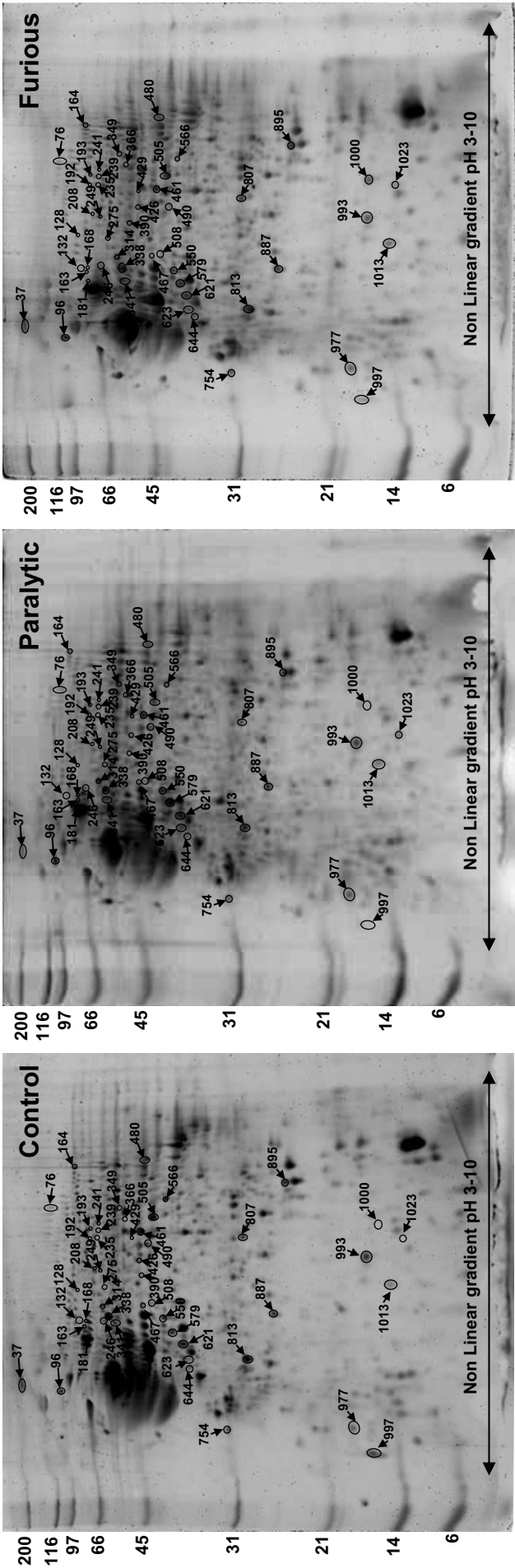


Figure 3

Spinal Cord

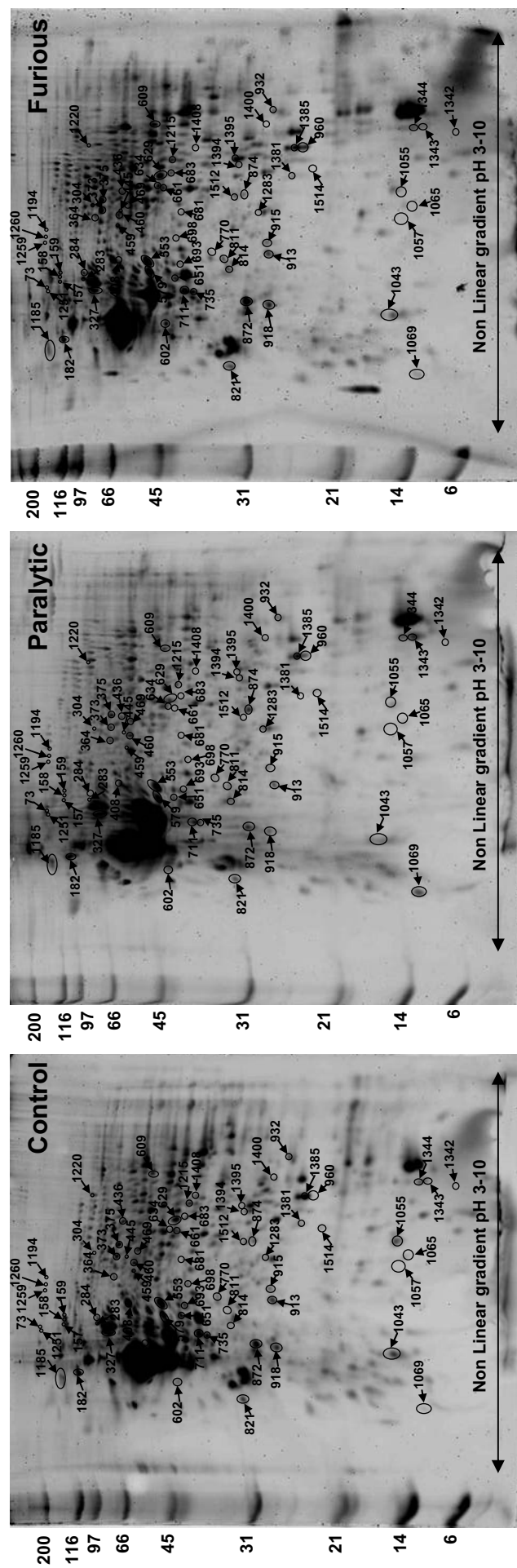


Figure 4

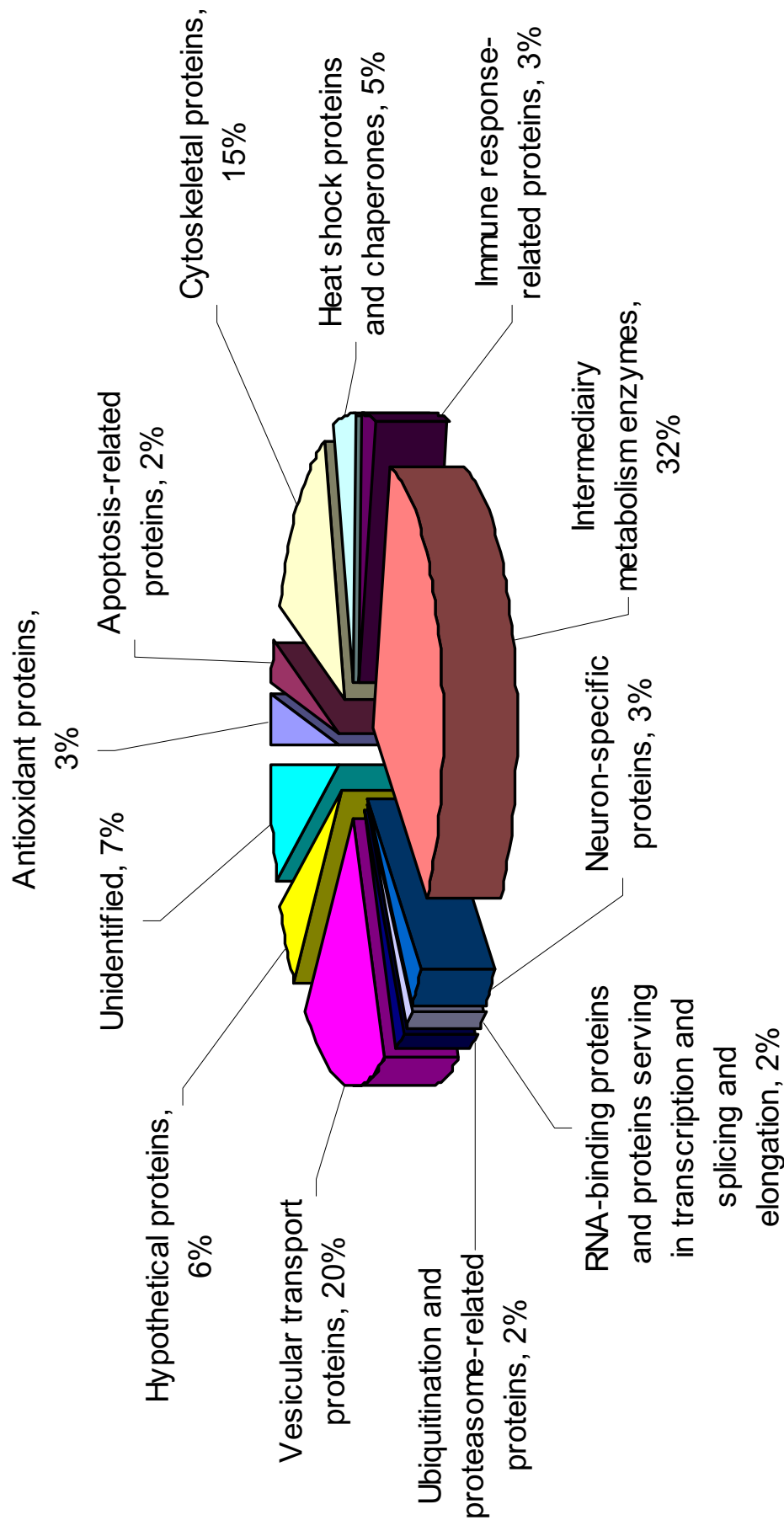


Figure 5

Table S1: Summary of differentially expressed proteins in hippocampus identified by Q-TOF MS and/or MS/MS analyses.

Spot no.	Protein name	NCBI ID	Identified by	Identification scores (MS, MS/MS)	%Cov (MS, MS/MS)	No. of matched peptides (MS, MS/MS)	pI	MW (kDa)	Intensity (Mean ± SEM)			ANOVA p values	Tukey's post-hoc multiple comparisons		
									Control	Paralytic	Furious		Paralytic vs Control	Furious vs Control	Paralytic vs Furious
95	Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor (Pyruvate carboxylase) (PCB) isoform 1	gi 73982897	MS	140, NA	21, NA	23, NA	6.32	130.25	0.0881 ± 0.0107	0.0907 ± 0.0041	0.0410 ± 0.0185	0.0225	NS	0.0456	0.0346
106	Protein Cborf5 isoform 1	gi 73971036	MS	69, NA	11, NA	18, NA	6.11	212.96	0.0696 ± 0.0106	0.0623 ± 0.0055	0.0864 ± 0.0097	0.0395	NS	NS	0.0410
107	Interferon alpha 4	gi 18767673	MS	77, NA	29, NA	6, NA	6.95	23.32	0.1034 ± 0.0076	0.1106 ± 0.0066	0.1439 ± 0.0101	0.0078	NS	0.0092	0.0313
143	Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase) (15S Mg(2+)-ATPase p97 subunit) (Valosin-containing protein) (VCP) isoform 13	gi 73971232	MS	79, NA	25, NA	13, NA	5.11	90.35	0.0229 ± 0.0078	0.0332 ± 0.0041	0.0521 ± 0.0059	0.0140	NS	0.0117	NS
164	Dynamin	gi 181849	MS/MS	NA, 30	1, NA	1, NA	6.93	97.75	0.1218 ± 0.0144	0.0803 ± 0.0032	0.0949 ± 0.0084	0.0288	0.0244	NS	NS
179	Propionyl-Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide isoform 4	gi 114630510	MS	84, NA	24, NA	14, NA	6.98	82.64	0.0376 ± 0.0120	0.0594 ± 0.0047	0.0795 ± 0.0040	0.0064	NS	0.0047	NS
182	Cytochrome P450 2B12 (CYP1B12)	gi 62639273	MS, MS/MS	81, 27	25, 1	9, 1	8.43	56.64	0.1120 ± 0.0081	0.0798 ± 0.0014	0.1251 ± 0.0082	0.0008	0.0111	NS	0.0007
215	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin) (p87/89) (Proliferation-inducing gene 4 protein) isoform 1	gi 73980353	MS	112, NA	28, NA	15, NA	6.21	83.68	0.1290 ± 0.0070	0.0825 ± 0.0033	0.0972 ± 0.0061	0.0001	0.0001	0.0036	NS
229	Aconitase 2, mitochondrial isoform 7	gi 73968976	MS	72, NA	20, NA	11, NA	8.61	85.64	0.1797 ± 0.0160	0.1279 ± 0.0054	0.1496 ± 0.0119	0.0309	0.0252	NS	NS
230	Aconitase 2, mitochondrial isoform 8	gi 73968978	MS	170, NA	32, NA	20, NA	8.07	89.05	0.3063 ± 0.0270	0.2573 ± 0.0111	0.2573 ± 0.0093	0.0179	0.0179	NS	NS
243	Unidentified								0.0189 ± 0.0084	0.0630 ± 0.0148	0.0532 ± 0.0100	0.0387	0.0398	NS	NS
255	Cytokeratin type II	gi 73996488	MS/MS	NA, 33	NA, 1	NA, 1	6.33	107.86	0.0253 ± 0.0055	0.0357 ± 0.0022	0.0773 ± 0.0056	0.0480	NS	NS	0.0390
258	Annexin A6 (Annexin VI) (Lipocortin VI) (P68) (P70) (Protein III) (Chromobindin 20) (67 kDa calelectin) (Calphodindin-II) (CPB-II) isoform 2	gi 73953627	MS, MS/MS	109, 148	30, 8	16, 4	5.47	76.24	0.0421 ± 0.0058	0.0522 ± 0.0014	0.0578 ± 0.0031	0.0369	NS	0.0314	NS
264	Keratin 1	gi 160961491	MS, MS/MS	80, 27	25, 1	12, 1	7.82	65.62	0.0330 ± 0.0027	0.0358 ± 0.0050	0.0625 ± 0.0049	0.0004	NS	0.0007	0.0016
371	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMP-2) isoform 3	gi 73993697	MS/MS	NA, 89	NA, 4	NA, 2	5.98	74.06	0.4072 ± 0.1000	0.2610 ± 0.0174	0.5731 ± 0.0446	0.0126	NS	NS	0.0095
382	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMP-2) isoform 6	gi 73993705	MS	78, NA	32, NA	12, NA	5.95	62.62	0.0834 ± 0.0375	0.1060 ± 0.0165	0.1926 ± 0.0215	0.0272	NS	0.0289	NS
434	MCG10327	gi 148690968	MS	64, NA	24, NA	8, NA	6.13	47.43	0.0545 ± 0.0121	0.0807 ± 0.0031	0.0859 ± 0.0055	0.0288	NS	0.0346	NS
445	Hypothetical protein	gi 59006605	MS	71, NA	12, NA	13, NA	8.45	149.79	0.0656 ± 0.0233	0.1267 ± 0.0092	0.1354 ± 0.0108	0.0135	0.0383	0.0178	NS
446	G patch domain containing protein 2	gi 4006169	MS	68, NA	22, NA	9, NA	9.31	59.25	0.0762 ± 0.0177	0.1243 ± 0.0072	0.1195 ± 0.0119	0.0368	0.0486	NS	NS
466	G patch domain containing protein 2	gi 4006169	MS	68, NA	22, NA	9, NA	9.31	59.25	0.4195 ± 0.0441	0.3009 ± 0.0223	0.3723 ± 0.0145	0.0402	0.0331	NS	NS
493	NAOH-ubiquitome oxidoreductase 49 kDa subunit, mitochondrial precursor (Complex I-49kD) (CI-49kD) isoform 4	gi 74006142	MS	82, NA	33, NA	12, NA	7.21	51.78	0.2624 ± 0.0234	0.1804 ± 0.0169	0.1946 ± 0.0155	0.0179	0.0207	NS	NS
600	Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha subunit 2 isoform 1	gi 73949832	MS	71, NA	29, NA	9, NA	5.62	40.56	0.1778 ± 0.0254	0.1457 ± 0.0104	0.2802 ± 0.0271	0.0018	NS	0.0141	0.0019
736	FBXW10 protein	gi 20306882	MS	70, NA	15, NA	14, NA	9.45	122.08	0.2409 ± 0.0428	0.2500 ± 0.0288	0.1221 ± 0.0148	0.0182	NS	0.0406	0.0271
791	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	gi 60979220	MS, MS/MS	73, 30	37, 5	8, 1	5.97	24.65	0.1282 ± 0.0099	0.0947 ± 0.0126	0.0723 ± 0.0054	0.0034	NS	0.0026	NS
888	Peroxiorexin 2 (Thioredoxin peroxidase 1) (Thioredoxin-dependent peroxidoreductase 1) (Thiol-specific antioxidant protein) (TSA) (PRP) (Natural killer cell enhancing factor B) (NKEF-B) isoform 1	gi 73986497	MS	80, NA	46, NA	6, NA	5.23	22.11	0.2700 ± 0.0363	0.2982 ± 0.0272	0.4202 ± 0.0262	0.0073	NS	0.0084	0.0311
936	Ryanodine receptor 2	gi 73952508	MS	78, NA	7, NA	30, NA	5.75	569.86	0.3831 ± 0.0367	0.2834 ± 0.0305	0.1647 ± 0.0443	0.0035	NS	0.0025	NS
1000	TUBB2B protein	gi 133778299	MS/MS	NA, 72	NA, 9	NA, 1	4.88	20.87	0.5454 ± 0.1100	0.4849 ± 0.0357	0.2196 ± 0.0590	0.0177	NS	0.0199	NS
1007	Keratin 1	gi 160961491	MS	81, NA	23, NA	12, NA	7.62	65.62	0.3612 ± 0.2170	1.5856 ± 0.2501	1.0769 ± 0.1782	0.0044	0.0032	NS	NS
1040	Keratin 1	gi 160961491	MS	92, NA	27, NA	13, NA	7.62	65.62	0.1234 ± 0.0391	0.5663 ± 0.1111	0.7768 ± 0.1543	0.0063	NS	0.0054	NS
1084	Beta globin	gi 57113367	MS, MS/MS	184, 140	87, 32	11, 3	7.83	16.23	3.2760 ± 0.0120	3.1782 ± 0.2172	5.6296 ± 0.0810	0.0004	NS	0.0014	0.0010
1267	Guanine deaminase	gi 73946803	MS/MS	NA, 57	NA, 2	NA, 1	6.53	63.27	0.0424 ± 0.0139	0.0456 ± 0.0102	0.1045 ± 0.0042	0.0009	NS	0.0018	0.0028
1359	SARM1 protein	gi 14325428	MS	81, NA	21, NA	12, NA	5.98	78.70	0.0231 ± 0.0118	0.0180 ± 0.0030	0.0535 ± 0.0116	0.0440	NS	0.0308	0.0204

NCBI = National Center for Biotechnology Information
%Cov = %Sequence coverage [(number of the matched residues/total number of residues in the entire sequence) x 100%]
NA = Not applicable
NS = Not significance

Table S2: Summary of differentially expressed proteins in brainstem identified by Q-TOF MS and/or MS/MS analyses.

Spot no.	Protein name	NCBI ID	Identified by	Identification scores (MS, MS/MS)	%Cov (MS, MS/MS)	No. of matched peptides (MS, MS/MS)	pI	MW (kDa)	Intensity (Mean $\pm$ SEM)			ANOVA p values	Tukey's post-hoc multiple comparisons		
									Control	Paralytic	Furious		Paralytic vs Control	Furious vs Control	Paralytic vs Furious
37	Neurilament, heavy polypeptide 20kDa	gi 50979202	MS, MS/MS	89, 57	16, 2	16, 2	8.10	124.69	0.4792 $\pm$ 0.0901	0.0644 $\pm$ 0.0437	0.2507 $\pm$ 0.0223	0.0010	0.0048	0.0300	NS
76	Phosphatase, orphan 1 isoform 1	gi 109114246	MS	73, NA	35, NA	8, NA	7.64	30.10	0.0679 $\pm$ 0.0057	0.0253 $\pm$ 0.0093	0.0304 $\pm$ 0.0056	0.0010	0.0020	0.0055	NS
96	Heat shock protein 90kDa beta, member 1	gi 50979166	MS	72, NA	20, NA	16, NA	4.78	92.74	0.2270 $\pm$ 0.0193	0.3507 $\pm$ 0.0226	0.3002 $\pm$ 0.0205	0.0030	0.0022	NS	NS
128	Chain A, Solution Structure Of The Twelfth Cysteine-Rich Ligand-Binding Repeat In Rat Megalin	gi 159164645	MS	63, NA	100, NA	5, NA	4.85	5.44	0.0365 $\pm$ 0.0077	0.0699 $\pm$ 0.0118	0.0339 $\pm$ 0.0044	0.0160	0.0363	NS	0.0241
132	Nebulin-related anchoring protein isoform 2	gi 114632883	MS	70, NA	14, NA	19, NA	9.29	198.17	0.0383 $\pm$ 0.0069	0.0343 $\pm$ 0.0061	0.0360 $\pm$ 0.0062	0.0110	0.0174	0.0250	NS
163	Hypothetical protein LOC84070	gi 14149789	MS	74, NA	21, NA	16, NA	9.08	104.06	0.0369 $\pm$ 0.0047	0.0256 $\pm$ 0.0057	0.0169 $\pm$ 0.0038	0.0200	NS	0.0159	NS
164	Aconitase 2, mitochondrial isoform 9	gi 73989890	MS, MS/MS	211, 180	37, 9	26, 5	7.89	85.87	0.1753 $\pm$ 0.0188	0.0503 $\pm$ 0.0242	0.0149 $\pm$ 0.0356	0.0130	0.0142	NS	NS
168	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin) (p87/89) (Proliferation-inducing gene 4 protein) isoform 1	gi 739890353	MS, MS/MS	210, 81	40, 2	22, 2	6.21	53.58	0.0515 $\pm$ 0.0082	0.0476 $\pm$ 0.0113	0.0178 $\pm$ 0.0039	0.0240	NS	0.0317	NS
181	Unidentified								0.0764 $\pm$ 0.0085	0.0087 $\pm$ 0.0097	0.0085 $\pm$ 0.0085	0.0000	0.0003	0.0002	NS
192	Protein kinase C, gamma	gi 133941594	MS	69, NA	18, NA	12, NA	7.27	79.65	0.0424 $\pm$ 0.0031	0.0260 $\pm$ 0.0008	0.0303 $\pm$ 0.0022	0.0003	0.0003	0.0050	NS
193	Phosphofructokinase, platelet	gi 73949194	MS	112, NA	21, NA	15, NA	6.60	99.37	0.0794 $\pm$ 0.0107	0.0572 $\pm$ 0.0039	0.0512 $\pm$ 0.0042	0.0296	NS	0.0312	NS
208	Myosin, heavy chain 2, skeletal muscle, adult	gi 115947178	MS	72, NA	13, NA	20, NA	5.64	223.98	0.0401 $\pm$ 0.0033	0.0199 $\pm$ 0.0066	0.0313 $\pm$ 0.0034	0.0269	0.0213	NS	NS
235	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein isoform 5	gi 173965161	MS, MS/MS	159, 88	34, 4	21, 3	6.55	83.77	0.1353 $\pm$ 0.0063	0.0949 $\pm$ 0.0032	0.1104 $\pm$ 0.0056	0.0002	0.0002	0.0108	NS
239	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein isoform 1	gi 73965153	MS, MS/MS	204, 62	40, 2	26, 2	6.55	84.02	0.0830 $\pm$ 0.0064	0.0567 $\pm$ 0.0046	0.0814 $\pm$ 0.0045	0.0069	0.0081	0.0285	NS
241	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein isoform 4	gi 73965159	MS, MS/MS	172, 130	32, 5	21, 4	6.55	84.98	0.0561 $\pm$ 0.0086	0.0465 $\pm$ 0.0042	0.0282 $\pm$ 0.0069	0.0345	NS	0.0297	NS
246	Annexin A6 (Annexin VI) (Lipocortin VI) (P68) (P70) (Protein III) (Chromobindin 20) (67 kDa calelectrin) (Calphobindin-II) (CPB-II) isoform 2	gi 739536827	MS, MS/MS	223, 41	39, 2	25, 1	5.47	76.24	0.0739 $\pm$ 0.0071	0.0722 $\pm$ 0.0074	0.0456 $\pm$ 0.0023	0.0078	NS	0.0127	0.0193
249	Guaminase, isoform CRA_a	gi 149046200	MS, MS/MS	89, 43	28, 2	12, 1	6.63	68.06	0.0481 $\pm$ 0.0023	0.0314 $\pm$ 0.0054	0.0276 $\pm$ 0.0022	0.0029	0.0150	0.0035	NS
275	Unidentified								0.0747 $\pm$ 0.0070	0.0338 $\pm$ 0.0020	0.0637 $\pm$ 0.0023	0.0000	0.0000	NS	0.0009
314	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMFP-2) isoform 6	gi 73993705	MS, MS/MS	221, 324	51, 13	23, 5	5.95	62.62	0.1336 $\pm$ 0.0150	0.1953 $\pm$ 0.0134	0.1537 $\pm$ 0.0067	0.0087	0.0074	NS	NS
338	ATPase, H+ transporting, V1 subunit B, isoform 2 isoform 2	gi 73993820	MS, MS/MS	172, 262	50, 11	22, 4	5.65	56.14	0.3896 $\pm$ 0.0345	0.2466 $\pm$ 0.0090	0.5235 $\pm$ 0.0593	0.0008	NS	NS	0.0005
341	ATPase, H+ transporting, V1 subunit B, isoform 2 isoform 2	gi 73993820	MS, MS/MS	157, 208	48, 11	20, 4	5.65	56.14	0.2130 $\pm$ 0.0295	0.0973 $\pm$ 0.0214	0.2944 $\pm$ 0.0141	0.0001	0.0066	NS	0.0001
349	Chain A, The Crystal Structure Of Dihydropyrimidine Dehydrogenase And Dihydropyrimidine Dehydrogenase-Binding Protein (Didomain) Subcomplex Of Human Pyruvate Dehydrogenase Complex.	gi 83753870	MS, MS/MS	91, 144	38, 12	12, 4	6.50	50.66	0.1392 $\pm$ 0.0193	0.1001 $\pm$ 0.0102	0.0864 $\pm$ 0.0038	0.0279	NS	0.0270	NS
366	Fascin 1	gi 45071115	MS, MS/MS	82, 118	47, 9	17, 4	6.84	55.12	0.2224 $\pm$ 0.0232	0.1498 $\pm$ 0.0126	0.1720 $\pm$ 0.0114	0.0214	0.0191	NS	NS
390	Calicum/calmodulin-dependent protein kinase IIA isoform 1 isoform 2	gi 739933675	MS/MS	NA, 79	NA, 6	NA, 2	7.05	55.87	0.0423 $\pm$ 0.0028	0.0158 $\pm$ 0.0080	0.0276 $\pm$ 0.0114	0.0164	0.0126	NS	NS
426	Vesicle amine transport protein 1	gi 570391463	MS/MS	NA, 21	NA, 4	NA, 1	6.02	42.74	0.0993 $\pm$ 0.0047	0.0740 $\pm$ 0.0146	0.0635 $\pm$ 0.0055	0.0460	0.0425	NS	NS
429	GDP dissociation inhibitor 2	gi 50978928	MS	78, NA	31, NA	11, NA	6.11	50.80	0.1042 $\pm$ 0.0063	0.0839 $\pm$ 0.0096	0.0335 $\pm$ 0.015	0.0011	NS	0.0010	0.0135
461	Glutamine synthetase	gi 50950189	MS/MS	NA, 143	NA, 12	NA, 3	6.28	42.57	0.3039 $\pm$ 0.0181	0.2079 $\pm$ 0.0142	0.2218 $\pm$ 0.0214	0.0040	0.0053	0.0158	NS
467	Creatine kinase B-type (Creatine kinase, B chain) (B-CK) isoform 1	gi 73964131	MS	87, NA	29, NA	7, NA	5.55	44.31	0.0926 $\pm$ 0.0063	0.0419 $\pm$ 0.0089	0.0218 $\pm$ 0.0099	0.0001	0.0021	0.0001	NS
480	Phosphoglycerate kinase 1 isoform 2	gi 74007807	MS/MS	NA, 101	NA, 11	NA, 3	7.99	44.89	0.2632 $\pm$ 0.0228	0.1241 $\pm$ 0.0250	0.1518 $\pm$ 0.0159	0.0009	0.0010	0.0064	NS
490	Actin-related protein 2 isoform 4	gi 73969820	MS/MS	NA, 53	NA, 3	NA, 1	6.06	46.03	0.1348 $\pm$ 0.0067	0.1785 $\pm$ 0.0249	0.1128 $\pm$ 0.0063	0.0250	NS	NS	0.0216
505	Silent information regulator 2	gi 73697550	MS	93, NA	37, NA	10, NA	7.67	32.01	0.4111 $\pm$ 0.0274	0.2530 $\pm$ 0.0556	0.3516 $\pm$ 0.0160	0.0265	0.0219	NS	NS
508	Creatine kinase B-type (Creatine kinase, B chain) (B-CK) isoform 1	gi 73964131	MS, MS/MS	92, 39	45, 5	12, 2	5.55	44.31	0.0802 $\pm$ 0.0087	0.1289 $\pm$ 0.0137	0.0846 $\pm$ 0.0072	0.0076	0.0115	NS	0.0209
550	GTP-binding protein alpha o	gi 8394152	MS/MS	NA, 104	NA, 9	NA, 3	5.34	40.61	0.1927 $\pm$ 0.0220	0.3018 $\pm$ 0.0375	0.1950 $\pm$ 0.0118	0.0104	0.0164	NS	0.0248
566	Silent information regulator 2	gi 73697550	MS, MS/MS	88, 22	42, 10	9, 2	7.67	32.01	0.1672 $\pm$ 0.0204	0.1711 $\pm$ 0.0177	0.0590 $\pm$ 0.0072	0.0002	NS	0.0007	0.0005
579	Tubulin, alpha 1 isoform 9	gi 73996547	MS, MS/MS	64, 126	32, 15	8, 4	4.96	46.78	0.2392 $\pm$ 0.0452	0.5260 $\pm$ 0.0861	0.2565 $\pm$ 0.0414	0.0074	0.0122	NS	0.0018
621	Guanine nucleotide-binding protein, beta-1 subunit	gi 6680045	MS, MS/MS	91, 69	41, 10	10, 3	5.6	38.15	0.3892 $\pm$ 0.0467	0.1933 $\pm$ 0.0480	0.3289 $\pm$ 0.0202	0.0111	0.0098	NS	NS
623	Tubulin alpha-2 chain (Alpha-tubulin 2) isoform 7	gi 73996522	MS, MS/MS	82, 122	23, 11	7, 3	5.00	48.86	0.1450 $\pm$ 0.0105	0.0636 $\pm$ 0.0349	0.0855 $\pm$ 0.0066	0.0441	0.0420	NS	NS
644	Unidentified								0.0842 $\pm$ 0.0163	0.0200 $\pm$ 0.0127	0.0510 $\pm$ 0.0110	0.0150	0.0114	NS	NS
754	Centrosomal protein 63kDa isoform 2	gi 194221623	MS	58, NA	37, NA	13, NA	5.69	58.31	0.1721 $\pm$ 0.0061	0.3377 $\pm$ 0.0335	0.2202 $\pm$ 0.0244	0.0007	0.0006	NS	0.0098
807	Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTM3-3) (GST class-mu 3) (hGSTM3-3) isoform 1	gi 57088159	MS/MS	NA, 32	NA, 7	NA, 1	6.74	27.32	0.1705 $\pm$ 0.0128	0.2736 $\pm$ 0.0396	0.1591 $\pm$ 0.0229	0.0166	0.0452	NS	0.0257
813	Unidentified								0.4906 $\pm$ 0.0173	0.3973 $\pm$ 0.0308	0.5654 $\pm$ 0.0213	0.0006	0.0360	NS	0.0004
887	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d isoform a	gi 57092471	MS/MS	NA, 63	NA, 8	NA, 1	5.40	18.68	0.2529 $\pm$ 0.0077	0.3795 $\pm$ 0.0516	0.3091 $\pm$ 0.0203	0.0446	0.0360	NS	NS
895	Alpha crystallin B chain (Alpha(B)-crystallin) (Rosenthal fiber component)	gi 57085977	MS	84, NA	56, NA	9, NA	6.76	20.05	0.3015 $\pm$ 0.0109	0.3478 $\pm$ 0.0277	0.4039 $\pm$ 0.0239	0.0170	NS	0.0130	NS
977	Unidentified								0.2259 $\pm$ 0.0148	0.5457 $\pm$ 0.0711	0.3730 $\pm$ 0.0562	0.0026	0.0018	NS	NS
993	Cytosolic purine 5-nucleotidase (5-nucleotidase cytosolic II) isoform 8	gi 73998435	MS	60, NA	20, NA	10, NA	5.88	66.25	0.3931 $\pm$ 0.0260	0.6284 $\pm$ 0.0636	0.4158 $\pm$ 0.0390	0.0041	0.0063	NS	0.0128
997	Unidentified								0.2259 $\pm$ 0.0148	0.5457 $\pm$ 0.0711	0.3730 $\pm$ 0.0562	0.0026	0.0018	NS	0.0150
1000	Unidentified								0.0931 $\pm$ 0.0101	0.1017 $\pm$ 0.0117	0.2252 $\pm$ 0.0550	0.0216	NS	0.0321	0.0457
1013	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like isoform 1	gi 74006671	MS	51, NA	21, NA	7, NA	7.17	40.97	0.1609 $\pm$ 0.0059	0.2792 $\pm$ 0.0247	0.2659 $\pm$ 0.0149	0.0003	0.0005	0.0015	NS
1023	Immunoglobulin heavy chain variable region	gi 11270066	MS	69, NA	71, NA	6, NA	8.56	11.08	0.2323 $\pm$ 0.0192	0.4159 $\pm$ 0.0349	0.2528 $\pm$ 0.0302	0.0007	0.0012	NS	0.0031

NCBI = National Center for Biotechnology Information
%Cov = %Sequence coverage [(number of the matched residues/total number of residues in the entire sequence) x 100%]
NA = Not applicable

Table S3: Summary of differentially expressed proteins in spinal cord identified by Q-TOF MS and/or MS/MS analyses.

Spot no.	Protein name	NCBI ID	Identified by	Identification scores (MS, MS/MS)	%Cov (MS, MS/MS)	No. of matched peptides (MS, MS/MS)	p/	MW (kDa)	Intensity (Mean ± SEM)			ANOVA p values		Tukey's post-hoc multiple comparisons		
									Control	Paralytic	Furious			Paralytic vs Control	Furious vs Control	Paralytic vs Furious
73	150 kDa oxygen-regulated protein precursor (Opr150) (Hypoxia up-regulated homolog 1)	gi 73955046	MS, MS/MS	75, 76	16, 2	14, 2	5.46	122.21	0.0341 ± 0.0045	0.1260 ± 0.0264	0.0750 ± 0.0233	0.0376		0.0300	NS	NS
157	Oxygen-regulated protein 1, AIIName: Full=Retinitis pigmentosa RP1 protein homolog	gi 62900882	MS	84, NA	11, NA	20, NA	5.61	242.48	0.0231 ± 0.0035	0.0000 ± 0.0000	0.0214 ± 0.0071	0.0047		0.0076	NS	0.0130
158	RCGA7063	gi 149028757	MS	79, NA	21, NA	15, NA	6.82	121.89	0.0375 ± 0.0045	0.0000 ± 0.0000	0.0332 ± 0.0095	0.0010		0.0015	NS	0.0042
159	Hypothetical rhabdomyosarcoma antigen Mu-RMS-40.6c	gi 48476968	MS	76, NA	18, NA	10, NA	4.97	49.75	0.0630 ± 0.0070	0.0087 ± 0.0048	0.0411 ± 0.0100	0.0007		0.0005	NS	0.0266
182	Heat shock protein 90kDa beta, member 1	gi 50979166	MS, MS/MS	137, 87	30, 4	23, 3	4.78	92.74	0.3857 ± 0.0475	0.0422 ± 0.0475	0.1596 ± 0.0373	0.0090		NS	0.0101	0.0370
283	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa precursor isoform 1	gi 57110953	MS	123, NA	32, NA	17, NA	5.85	80.65	0.0410 ± 0.0095	0.0402 ± 0.0048	0.0000 ± 0.0000	0.0005		NS	0.0011	0.0013
284	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa precursor isoform 4	gi 74005206	MS	84, NA	23, NA	13, NA	6.10	81.06	0.0533 ± 0.0038	0.0318 ± 0.0099	0.0070 ± 0.0070	0.0045		NS	0.0033	NS
304	Werner helicase interacting protein 1, isoform CRA_b	gi 748700412	MS	82, NA	21, NA	10, NA	5.89	83.96	0.0527 ± 0.0031	0.0363 ± 0.0072	0.1077 ± 0.0110	0.0001		NS	0.0008	0.0001
327	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)	gi 123647	MS, MS/MS	117, 148	30, 9	16, 4	5.24	70.99	0.2055 ± 0.0237	0.3348 ± 0.0182	0.2743 ± 0.0391	0.0229		0.0177	NS	NS
364	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (CRMP-2) isoform 6 (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2)	gi 73993705	MS	124, NA	41, NA	17, NA	5.95	62.62	0.0296 ± 0.0094	0.0172 ± 0.0052	0.0000 ± 0.0000	0.0194		NS	0.0153	NS
373	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMP-2) isoform 4	gi 73983699	MS/MS	NA, 302	NA, 14	NA, 5	5.80	62.17	0.1654 ± 0.0143	0.0786 ± 0.0099	0.0947 ± 0.0226	0.0056		0.0066	0.0249	NS
375	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMP-2) isoform 6	gi 73993705	MS, MS/MS	226, 372	54, 15	24, 5	5.95	62.62	0.2287 ± 0.0307	0.1062 ± 0.0174	0.0925 ± 0.0058	0.0008		0.0031	0.0013	NS
408	Dihydropyrimidinase-like 2	gi 40254595	MS, MS/MS	187, 293	45, 14	20, 5	5.95	62.64	0.2805 ± 0.0384	0.1761 ± 0.0329	0.3310 ± 0.0298	0.0244		NS	NS	0.0212
436	Unidentified								0.0494 ± 0.0051	0.0468 ± 0.0050	0.0092 ± 0.0060	0.0002		NS	0.0005	0.0009
445	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) isoform 2	gi 73965502	MS, MS/MS	109, 23	43, 2	16, 1	5.63	49.52	0.0174 ± 0.0059	0.0371 ± 0.0089	0.0000 ± 0.0000	0.0017		NS	NS	0.0012
459	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) isoform 1	gi 73965500	MS	90, NA	34, NA	13, NA	5.63	49.52	0.0620 ± 0.0050	0.0517 ± 0.0106	0.1421 ± 0.0210	0.0003		NS	0.0013	0.0004
460	Septin-8	gi 73971156	MS, MS/MS	90, 52	29, 4	13, 2	6.35	61.56	0.0907 ± 0.0047	0.0126 ± 0.0106	0.0516 ± 0.0047	0.0000		0.0000	0.0118	0.0118
463	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 isoform 1	gi 73968673	MS	160, NA	44, NA	21, 5	5.51	57.74	0.1049 ± 0.0087	0.0837 ± 0.0081	0.1453 ± 0.0194	0.0173		NS	NS	0.0146
553	Creatine kinase B-type (Creatine kinase, B chain) (B-CK) isoform 1	gi 73964131	MS, MS/MS	236, 324	54, 18	48, NA	6.05	44.31	0.6536 ± 0.0330	0.6194 ± 0.0661	0.8821 ± 0.0517	0.0110		NS	0.0330	0.0144
579	Creatine kinase E-type (Creatine kinase, B chain) (B-CK) isoform 1	gi 73964131	MS, MS/MS	218, 242	54, 18	16, 5	5.55	44.31	0.4507 ± 0.0290	0.4179 ± 0.0323	0.6666 ± 0.0596	0.0023		NS	0.0093	0.0033
602	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) isoform 1	gi 73965500	MS	135, NA	38, NA	16, NA	5.63	49.52	0.0596 ± 0.0379	0.1897 ± 0.1438	0.4363 ± 0.4024	0.0000		NS	0.0000	0.0000
609	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) isoform 1	gi 57108147	MS, MS/MS	87, 187	29, 14	11, 4	8.60	47.45	0.1315 ± 0.0297	0.2570 ± 0.0208	0.1459 ± 0.0425	0.0339		0.0433	NS	NS
629	Fructose-bisphosphate aldolase C (Brain-type aldolase) isoform 1	gi 57091277	MS, MS/MS	148, 220	52, 18	15, 4	6.21	39.72	0.0640 ± 0.0110	0.0090 ± 0.0076	0.3765 ± 0.0454	0.0055		0.0050	NS	0.0425
634	Fructose-bisphosphate aldolase C (Brain-type aldolase) isoform 2	gi 73966974	MS, MS/MS	56, 88	41, 13	7, 2	5.90	31.32	0.0640 ± 0.0110	0.0090 ± 0.0076	0.3765 ± 0.0454	0.0055		0.0050	NS	0.0425
651	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha isoform 2	gi 73951310	MS	64, NA	36, NA	10, NA	5.86	35.09	0.1590 ± 0.0061	0.1092 ± 0.0059	0.2230 ± 0.0127	0.0000		0.0041	0.0005	0.0000
661	Silent information regulator 2	gi 73697550	MS	70, NA	41, NA	8, NA	7.67	32.01	0.0419 ± 0.0139	0.1653 ± 0.0132	0.0792 ± 0.0294	0.0167		NS	NS	0.0158
681	Keratin 1	gi 60961491	MS	90, NA	26, NA	13, NA	7.62	65.62	0.0413 ± 0.0019	0.0329 ± 0.0052	0.0145 ± 0.0073	0.0130		NS	0.0114	NS
683	Silent information regulator 2	gi 73697550	MS/MS	NA, 57	NA, 15	NA, 3	7.67	32.01	0.1611 ± 0.0288	0.0973 ± 0.0112	0.0740 ± 0.0185	0.0295		NS	0.0281	NS
693	Zinc finger protein 615	gi 197102729	MS	58, NA	24, NA	16, NA	9.31	86.12	0.1327 ± 0.0094	0.1273 ± 0.0073	0.1698 ± 0.0141	0.0316		NS	NS	0.0394
698	Keratin 1	gi 160961491	MS	96, NA	26, NA	12, NA	7.62	65.62	0.1207 ± 0.0148	0.0849 ± 0.0108	0.1658 ± 0.0247	0.0222		NS	NS	0.0173
711	Chromosome 1 open reading frame 27	gi 126306536	MS	79, NA	21, NA	7, NA	6.37	53.56	0.1848 ± 0.0194	0.2134 ± 0.0278	0.3747 ± 0.0224	0.0002		NS	0.0003	0.0013
735	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein beta	gi 62465998	MS	87, NA	41, NA	11, NA	5.88	40.32	0.0988 ± 0.0099	0.1470 ± 0.0457	0.0000 ± 0.0000	0.0155		NS	NS	0.0134
770	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial precursor (HIBADH) isoform 1	gi 73976179	MS	89, NA	24, NA	8, NA	8.38	35.68	0.1274 ± 0.0039	0.0865 ± 0.0118	0.0855 ± 0.0071	0.0014		0.0013	0.0166	NS
811	Myotubularin related protein 6	gi 194672062	MS	76, NA	27, NA	12, NA	7.29	71.00	0.1762 ± 0.0133	0.0835 ± 0.0066	0.1628 ± 0.0140	0.0001		0.0002	NS	0.0009
814	Cytoplasmic beta-actin isoform 2	gi 739580667	MS/MS	NA, 71	NA, 7	NA, 2	5.29	42.08	0.0935 ± 0.0197	0.1495 ± 0.0279	0.0139 ± 0.0139	0.0037		NS	NS	0.0028
821	Complement component 1, q subcomponent binding protein precursor	gi 73955331	MS/MS	NA, 27	NA, 5	NA, 1	4.77	30.42	0.3736 ± 0.0209	0.2869 ± 0.0160	0.4236 ± 0.0577	0.0270		NS	NS	0.0238
872	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	gi 73951868	MS/MS	NA, 126	NA, 11	NA, 2	5.95	35.32	0.5050 ± 0.0347	0.3185 ± 0.0398	0.5122 ± 0.0482	0.0105		0.0226	NS	0.0180
874	Heat shock protein beta-1	gi 50979116	MS, MS/MS	74, 96	31, 12	8, 2	6.23	22.93	0.3965 ± 0.0214	0.3070 ± 0.0141	0.6276 ± 0.0376	0.0000		NS	0.0001	0.0000
913	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d isoform a	gi 57108097	MS, MS/MS	53, 99	77, 26	11, 3	5.64	18.70	0.3123 ± 0.0156	0.2056 ± 0.0114	0.2918 ± 0.0095	0.0001		0.0001	NS	0.0009
915	DJ-1 protein isoform 1	gi 57086915	MS/MS	NA, 31	NA, 7	NA, 1	5.97	20.17	0.2451 ± 0.0189	0.1234 ± 0.0055	0.1872 ± 0.0267	0.0018		0.0012	NS	NS
918	Peroxisome 2 (Thioredoxin peroxidase 1) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 1) (Thiol-specific antioxidant protein) (TSA) (PRP) (Natural killer cell enhancing factor B) (NKRF-B) isoform 1	gi 73986497	MS/MS	NA, 169	NA, 23	NA, 4	5.20	22.11	0.3579 ± 0.0243	0.2140 ± 0.0242	0.4055 ± 0.0446	0.0035		0.0247	NS	0.0035
932	Peroxisome 1	gi 4505591	MS, MS/MS	113, 46	44, 10	11, 2	8.27	22.32	0.2288 ± 0.0154	0.1288 ± 0.0148	0.1712 ± 0.0128	0.0013		0.0010	0.0452	NS
960	Alpha-crystallin B chain (Alpha(B)-crystallin)	gi 149716387	MS	85, NA	48, NA	8, NA	6.76	19.98	0.5524 ± 0.0525	0.2190 ± 0.0289	0.7486 ± 0.0698	0.0001		0.0054	0.0452	0.0000
1043	Fatty acid-binding protein, brain (FABP) (Brain lipid-binding protein) (BLBP) (Mammary derived growth inhibitor related)	gi 73946307	MS, MS/MS	68, 182	70, 27	10, 3	5.19	15.04	0.4825 ± 0.1061	0.1939 ± 0.0361	0.2126 ± 0.0537	0.0231		0.0342	0.0484	NS
1055	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15 (predicted), isoform CRA_b	gi 149050007	MS	66, NA	66, NA	5, NA	10.21	6.43	0.3574 ± 0.0272	0.1871 ± 0.0092	0.2475 ± 0.0125	0.0000		0.0000	0.0020	NS
1057	Alpha-S1-casein	gi 162794	MS/MS	NA, 115	NA, 11	NA, 2	4.85	24.54	0.1663 ± 0.0543	0.0285 ± 0.0185	0.0000 ± 0.0000	0.0075		0.0291	0.0089	NS
1065	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (CRMP-2) isoform 6 (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2)	gi 73993705	MS	124, NA	41, NA	17, NA	5.95	62.62	0.0296 ± 0.0094	0.0172 ± 0.0052	0.0000 ± 0.0000	0.0194		NS	0.0153	NS
1069	S-100 calcium-binding protein beta subunit (S-100 protein, beta chain)	gi 74001608	MS/MS	NA, 40	NA, 3	NA, 1	9.91	49.49	0.7950 ± 0.0532	0.3898 ± 0.0285	0.2685 ± 0.0367	0.0000		0.0000	0.0000	NS
1185	NEFM protein	gi 748342538	MS	91, NA	21, NA	15, NA	4.85	98.39	0.2874 ± 0.0160	0.1145 ± 0.0387	0.3747 ± 0.0517	0.0015		0.0394	0.0245	NS

1194	Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor (Pyruvic carboxylase) (PCB) isoform 1	g I73982897	MS, MS/MS	212, 22	28, 1	27, 1	6, 32	130, 25	0.0225 ± 0.0132	0.1121 ± 0.0233	0.0613 ± 0.0091	0.0127	0.0098	NS	NS
1215	Annexin A2	g I18645167	MS	70, NA	38, NA	10, NA	7, 57	38, 78	0.1893 ± 0.0276	0.1379 ± 0.0182	0.0868 ± 0.0191	0.0227	NS	0.0175	NS
1220	Serotransferrin precursor (Transferrin) (Siderophilin) (Beta-1-metal binding globulin) isoform 1	g I73990142	MS, MS/MS	239, 186	42, 8	27, 5	7, 73	80, 22	0.0647 ± 0.0102	0.1730 ± 0.0231	0.0849 ± 0.0173	0.0033	0.0039	NS	0.0166
1251	Collagen, type VI, alpha 1 isoform 1	g I19887130	MS/MS	NA, 73	NA, 3	NA, 3	5, 24	109, 74	0.0041 ± 0.0041	0.0881 ± 0.0190	0.0050 ± 0.0050	0.0006	0.0014	NS	0.0016
1259	Vinculin (Metavinculin)	g I73953587	MS	88, NA	22, NA	16, NA	6, 82	87, 67	0.0000 ± 0.0000	0.1152 ± 0.0246	0.0691 ± 0.0111	0.0015	0.0011	0.0404	NS
1260	Xin actin-binding repeat containing 2 isoform 1	g I66841385	MS	79, NA	9, NA	30, NA	5, 83	431, 30	0.0165 ± 0.0110	0.1183 ± 0.0278	0.0669 ± 0.0106	0.0132	0.0099	NS	NS
1283	Thymopoietin II	g I229542	MS	78, NA	97, NA	5, NA	8, 04	55, 59	0.0000 ± 0.0000	0.1248 ± 0.0057	0.1722 ± 0.0153	0.0000	0.0000	0.0000	0.0091
1342	Hypothetical protein	g I6808049	MS	62, NA	95, NA	6, NA	4, 68	5, 07	0.0000 ± 0.0000	0.1968 ± 0.0408	0.0791 ± 0.0520	0.0134	0.0105	NS	NS
1343	Beta globin	g I57113367	MS, MS/MS	181, 211	87, 42	11, 5	7, 83	16, 23	0.1932 ± 0.0802	0.8061 ± 0.1392	0.3819 ± 0.1471	0.0176	0.0157	NS	NS
1344	Beta globin	g I57113367	MS, MS/MS	133, 61	86, 8	10, 1	7, 83	16, 23	0.0000 ± 0.0000	0.4208 ± 0.0366	0.2362 ± 0.0817	0.0002	0.0002	0.0180	NS
1381	Keratin 10 isoform 2	g I14667513	MS	90, NA	29, NA	13, NA	5, 05	96, 86	0.0176 ± 0.0176	0.0759 ± 0.0227	0.3540 ± 0.1066	0.0047	NS	0.0057	0.0205
1385	Alpha crystallin B chain (Alpha(B)-crystallin) (Rosenthal fiber component) (Heat-shock protein beta-5) (HspB5) isoform 1	g I57085977	MS, MS/MS	120, 187	60, 26	11, 3	6, 76	20, 05	0.0076 ± 0.0076	0.4507 ± 0.0203	0.1978 ± 0.0448	0.0000	0.0000	0.0011	0.0001
1394	40S ribosomal protein S3a (V-fos transformation effector protein) isoform 11	g I73977917	MS	58, NA	25, NA	6, NA	9, 93	30, 69	0.1508 ± 0.0410	0.0887 ± 0.0187	0.2208 ± 0.0126	0.0152	NS	NS	0.0116
1395	Carbonic anhydrase I (Carbonate dehydratase I) (CA-I) (Carbonic anhydrase B)	g I57108007	MS, MS/MS	120, 71	60, 5	11, 1	6, 59	29, 03	0.1720 ± 0.0571	0.1475 ± 0.0069	0.0000 ± 0.0000	0.0048	NS	0.0063	0.0178
1400	Flavin reductase (FR) (NADPH-dependent diaphorase) (NADPH:flavin reductase) (FIR) (Biliverdin reductase B) (BVR-B) (Biliverdin-X beta-reductase) (Green heme binding protein) (GHBP)	g I73948324	MS, MS/MS	78, 33	48, 7	6, 1	7, 12	22, 24	0.0262 ± 0.0128	0.0947 ± 0.0192	0.0395 ± 0.0177	0.0417	0.0450	NS	NS
1408	Annexin A2	g I50950177	MS, MS/MS	200, 175	58, 14	18, 3	6, 92	38, 92	0.1237 ± 0.0270	0.3673 ± 0.0710	0.2773 ± 0.0429	0.0258	0.0214	NS	NS
1512	Heat shock protein beta-1	g I50979116	MS/MS	NA, 99	NA, 12	NA, 2	6, 23	22, 93	0.0000 ± 0.0000	0.1178 ± 0.0105	0.0191 ± 0.0191	0.0000	0.0000	NS	0.0003
1514	Glycogen phosphorylase, muscle form (Myophosphorylase)	g I1730556	MS	76, NA	19, NA	16, NA	6, 91	97, 73	0.0906 ± 0.0323	0.0644 ± 0.0049	0.1619 ± 0.0256	0.0319	NS	NS	0.0304

NCBI = National Center for Biotechnology Information
 %Cov = %Sequence coverage [(number of the matched residues/total number of residues in the entire sequence) × 100%]
 NA = Not applicable
 NS = Not significance

Ante- and post-mortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests

Expert Rev. Mol. Diagn. 10(2), 207–218 (2010)

Supaporn
Wacharapluesadee[†]
and Thiravat
Hemachudha

[†]Author for correspondence
WHO Collaborating Centre for
Research and Training on Viral
Zoonoses, Faculty of Medicine,
Chulalongkorn University and
King Chulalongkorn Memorial
Hospital, Thai Red Cross Society,
Bangkok, Thailand, 10330
Tel.: +66 2256 4000
Fax: +66 2652 3122
spwva@hotmail.com

Sensitivity, specificity and short turn-around time nucleic acid-amplification tests (NATs) have been steadily improving. NATs have been employed in the diagnosis of rabies to distinct different strains, as well as to identify new lyssaviruses. NATs have advantages over traditional methods, such as the direct fluorescence antibody test. They can be applied to fluid samples and brain tissue that is substantially decomposed. NATs can be used as an alternative method for confirmation or exclusion of the diagnosis in a suspected rabies patient. Real-time PCR methods are more favored than conventional reverse-transcription PCR methods by several laboratories. Second-round PCR, either nested or heminested, has been used for ante-mortem diagnosis to detect low levels of RNA. This review the details obstacles in making a diagnosis, how to properly utilize NATs (sample preparation, nucleic amplification techniques, amplification targets and primer design); and interprets the results obtained in recent studies.

KEYWORDS: ante-mortem • detection • diagnosis • nucleic acid amplification • PCR • post-mortem • rabies
• real-time PCR

Rabies remains a neglected disease. This is true especially in canine rabies-endemic regions of Asia and Africa. It has been estimated by the WHO that 55,000 individuals (~30,000 in India alone) die of rabies each year [1]. The actual number of human deaths must be higher than what the WHO estimates since several rabies-endemic regions have not submitted any reports [101]. This under-reporting can be readily explained by the fact that rabies is not classified as a notifiable disease in many countries especially those where reliable diagnostic facilities are lacking [2,3]. Rabies in large parts of the world is diagnosed based on clinical grounds alone, which are not reliable. This poses problems in prioritizing the importance of this disease and results in judgment errors by policy makers.

It has been increasingly known that rabies in humans presents in different clinical forms. The classic forms are furious and paralytic rabies. Although the latter has been recognized for many decades, misdiagnoses still occur leading to transplantation of tissues or organs [4,5]. Paralytic rabies is usually confused with Guillain–Barre syndrome and poliomyelitis-like illness from arboviruses [6]. Even in the case of furious rabies, cardinal manifestations,

such as phobic spasms, may not be present [7]. Stages of the disease (early or comatose), nature of viral genotype and nature of virus variant (dog or bat despite belonging to the same genotype 1), inadequate history taking, lack of bite exposure history and disease ignorance can cloud judgments of physicians confronted by a rabies patient [7]. In addition, atypical forms have been reported in association with bat and dog variants.

Post-mortem diagnosis of rabies is essential to formulate control programs, epidemiologic surveys and prophylactic measures. Post-mortem examination using the direct fluorescence antibody (DFA) test on brain impression smears is the gold standard [8], with direct rapid immunohistochemical test (dRIT) as an optional test [9], and the rabies tissue culture infection test (RTCIT), the mouse inoculation test (MIT) or ELISA technique [10] as **confirmatory methods**. The sensitivity of these methods can be reduced, especially when the brain tissues submitted for testing are decomposed. In such cases, the nucleic acid-amplification tests (NATs) are preferable, as they have a **higher sensitivity** compared with DFA/MIT. NATs are as specific as DFA and can be completed faster than MIT or RTCIT with superior sensitivity [11,12]. They can

replace RTCIT and MIT in confirming negative DFA results and can also detect viral RNA in fluids for an ante-mortem diagnosis in humans, while the DFA cannot.

Confirmed ante-mortem diagnosis is urgent in order to alert other(s) who might have also been exposed and need rabies post-exposure prophylaxis (PEP), and to prevent spillage of virus-containing biological fluids from patient to healthcare personnel. Over 200 hospital workers received rabies PEP due to erroneous diagnosis of a patient with paralytic rabies who was in hospital for 9 days before rabies was suspected and confirmed by nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) [13]. Early diagnosis also prevents unnecessary investigation and inappropriate treatment. At present, there is no effective rabies treatment [4,14–18], and knowing the diagnosis, may also prevent tissue or organ transplantation [4,19,20].

Rabies diagnostics are some of the most difficult procedures attempted in the laboratory and should be performed only by experienced staff [21]. Here, we present an overview of established methods for rabies virus nucleic acid detection. These include the reverse-transcription PCR (RT-PCR), RT-heminested-PCR (RT-hnPCR), RT-nested-PCR (RT-nPCR), real-time PCR-based method, isothermal amplification and microarray technology.

Sample preparation for NAT

Sample type & collection

Post-mortem sample

Brain tissue is most suitable for post-mortem diagnosis of rabies in humans and animals. Brain biopsy for ante-mortem diagnosis of rabies is no longer acceptable and open brain autopsy is often rejected owing to religious beliefs in many countries and because of the reluctance of physicians to perform it. Necropsy performed through the orbit using a Trucut needle [22] or occipital route using a lumbar puncture needle for brain tissue collection [23] is an alternative option.

In warm climates, brain tissue may decompose rapidly. Viral RNA can be detected by RT-PCR even in decomposed samples where DFA results were often negative [24–26]. The RT-hnPCR was more sensitive than RT-PCR in decomposed brain, however, both techniques were not as sensitive as in samples stored at -20°C [27]. Ten decomposed brain samples; collected between 1998 and 2000 in Israel and diagnosed as negative by DFA, were found to be positive using RT-PCR [28]. In the case of mouse brain samples stored at ambient temperature ($25\text{--}27^{\circ}\text{C}$), the intensity of the RT-PCR band started to diminish by day 12. Rabies viral genome could be successfully amplified by RT-PCR up to 23 days later, whereas the results of a DFA test remained positive only up to day 7 [29]. Indeed, sensitivity on decomposed brains varies ($75\text{--}100\%$) in specimens kept at room temperature (37°C) or higher for as long as $72\text{--}360\text{ h}$ [25–27].

Nucleic acid-amplification test methods are also useful and applicable to brain tissue samples, including those from filter paper and archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Filter paper can be used for collecting brain samples and stored at room temperature for more than 222 days with 100% sensitivity and specificity when tested by NASBA ($n = 10$) [30].

The infectivity of rabies virus was inactivated after a 2 h contact with FTA® paper [31]. The sensitivity of the RT-hnPCR following RNA fixation on the filter paper was equivalent (100%) to that of standard RT-hnPCR at 0.0016 tissue culture infectious dose 50%. (TCID_{50}) of CVS-11 fixed rabies virus. No significant nucleotide sequence variation was observed (more than 99% identity of 584 nucleotide long sequences) between the sequences obtained from fixed FTA paper and frozen samples. NATs in archival samples have also been found to be a valuable tool in providing retrospective and epidemiological data. PCR was shown to be able to identify rabies viral nucleoprotein (*N*) gene in archival formalin-fixed and paraffin-embedded brain tissue after storage at room temperature for 16 years in all seven patients (20 positive out of 30 examined samples), but not from every immunohistochemical-positive specimen [32]. More than one formalin-fixed and paraffin-embedded sample from different regions of the brain was needed to obtain a correct diagnosis. The sequence analysis of 1432 bases of the *N* gene from a frozen-rabies infected brain sample showed 100% identity to that after 24-h fixation in formalin and paraffin-embedding after 1 month.

Ante-mortem sample

Rabies viral RNA can be detected in a range of biological fluids and in samples, such as saliva, cerebrospinal fluid (CSF), tears and urine, as well as skin at the nape of neck containing hair follicles [33–39]. More than one ante-mortem sample is preferable and at least three should be examined simultaneously and repeatedly if the result is negative. There is an intermittent nature of viral shedding in biological fluids (such as saliva, CSF or urine) [34,40]. From our experience, results of NATs on freshly collected urine of 1–2 ml volume might be more reliable than using frozen specimen. Rabies viral RNA could be detected in extracted hair follicles on hospital admission using NASBA [14,35]. It is also a good source if other samples cannot be collected. Tears can also be a source of the virus, which was demonstrated in at least one patient using RT-nPCR, where corneal impressions and CSF were negative by DFA and RT-nPCR, respectively [36]. Further validations of using extracted hair follicles or tears as a source are needed.

Data from a large cohort study by Dacheux *et al.* involving 43 patients, showed higher sensitivity of RT-nPCR from skin biopsies (98.3% per sample) than saliva (70.2%) and urine (9.5%) [34]. The sensitivity from liquid saliva samples was 74.6% (67 samples) and 52.9% in saliva swab samples (17 samples). However, 100% of these rabies-infected patients were identified through testing of three serial saliva samples. The positivity rate of saliva increased during the first 2 days after onset of symptoms and remained stable from day 2 through to day 7 or even later. In other reports saliva samples have a higher rate of positivity than CSF [33,35,41].

Results of our data (from 56 patients during 1998–2009) at Chulalongkorn University Hospital (Bangkok, Thailand) using the NASBA method are summarized in TABLE 1 (furious rabies patients) and TABLE 2 (paralytic rabies patients). Sensitivity of

Table 1. Results of ante-mortem diagnosis of 50 furious rabies patients at Chulalongkorn University Hospital (1998–2009) using nucleic acid sequence-based amplification method.

Patient number	Positive samples/total of samples tested (n)				
	Saliva	CSF	Urine	Hair follicles	Total
1	1/1	0/2	NA	NA	1/3
2	1/1	NA	NA	NA	1/1
3	1/1	NA	1/1	NA	2/2
4	1/1	0/1	1/1	NA	2/3
5	1/1	0/1	0/1	NA	1/3
6	0/1	NA	NA	NA	0/1
7	NA	0/1	1/1	NA	1/2
8	1/1p	NA	NA	NA	1/1
9	1/1	0/1	NA	NA	1/2
10	1/1	NA	1/1	NA	2/2
11	1/1	NA	NA	NA	1/1
12	1/1	NA	0/1	NA	1/2
13	NA	1/1	0/1	NA	1/2
14	1/1	NA	0/1	NA	1/2
15	1/1	1/1	0/1	NA	2/3
16	1/1	1/1	1/1	NA	3/3
17	1/1	NA	NA	1/1	2/2
18	1/1	0/1	0/1	NA	1/3
19	1/1	NA	0/1	NA	1/2
20	NA	1/1	NA	NA	1/1
21	NA	NA	NA	1/1	1/1
22	1/1	NA	1/1	NA	2/2
23	1/1	0/1	0/1	NA	1/3
24	NA	1/1	0/2	NA	1/3
25	1/1	NA	0/1	NA	1/2
26	1/1	NA	0/1	1/1	2/3
27	1/1	1/1	1/1	NA	3/3
28	1/1	NA	NA	NA	1/1
29	1/1	0/1	0/1	NA	1/3
30	NA	NA	NA	1/1p	1/1
31	1/1	1/1	1/1	NA	3/3
32	NA	1/1	1/1	0/1	2/3
33	1/1	NA	1/1	1/1	3/3
34	0/1	NA	0/1	0/1	0/3

Bold represents rabies negative by ante-mortem testing.

[†]Detection by reverse-transcription-nested-PCR.

^{*}Treated with coma induction, ribavirin and ketamine with a survival period of 8 days; samples of saliva and extracted hair follicles were tested by nucleic acid sequence-based amplification and quantitative real-time PCR (detail in TABLE 4). CSF: Cerebrospinal fluid; NA: Not available; p: Post-mortem collection.

Table 1. Results of ante-mortem diagnosis of 50 furious rabies patients at Chulalongkorn University Hospital (1998–2009) using nucleic acid sequence-based amplification method.

Patient number	Positive samples/total of samples tested (n)				
	Saliva	CSF	Urine	Hair follicles	Total
35	NA	1/1	NA	0/1	1/2
36	1/1	NA	0/1	NA	1/2
37	1/1	0/1	NA	0/1	1/3
38	0/1	NA	1/1	0/1	1/3
39	NA	NA	NA	1/1p	1/1
40	2/4	0/1	2/4	1/1	5/10
41	2/2	0/1	0/1	NA	2/4
42	1/1 [†]	1/1 [†]	1/1 [†]	0/1 [†]	3/4
43	NA	NA	NA	0/1	0/1
44	1/1	NA	1/1	NA	2/2
45	1/1	NA	1/1	1/1	3/3
46	NA	0/1	NA	NA	0/1
47	NA	NA	NA	1/1	1/1
48	1/1	NA	0/1	1/1	2/3
49	3/5	1/1	NA	NA	4/6
50 [*]	7/8	0/1	0/1	3/8	10/18
Total	45/53	11/25	16/36	13/25	85/139
Positivity	84.9%	44%	44.4%	52%	61.2%

Bold represents rabies negative by ante-mortem testing.

[†]Detection by reverse-transcription-nested-PCR.

^{*}Treated with coma induction, ribavirin and ketamine with a survival period of 8 days; samples of saliva and extracted hair follicles were tested by nucleic acid sequence-based amplification and quantitative real-time PCR (detail in TABLE 4). CSF: Cerebrospinal fluid; NA: Not available; p: Post-mortem collection.

testing saliva (47/62 samples, 75.8%) was higher than testing extracted hair follicles (13/26 samples, 50.0%), CSF (13/30 samples, 43.3%) and urine (16/41 samples, 39.0%). However, these results were unable to distinguish false-negatives from true-negatives due to the absence of RNA extraction controls. Seven patients had negative results from ante-mortem analysis. Brain tissues from these patients were confirmed by NASBA (patient numbers 6, 34, 42 in TABLE 1 and P2 and P3 in TABLE 2), DFA and RT-PCR (numbers 46 and P6 in TABLES 1 & 2, respectively). Three false-negatives were cases of paralytic rabies (patient numbers P2, P3 and P6 in TABLE 2). Saliva samples were collected and examined on two consecutive days in all. In addition, patient P2 had CSF and urine tested on one occasion on the same day. Patient P3 had urine tested on two consecutive days. Patient P6 had CSF, urine and extracted hair follicles tested simultaneously on one occasion. It is not known whether the damaged nerves in paralytic rabies can influence the outcome of laboratory results [42]. The remaining four test-negative rabies patients were cases of furious rabies. Three (patients numbers 6, 43, and 46 in TABLE 1) had only one specimen for analysis.

Table 2. Results of ante-mortem diagnosis of six paralytic rabies patients at Chulalongkorn University Hospital during 1998–2009 by using nucleic acid sequence-based amplification method.

Patient number	Positive samples/total of samples tested (n)				
	Saliva	CSF	Urine	Hair follicles	Total
P1	0/1	1/2	NA	NA	1/3
P2	0/2	0/1	0/1	NA	0/4
P3	0/2	NA	0/2	NA	0/4
P4	1/1	NA	NA	NA	1/1
P5	1/1	1/1	0/1	NA	2/3
P6	0/2	0/1	0/1	0/1	0/5
Total	2/9	2/5	0/5	0/1	4/20
Positivity	22.2%	40%	0%	0%	20%

Bold represents rabies negative by ante-mortem testing.
CSF: Cerebrospinal fluid; NA: Not available.

Patient 34, with negative results, had saliva, urine and hair follicles collected on day 2 after onset. He had been bitten by a rabid dog on his nose and developed hydrophobic spasms 19 days later. He died on day 3 after onset. This underscores the importance of repeating the test on the following day and performing post-mortem examination despite having earlier negative results, regardless of how many sample types had been tested as negative. In conclusion, the recommended biological samples to be used for ante-mortem human rabies diagnosis are skin, saliva, CSF and urine.

Sample handling

Detection of rabies viral RNA by NATs may yield results that are easily compromised by poor quality of sample collection and storage. Besides techniques used and target gene design, results or sensitivity may also depend on timing of sample collection related to the clinical onset and the type of sample [34,35]. All specimens from suspected rabies patients should be handled with caution and considered infectious. Sample containers must be sealed securely. Samples should be taken under sterile techniques in a sterile container and transferred on ice to the laboratory within 24 h after collection. If not, they should be stored frozen at -20°C or below and then shipped frozen on dry ice.

Nucleic acid purification

The quality of extracted nucleic acid is fundamental for nucleic acid detection. It needs to be purified and free from inhibitors, and should be stored at -70°C or below with avoidance of repeated freeze-thawing. The area for sample preparation should be separate from amplification and post-amplification areas to prevent contamination. A barrier pipette tip should be used in all nucleic acid extraction steps, since as little as 20 ng of contaminating material can produce a false-positive reaction [43]. A known rabies-negative control sample should be included through all steps of extraction and amplification.

Pre-extraction protocols may be needed for some samples to enhance efficiency; such as homogenization of tissue sample [25], elution of sample from filter paper [30] or hair follicles and protease K digestion of formalin-fixed paraffin-embedded tissue [32] and skin biopsy samples [34]. To increase the test sensitivity, a larger amount of nucleic acid needs to be obtained during the extraction procedure by increasing the volume of biological fluids or the amount of tissue samples. Using Boom's technique (NucliSens Isolation Kit), which is based on silica-guanidine thiocyanate [44] or QIAmp UltraSens Virus kit, up to 1–2 ml of biological fluid are allowed.

There are various commercially available methods that can be employed for the isolation of total or mRNA from biological samples. RNA extraction with TRIzol®, a commercial reagent, is the most common method for total rabies RNA purification. TRIzol reagent is a monophasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate. Cells or tissues are first lysed with TRIzol reagent and chloroform is then added to the lysate, resulting in the separation of the solution into an aqueous and an organic phase. Removal of the aqueous phase is then followed by the subsequent precipitation of the RNA with isopropanol. Extraction methods based on the RNA-binding column containing a silica membrane for recovery of RNA are available through many manufacturers. An appropriate column should be selected for the type of specimen, RNA and amount of starting material. The Qiagen RNeasy Lipid Tissue® kit is optimized for use with fatty tissues, such as brain tissue. It integrates optimized phenol/guanidine-based lysis with RNeasy purification for isolation of high-quality total RNA without phenol carryover.

Quality control

When performing RNA extraction, it is often advantageous to have internal controls such as housekeeping genes (rRNA or β -actin mRNA) or an exogenous control. Homologous and heterologous exogenous controls are those which do not naturally occur within the specimen source [45]. A homologous control contains the same flanking nucleic acid sequence at the target nucleic acid to which the PCR primers anneal, but a different internal sequence to which a probe anneals whereas heterologous controls consist of separate amplifiable targets. These kinds of controls are essential when using molecular tests based on RNA detection. Indeed, without them, it is not possible to exclude false-negative results.

β -actin mRNA can be used as an internal control to assess the quality of the viral RNA template in TaqMan RT-PCR assay [39,46] or RT-nPCR of the large (L) polymerase gene of lyssaviruses [34]. The rRNA assay was more sensitive than β -actin mRNA in CSF samples due to the abundance of this target sequence [39]. The rRNA and rabies viral RNA from the mouse brain has been shown to have similar degradation kinetics until 360 h at 37°C, unlike β -actin RNA, which was degraded after 72 h when stored at 4°C [47]. Therefore, rRNA is suitable as a control for viral target integrity. Simultaneous amplification of the internal control (18S rRNA) and Australian bat lyssavirus (ABLV) RNA was performed by using differentially labeled probes in the same reaction [48].

Exogenous controls, using spiked low numbers of RNA plasmid instead of rRNA, can monitor minor inhibition [49]. For samples such as urine or CSF, which are likely to contain very limited amounts of cellular material, using exogenous controls are more valuable than using housekeeping genes.

Nucleic acid amplification

Amplification target

The *N* gene is mostly conserved and strongly expressed in lyssaviruses. Its sequences have been the most exhaustively reviewed [50–52] and it has become the most common amplification target. It has been extensively used as a target for real-time PCR assay (TABLE 3). The 5' and 3' coding termini of the *N* gene are more conserved than the internal parts for all genotypes of lyssaviruses [21]. One primer and probe set on *N* gene was designed based on the 239 molecular genetics epidemiological data from Thailand [53]. It was evaluated and used for the detection of rabies in Thailand and neighboring countries. The lowest detection limit was 4.0 copies per reaction (20 µl). For targets other than the *N* gene, primers targeting the glycoprotein (*G*) gene, *G*–*L* intergenic region and *L* gene were designed and used for diagnosis and rapid determination of rabies viruses isolated from various host species in Brazil by multiplex RT-PCR [54]. The effective detection limit of this method is 2 ng/ml RNA. The RT-hnPCR targeting conserved blocks in the *L* gene sequence of lyssavirus exhibited a sensitivity of 98.3% (59/60 samples) on skin biopsy specimens (20 mm³ volume) [34]; whereas RT-PCR examination of skin biopsy specimens (1 cm²; n=10) that targeted the *N* gene resulted in a sensitivity of 70% [55]. The higher sensitivity found in the former might be due to the difference in amplification method, target gene and size or volume of the sample. To clarify this, further comparison of the sensitivity between these two genes using standard condition is needed.

Primer design

The utility of RT-PCR as a diagnostic test is partly limited by primers selected for whether they can efficiently amplify target genes of all strains or genotypes of lyssaviruses. In one experiment mismatches of as many as 3 bp between an 18 bp primer and template still yielded a detectable PCR product given that large amounts of target RNA were present in the reaction [43]. Base mismatches between target and primer or probe sequences can substantially reduce assay sensitivity or even preclude detection completely. More than four mismatches between viral target sequence and that of TaqMan primers (26 and 20 nucleotides of forward and reverse primers, respectively) and probe (16 nucleotides) can result in a weakly positive or negative result [56]. In another study, low efficiency of probe-target binding was found with three mismatches in the probe binding site (31 nucleotides) [53]. Four mismatches at probe binding site prevent the generation of a fluorescent signal. The efficiency of amplification can be increased by decreasing the size of amplicon, using the space primers more closely or by using mixtures of primers or degenerate primers. cDNA amplification from a low RNA integrity sample, such as formalin-fixed and paraffin-embedded tissues, could be consistently achieved by using a primer set with the resultant small amplicon size of 139 [57] or 150 bp [32].

Generic degenerate primers for detection of some or all lyssaviruses have been developed, which might enable the detection of unexpected lyssaviruses other than rabies during rabies surveillance [34,58]. One disadvantage of using highly degenerate primers is that the annealing temperature of the PCR must be low enough to ensure effective pairing of the primers and the template DNA. However, under low-stringency conditions, the likelihood of producing non-specific PCR products might increase. Three sets of primers and probe for real-time PCR assay were designed and evaluated based on 203 isolates representative of worldwide diversity of rabies virus [39]. However, these primer and probe sets could detect genotype 1, 5 and Khujand.

Reverse-transcription PCR

Since rabies is a RNA virus, the amplification procedure consists of the RT of the viral RNA genome or target viral transcript into cDNA. This is followed by the amplification of the cDNA using PCR. RT is performed by using a specific sense primer [26,28,33,59] and/or random primers [12,34,47] to synthesize cDNA from viral RNA. The use of both sense and anti-sense primers in the RT step to synthesize cDNA from mRNA and viral RNA has been reported [11,25,27].

Single-tube RT-PCR utilizes a single buffer system for both RT and PCR without interruption as a single thermal cycling program [60]. This can avoid cross-contamination from multiple steps of manipulation. Other one-step RT-PCR protocols for rabies, using commercial kits, have been reported [49,54,61,62]. The one-step real-time RT-PCR method is more sensitive than the two-step protocol using a positive sense primer for RT [39]. The former allows detection of negative and positive sense RNA, while the two-step method is directed exclusively to the negative strand. Nested PCR is another method in which the product of a primary PCR is subjected to a second round of amplification that uses primers internal to those employed in the first round. Heminested PCR employs one of the first-round primers in combination with an internal primer in the second PCR. As little as 8 pg of RNA from a viral suspension can be detected by RT-nPCR of 524-bp PCR product of the *N* gene [25]. The detection limit of the RT-hnPCR method for CVS-11 fixed rabies virus was 0.0016 TCID₅₀ [31]. The RT-hnPCR was more sensitive than RT-PCR. In 50 thawed brain samples from different animal species, 26 (52%) were positive for RT-PCR and 45 (90%) for hnRT-PCR [27]. The RT-hnPCR showed a higher sensitivity than the one obtained with MIT or RTCIT [62]. Although these re-amplification methods are ten- to 100-fold more sensitive than standard primary amplification, the risk of cross-contamination is increased. The use of well-matched primers for first-round PCR in most circumstances should preclude the need for a nested approach [43].

Detection of PCR product

PCR products are commonly separated according to size by electrophoresis through agarose gel, followed by staining with ethidium bromide, an intercalating dye, between bases, and this is visualized under UV light. More sensitive and specific methods

Table 3. Real-time PCR platforms for rabies virus detection.

Author (year)	Chemistry	Target gene (position in genome)*	Sensitivity	Main objective	Comments	Ref.
Black <i>et al.</i> (2002)	TaqMan probes	N (140–641)	0.02 TCID ₅₀ /ml	Discrimination of 1–6 rabies genotypes	Complex assay using eight different probes	[69]
Smith <i>et al.</i> (2002)	TaqMan probes	2 sets of N (175–256)	12 copies of DNA plasmid	Diagnosis of 2 biotypes of ABLV	The 10-fold more sensitive than RT-nPCR	[67]
Hughes <i>et al.</i> (2004)	TaqMan probes	6 sets of N (278–352, 943–1013, 1226–1296, 1189–1266, 1188–1244, 1169–1246)	10 ^{5.6} dilution of the stock RNA solution	Detection of rabies virus in clinical samples and analysis of effect by the sequence divergence	Mismatches between primer and probe sequences affect amplification efficiency. Lower sensitivity than RT-nPCR	[56]
Shankar <i>et al.</i> (2004)	TaqMan probes	N (73–194)	NA	Evaluation of selected tissues for evidence of infection	Lower sensitivity than hnPCR	[71]
Wakeley <i>et al.</i> (2005)	TaqMan probes	N (55–165)	1.0 molecule of clone CVS N gene	Detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5 and 6	The complexity of the assay was reduced by using different fluorophores labeled probes. 100-fold more sensitive than RT-hnPCR was achieved	[46]
Foord <i>et al.</i> (2006)	TaqMan probes	2 sets of N (191–264, 183–267)	10 genome equivalents per µl	Molecular diagnostic test for the detection of two biotypes of ABLV	Simultaneous detection of the internal control and ABLV template using differentially labelled probes in the same reaction. 100-fold more sensitive than RT-nPCR	[48]
Nagaraj <i>et al.</i> (2006)	SYBR Green I	N (66–201)	1043 copies of plasmid DNA	Comparison of the utility between RT-PCR and SYBR Green I real-time PCR in the human ante-mortem diagnosis	Real time PCR assay was more sensitive than conventional RT-PCR assay	[68]
Johnson <i>et al.</i> (2006)	SYBR Green I	N (1210–1431)	103 copies of amplicon	Investigation and quantification of viral load in bats	Organ distribution of viral RNA in bat was measured	[65]
Saengseesom <i>et al.</i> (2007)	SYBR Green I	N (57–179)	5.0 pg of fixed rabies virus	Evaluation of the utility of SYBR Green I real-time PCR in the ante-mortem diagnosis samples in dog	Using a first-round PCR product as the template for a real-time PCR	[41]
Wacharapluesadee <i>et al.</i> (2008)	TaqMan probe	N (1211–1300)	4.0 copies absolute RNA per reaction	Development and evaluation of protocol using designed primers and probe set based on nationwide rabies genetic sequence data	Four mismatches between probe and binding site resulted in a failure in detection	[53]
Orlowska <i>et al.</i> (2008)	TaqMan probes	gt1 N (67–178) gt5 N (206–308)	0.1 TCID ₅₀ /ml	Comparison of RT-hnPCR and real-time PCR in the detection of rabies virus infection in bats and terrestrial animals	The sensitivity of RT-hnPCR assay was tenfold lower than real-time PCR	[70]
Nadin-Davis <i>et al.</i> (2009)	TaqMan probes	3 sets of N (55–165, 630–781, 846–1020)	0.01 TCID ₅₀ of standard stock virus	Detection of broad range of genotype 1 lyssaviruses with three real-time assays	Human ante-mortem diagnosis, 100–1000-times more sensitive than RT-nPCR	[39]

*Nucleotide numbers refer to the Pasteur virus strain.

ABLV: Australian bat lyssavirus; gt: Genotype; NA: Not available; RT-hnPCR: Reverse-transcription heminested PCR; RT-nPCR: Reverse-transcription nested PCR; RT-PCR: Reverse-transcription PCR.

of detection than visualization by gel electrophoresis are employed by hybridization of the amplicon to rabies specific oligonucleotide/DNA probes. This is done by either transfer of the product to a membrane, known as Southern blot hybridization [62,63] or by an ELISA-based method [64]. Southern blot hybridization was used for confirmation of RT-PCR products from an Ethiopian wolf brain specimen which was previously designated as rabies negative by both DFA and MIT [24]. RT-PCR and ELISA was up to 100-fold more sensitive than Southern blot hybridization, detecting 0.00002 TCID₅₀/ml of a genotype 1 [64]. The amplified product can also be confirmed by restriction endonuclease analysis [60] or by nucleotide sequencing [11,49]. For lyssavirus genotype identification, sequencing remains the best method.

Real-time PCR

Real-time PCR technology is based on the detection and quantitation of a fluorescent reporter, which increases in direct proportion to the amount of PCR product in a single reaction. The higher the starting copy number of the nucleic acid target, the sooner a significant increase in fluorescence is observed. Fluorescent chemistries commonly used include nonspecific compounds, such as the DNA intercalating dyes SYBR Green or sequence-specific oligoprobes that carry a donor and quencher fluorophore. These technologies also offer other advantages over conventional RT-PCR, including faster assay time (2–4 h compared with 12–20 h for conventional RT-PCR and DNA sequencing), the reduced risk of contamination due to the closed tube system (lack of post PCR manipulation of amplified products) and the ability to amplify and detect a number of different targets simultaneously. TABLE 3 summarizes the main points of the real-time PCR assay developed for detection of rabies virus.

SYBR green real-time PCR was developed to quantify the European bat lyssavirus type 2 RNA load within bat organs [65]. High levels of genomic RNA were found in the brain and were also detectable in tongue, bladder and stomach. The quantity of rabies virus determined by the TaqMan real-time PCR assay correlated significantly with that estimated through virus isolation by the MIT [56]. In some cases, they may replace the need for time-consuming viral titrations as MIT [39]. TaqMan real-time PCR assay is a simple tool for assessing viral load in the brains of furious and paralytic dogs, for which much larger quantities were found in the former [66] and in biological samples of rabies patients who received treatment [14,39].

A case of furious rabies was treated at our hospital with coma induction, ribavirin and ketamine [14]. Results of NASBA and TaqMan-based quantitative assay, however, were not concordant on all specimens tested during 8 days of hospitalization (TABLE 4). NASBA showed higher sensitivity than TaqMan real-time PCR. This is similar to the previous comparison with RT-nPCR [40]. Three out of eight (days 1, 3 and 4) and one out of six (day 1) extracted hair follicle specimens tested positive by NASBA and TaqMan-based quantitative assay, respectively (TABLE 4). Saliva was negative for rabies viral RNA by NASBA on day 1 but was positive by both methods from days 2 to 8. Contrary to the report from a similar rabies patient, who was treated with the Milwaukee protocol and had reduction of rabies viral load in

saliva specimens over time [39], the viral load in our patient rose from 43.3 copies/ml on day 1 to 432,000 copies/ml on the day of this death (TABLE 4).

Real-time PCR methods have valuable potentials for human ante-mortem rabies diagnosis. One-step TaqMan real-time PCR assay was used for the detection of viral RNA in the 27 rabies suspected cases of which only three patients were rabid (i.e., eight samples from which seven were found positive) [39]. The TaqMan assay was also able to detect virus in the saliva and a nuchal skin biopsy of a patient with ABLV infection [67]. The SYBR Green real-time PCR assay was developed and applied for ante-mortem diagnosis of rabies using human saliva samples [68]. The higher sensitivity than with conventional PCR found in these real-time PCR assays (TABLE 3) and their ease of use suggest that they may be valuable for routine diagnosis of rabies infected cases.

TaqMan assay

TaqMan assay is one of the most popular chemistries employed by real-time PCR. It uses dual-labeled oligonucleotide probes that are labeled at the 5' end by a reporter dye and at the 3' end by a quencher that prevents emission of reporter dye until the two are in close proximity. The probe detection system represents an advantage on specificity over the conventional RT-PCR. There was a higher level of analytical specificity than with RT-PCR during routine analysis at the Australian Animal Health Laboratory of over 100 samples [48].

A rapid TaqMan real-time assay can offer both detection and discrimination of lyssavirus genotypes or biotypes. Eight different probes, comprising three genotype 1-specific probes and one

Table 4. Results of rabies testing in a patient treated with coma induction, ribavirin and ketamine.

Hospitalized day	Specimen	Results	
		NASBA	qRT-PCR [†] (copies/ml)
1	Saliva	Negative	ND
	Hair follicles	Positive	43.3
2	Saliva	Positive	6410
	Hair follicles	Negative	0
3	Saliva	Positive	102,000
	Hair follicles	Positive	0
4	Saliva	Positive	171,000
	Hair follicles	Positive	0
5	Saliva	Positive	75,900
	Hair follicles	Negative	0
6	Saliva	Positive	242,000
	Hair follicles	Negative	0
7	Saliva	Positive	67,400
	Hair follicles	Negative	ND
8	Saliva	Positive	432,000
	Hair follicles	Negative	ND

[†]qRT-PCR: Quantitative TaqMan real-time PCR (method used as described in [53]).
NASBA: Nucleic acid sequence-based amplification; ND: Not determined.

probe each for genotypes 2–6, were designed to discriminate lyssavirus genotype 1–6 [69]. In another report, three distinct probes with different reporter dyes were designed to distinguish between genotypes 1, 5 and 6 in one reaction tube [46]. Two biotypes of ABLV from flying foxes and insectivorous bats could be detected and discriminated by two distinct TaqMan primer and probe sets [48,67].

The sensitivity of the real-time assays, either with TaqMan or SYBR Green, is often comparable with or even better than conventional RT-PCR or nested PCR [39,46,48,67,68]. The TaqMan-based assay was 1000-fold more sensitive than traditional RT-nPCR in raccoon rabies viral standard stock [39]. One-step TaqMan RT-PCR was ten-fold more sensitive than the RT-hnPCR and the limit of detection of rabies virus was 0.1 and 10 TCID₅₀/ml, respectively [70]. Heminested PCR was more sensitive than the primary TaqMan real-time PCR that using cDNA as template [71]. However, comparable results were shown when the primary PCR amplicons were used as templates in the TaqMan real-time PCR.

SYBR Green assay

The products of SYBR Green-based real-time PCR can be detected by a DNA-intercalating dye (SYBR Green), which detects all double stranded DNA products within a reaction. PCR product confirmation can be achieved with nonspecific fluorescent dyes by performing melting (denaturation) curve analysis at the completion of the amplification. SYBR Green detection chemistry is preferable when more variability of probe-target binding sites is presented. SYBR Green real-time PCR assay has been reported for ante-mortem diagnosis in humans with 87.5% (21/24 patients) sensitivity in saliva [68]. Its sensitivity was higher than in conventional nested PCR (75 vs 37%). The SYBR Green real-time PCR assay has potential for detection of rabies virus in samples from live rabies-suspected dogs. In this study, 13 out of 15 dogs (87%) had positive saliva and four out of 15 had positive CSF by SYBR Green assay when primary PCR product was used as the template [41]. However, the negative result on ante-mortem specimens could not be used to rule out rabies due to the intermittent shedding on these human and animal specimens.

Isothermal amplification

Nucleic acid sequence-based amplification

Nucleic acid-amplification tests other than PCR have been developed for diagnostic purposes. NASBA is an enzymatic amplification process that is able to amplify under isothermal conditions. The three enzymes involved in the amplification reaction are avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, *E. coli* ribonuclease H and T7 RNA polymerase; each acting continuously on its appropriate substrate(s), for amplification of sense or anti-sense target RNA [72]. The specificity of the reaction is determined by two oligonucleotide primers that are specific to the RNA target. One of these contains a 5'-terminal T7 RNA polymerase promoter sequence (primer 1) in addition to a stretch of nucleotides that is complementary to a sequence on the target RNA. The second primer (primer 2) encompasses a short sequence that is identical to a segment of the target and is located

upstream of the region where the T7 promoter containing oligonucleotide can anneal. The NASBA reaction continues in a self-sustained manner under isothermal conditions, thus achieving dramatic amplification in a short period of time. Amplification of approximately 10⁶–10⁹-fold can be obtained within 90 min. The products of NASBA are single-stranded RNA, and can be applied to detection formats that use probe hybridization without any denaturation step. The RNA products can be detected specifically by a chemiluminescent probe using an electrochemiluminescence reader, provided that a non-related sequence of primer 2 is recognized by a reporter probe. This method showed 100-fold higher sensitivity over RT-nPCR and the whole process, including automated extraction and isothermal amplification, and detection can be completed within 4 h [40]. NASBA has been used to detect rabies virus RNA in saliva, CSF and urine of human rabies patients [35,37,40]. A real-time NASBA technique has recently been developed; however, this has not yet been applied in the detection of rabies.

RT-loop-mediated isothermal amplification

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a one-step amplification reaction that amplifies a target DNA sequence with high sensitivity and specificity under isothermal conditions [73]. The principle is based on strand displacement by *Bst* polymerase and formation of a stem-loop structure by four specifically designed primers that recognize six distinct regions on the target DNA at a constant temperature (~65°C). It provides high amplification efficiency, with DNA being amplified 10⁹–10¹⁰ times in 15–60 min. Because of its high specificity, the presence of amplified product can indicate the presence of the target gene. The one-step RT-LAMP method for detection of rabies has been developed based on using five specific primers, including two outer primers, one loop primer and two inner primers [74]. It can detect 10³ copies of synthetic viral RNA and has demonstrated ten- to 100-fold higher sensitivity than conventional RT-PCR. The specificity of the RT-LAMP products can be confirmed by *Rsa*I restriction enzyme. The primer set designed for detection of fixed CVS-11 strain could not amplify the rabies virus from the Philippines. In total, 24 nucleotide differences between primer set and target were found [74]. The obstacle of using RT-LAMP for widespread rabies diagnosis is that designing a primer set that can be used for the amplification of many rabies virus strains originating in the different region, requires several primers that target six different regions.

Microarray analysis

Resequencing technology using microarrays is very promising for bacterial and viral pathogen detection and identification [75,76]. It can be used for detection of rabies virus genome in complex mixtures of encephalitis pathogens in the presence of clinically background DNA [76]. Whole-transcriptome amplification (WTA), the modified whole-genome amplification, is applicable for cDNA amplification of a whole range of RNA virus genomes, prior to the resequencing microarray step [77]. Based on this technique, Vesiculovirus and Lyssavirus, which belong to phylogenetically

distinct genera, were identified with a call rate of 96.8 and 73.6%, respectively. The presence of eukaryotic nucleic acids did not prevent the amplification using WTA or the downstream identification of the pathogen on DNA microarrays. WTA provides considerably better sensitivity and accuracy of detection compared with random RT-PCR. DNA microarray-based assays for simultaneous detection and genotyping of all seven lyssaviruses, including Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, and identification of new divergent isolates have been developed [78]. Lyssavirus RNA was converted to cDNA and amplified in a random PCR, labeled and hybridized to probes on the microarray chip before being statistically analyzed. The lyssavirus/pestivirus chip correctly identified and distinguished the seven lyssavirus genotypes using an array containing 624 70-mer probes. The probes targeted a 405-bp region of the relatively conserved *N* gene (nucleotides 71–475). This new molecular tool for detection of rabies virus is beyond the capacity of the laboratories in most rabies-endemic countries of Asia and Africa and may not be appropriate for use as a diagnostic method at present.

Expert commentary

Proper management of a suspected patient with rabies virus requires rapid and accurate diagnosis. The appropriate ante-mortem diagnostic methods should have high sensitivity that is sufficient for early detection of a very low load of rabies viral RNA in biological samples. NAT(s) can be performed within hours and therefore serve this purpose. They have emerged as an adjunct to other tests or even as a sole procedure in experienced facilities for post- and ante-mortem diagnosis. The virus may be intermittently shed or present at very low levels in biological fluids, peripheral nerves and tissues other than brain. For this reason, NAT methods are not recommended as the principal diagnostic tool for animal rabies. Factors that may influence the quantity and quality of viral RNA are the stage of rabies infection, type of sample available for testing or proper handling of samples. RNA extraction control systems have been used for control of the RNA integrity to avoid false-negative results in each individual tube. These may be due to handling errors, the presence of enzyme inhibitors or viral RNA degradation. The quality and quantity of viral RNA can affect the efficiency of primer binding and amplification. Direct comparison of the sensitivity of the various RT-PCR, RT-nPCR, RT-hnPCR and real-time PCR assays for rabies described in the literature is difficult due to the use of different reference standards. Future comparison of these methods with the same proficiency control

tests would be helpful in the standardization of this technology especially in terms of quantification. A major pitfall of NAT is the ease by which sample cross-contamination can occur, especially in nested PCR. Standard precautions have to be taken seriously to avoid carryover contamination in all NAT process. The positive conventional PCR products should be sequenced to confirm the origin of the virus and to rule out possible contamination. Validations of the procedures using an array of local virus strains, unlike the laboratory virus strain, have to be performed regularly. Inter-laboratory collaboration and test standardization will allow for a better understanding of global rabies epidemiology.

Five-year view

The molecular diagnosis of rabies virus based on nucleic acid-amplification methods 5 years ago was focused on developing timely and sensitive ante-mortem diagnosis in humans. The recent technology of real-time PCR provides a result with better sensitivity and can shorten the time in making a diagnosis. More generic primer sets have also been developed to detect worldwide diversities of rabies viruses, among which some can be used to distinguish different genotypes of lyssaviruses. Several biological samples, such as skin biopsy with hair follicles, extracted hair follicles and urine, serve as alternate sources for rabies viral RNA detection. Allying sequence-independent amplification methods to microarray, simultaneously aids detection and discrimination of lyssaviruses at the genotypic level in biological samples. This may form the basis of a diagnostic biochip. In the future, technologies, such as micro-spheres, microfluidics and nanotube microarray, might provide additional advantages over conventional glass microarray platforms in terms of sensitivity and processing speed. Increasing trends in the development and evaluation of NATs should promote better recognition of the rabies problem and its threat to the public.

Acknowledgements

We are grateful for the critical review by Henry Wilde.

Financial & competing interests disclosure

This review was supported by grants from the Thailand Research Fund (DBG5180026) and the Thai Red Cross Society, Thailand. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Key issues

- Modern molecular techniques for diagnosis of rabies have recently been developed with promising results. They offer advantages in both post- and ante-mortem diagnosis.
- An earlier confirmation of diagnosis leads to better clinical care of humans and avoids contamination of hospital attendants.
- Good sample collection and preparation can increase success of molecular diagnosis.
- Discrimination of the virus based on real-time or multiplex PCR allows the obtainment of a diagnosis and strain differentiation in the same reaction.
- Nucleic acid-amplification tests can be used as an adjunct to direct fluorescence antibody testing, when unexpected or unusual fluorescent staining patterns are observed.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

- 1 Knobel DL, Cleaveland S, Coleman PG *et al.* Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull. World Health Organ.* 83(5), 360–368 (2005).
- 2 Dodet B, Adjougou EV, Aguemou AR *et al.* Fighting rabies in Africa: the Africa Rabies Expert Bureau (AfroREB). *Vaccine* 26(50), 6295–6298 (2008).
- 3 Dodet B. Preventing the incurable: Asian rabies experts advocate rabies control. *Vaccine* 24(16), 3045–3049 (2006).
- 4 Hemachudha T, Wacharapluesadee S, Laothamatas J, Wilde H. Rabies. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 6(6), 460–468 (2006).
- 5 Mallewa M, Fooks AR, Banda D *et al.* Rabies encephalitis in malaria-endemic area, Malawi, Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 13(1), 136–139 (2007).
- 6 Hemachudha T, Wacharapluesadee S, Mitrabhakdi E, Wilde H, Morimoto K, Lewis RA. Pathophysiology of human paralytic rabies. *J. Neurovirol.* 11(1), 93–100 (2005).
- 7 Hemachudha T, Laothamatas J, Rupprecht CE. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Neurol.* 1(2), 101–109 (2002).
- 8 WHO. WHO expert consultation on rabies. *WHO Technical Report Series* 931. (2005).
- 9 Lembo T, Niezgodna M, Velasco-Villa A, Cleaveland S, Ernest E, Rupprecht CE. Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. *Emerg. Infect. Dis.* 12(2), 310–313 (2006).
- 10 Xu G, Weber P, Hu Q *et al.* A simple sandwich ELISA (WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies. *Biologicals* 35(4), 297–302 (2007).
- 11 Bordignon J, Brasil-Dos-Anjos G, Bueno CR *et al.* Detection and characterization of rabies virus in southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. *Arch. Virol.* 150(4), 695–708 (2005).
- 12 Franka R, Svrcek S, Madar M *et al.* Quantification of the effectiveness of laboratory diagnostics of rabies using classical and molecular-genetic methods. *Vet. Med-Czech.* 49(7), 259–267 (2004).
- 13 Kietdumrongwong P, Hemachudha T. Pneumomediastinum as initial presentation of paralytic rabies: a case report. *BMC Infect. Dis.* 5, 92 (2005).
- 14 Hemachudha T, Sunsaneewitayakul B, Desudchit T *et al.* Failure of therapeutic coma and ketamine for therapy of human rabies. *J. Neurovirol.* 12(5), 407–409 (2006).
- 15 Willoughby RE Jr, Tieves KS, Hoffman GM *et al.* Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J. Med.* 352(24), 2508–2514 (2005).
- 16 Wilde H, Hemachudha T, Jackson AC. Viewpoint: management of human rabies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102(10), 979–982 (2008).
- 17 van Thiel PP, de Bie RM, Eftimov F *et al.* Fatal human rabies due to Duvenhage virus from a bat in Kenya: failure of treatment with coma-induction, ketamine, and antiviral drugs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3(7), e428 (2009).
- 18 Hemachudha T, Wilde H. Survival after treatment of rabies. *N. Engl. J. Med.* 353(10), 1068–1069 (2005).
- 19 Bronnert J, Wilde H, Tepsmethanon V, Lumlertdacha B, Hemachudha T. Organ transplantations and rabies transmission. *J. Travel Med.* 14(3), 177–180 (2007).
- 20 Srinivasan A, Burton EC, Kuehnert MJ *et al.* Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 352(11), 1103–1111 (2005).
- 21 Trimarchi C, Nadin-Davis S. Diagnosis evaluation. In: *Rabies (2nd Edition)*. Jackson AC, Wunner WH (Eds). Academic Press, NY, USA 201–258 (2007).
- 22 Tong TR, Leung KM, Lee KC, Lam AW. Trucut needle biopsy through superior orbital fissure for the diagnosis of rabies. *Lancet* 354(9196), 2137–2138 (1999).
- 23 Sow PS, Diop BM, Ndour CTY *et al.* Occipital cerebral aspiration ponction: technical procedure to take a brain specimen for postmortem diagnosis of human rabies in Dakar. *Med. Malad. Infect.* 26, 534–536 (1996).
- 24 Whitby JE, Johnstone P, Sillero-Zubiri C. Rabies virus in the decomposed brain of an Ethiopian wolf detected by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Wildl. Dis.* 33(4), 912–915 (1997).
- 25 Kamolvarin N, Tirawatnpong T, Rattanasiamoke R, Tirawatnpong S, Panpanich T, Hemachudha T. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. *J. Infect. Dis.* 167(1), 207–210 (1993).
- 26 Heaton PR, Johnstone P, McElhinney LM, Cowley R, O'Sullivan E, Whitby JE. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.* 35(11), 2762–2766 (1997).
- 27 Araujo DB, Langoni H, Almeida MF, Megid J. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. *BMC Res. Notes* 1, 17 (2008).
- Describes the sensitivity of reverse-transcription PCR (RT-PCR) and RT-heminested-PCR (RT-hnPCR) compared with direct fluorescence antibody (DFA) and mouse inoculation test (MIT) in stored and decomposed samples.
- 28 David D, Yakobson B, Rotenberg D, Dveres N, Davidson I, Stram Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Vet. Microbiol.* 87(2), 111–118 (2002).
- 29 Rojas Anaya E, Loza-Rubio E, Banda Ruiz VM, Hernandez Baumgarten E. Use of reverse transcription-polymerase chain reaction to determine the stability of rabies virus genome in brains kept at room temperature. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18(1), 98–101 (2006).
- 30 Wacharapluesadee S, Phumesin P, Lumlertdacha B, Hemachudha T. Diagnosis of rabies by use of brain tissue dried on filter paper. *Clin. Infect. Dis.* 36(5), 674–675 (2003).
- 31 Picard-Meyer E, Barrat J, Cliquet F. Use of filter paper (FTA) technology for sampling, recovery and molecular characterisation of rabies viruses. *J. Virol. Methods* 140(1–2), 174–182 (2007).
- 32 Wacharapluesadee S, Ruangvejvorachai P, Hemachudha T. A simple method for detection of rabies viral sequences in 16-year old archival brain specimens with one-week fixation in formalin. *J. Virol. Methods* 134(1–2), 267–271 (2006).
- 33 Crepin P, Audry L, Rotivel Y, Gacoin A, Caroff C, Bourhy H. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 36(4), 1117–1121 (1998).
- 34 Dacheux L, Reynes JM, Buchy P *et al.* A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin. Infect. Dis.* 47(11), 1410–1417 (2008).
- Large data set of biological samples serially collected intravital from patients suspected of having furious rabies and analyzed by RT-PCR.

- 35 Hemachudha T, Wacharapluesadee S. Antemortem diagnosis of human rabies. *Clin. Infect. Dis.* 39(7), 1085–1086 (2004).
- Summarizes the results of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) in correlation with the clinical expression and time after onset of the disease.
- 36 Elmgren LD, Nadin-Davis SA, Muldoon FT, Wandeler AI. Diagnosis and analysis of a recent case of human rabies in Canada. *Can. J. Infect. Dis.* 13(2), 129–133 (2002).
- 37 Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Urine samples for rabies RNA detection in the diagnosis of rabies in humans. *Clin. Infect. Dis.* 34(6), 874–875 (2002).
- First report of using urine sample as a source for detection of rabies viral RNA.
- 38 Smith J, McElhinney L, Parsons G *et al.* Case report: rapid ante-mortem diagnosis of a human case of rabies imported into the UK from the Philippines. *J. Med. Virol.* 69(1), 150–155 (2003).
- 39 Nadin-Davis SA, Sheen M, Wandeler AI. Development of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction methods for human rabies diagnosis. *J. Med. Virol.* 81(8), 1484–1497 (2009).
- Describes three primer and probe sets of TaqMan real-time that can detect a wide range of rabies virus strains.
- 40 Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies. *Lancet* 358(9285), 892–893 (2001).
- 41 Saengseesom W, Mitmoonpitak C, Kasempimolporn S, Sitprija V. Real-time PCR analysis of dog cerebrospinal fluid and saliva samples for ante-mortem diagnosis of rabies. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 38(1), 53–57 (2007).
- 42 Hemachudha T, Rupprecht C. Rabies. In: *Principle of Neurological Infectious Diseases*. Roos K (Ed.). McGraw Hill, NY, USA 151–174 (2004).
- 43 Trimarchi C, Smith J. Diagnostic evaluation. In: *Rabies*. Jackson A, Wunner W (Eds). Academic Press, NY, USA 307–349 (2002).
- 44 Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van-Dillen PME, Noordaa JVD. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503 (1990).
- 45 Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM *et al.* Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(1), 165–256 (2006).
- 46 Wakeley PR, Johnson N, McElhinney LM, Marston D, Sawyer J, Fooks AR. Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *J. Clin. Microbiol.* 43(6), 2786–2792 (2005).
- Describes the TaqMan assay using probes labeled with four different fluorophores, allowing the detection of genotype 1, 5 or 6 in a single reaction.
- 47 Smith J, McElhinney LM, Heaton PR, Black EM, Lowings JP. Assessment of template quality by the incorporation of an internal control into a RT-PCR for the detection of rabies and rabies-related viruses. *J. Virol. Methods* 84(2), 107–115 (2000).
- 48 Foord AJ, Heine HG, Pritchard LI *et al.* Molecular diagnosis of lyssaviruses and sequence comparison of Australian bat lyssavirus samples. *Aust. Vet. J.* 84(7), 225–230 (2006).
- 49 Echevarria JE, Avellon A, Juste J, Vera M, Ibanez C. Screening of active lyssavirus infection in wild bat populations by viral RNA detection on oropharyngeal swabs. *J. Clin. Microbiol.* 39(10), 3678–3683 (2001).
- 50 Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of the *Lyssavirus* genus. *Virology* 194(1), 70–81 (1993).
- 51 Kissi B, Tordo N, Bourhy H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology* 209(2), 526–537 (1995).
- 52 Delmas O, Holmes EC, Talbi C *et al.* Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. *PLoS ONE* 3(4), e2057 (2008).
- 53 Wacharapluesadee S, Sutipanya J, Damrongwatanapokin S *et al.* Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. *J. Virol. Methods* 151(2), 317–320 (2008).
- Describes the effect of target-probe mismatch(es) in TaqMan real-time PCR.
- 54 Sato G, Tanabe H, Shoji Y *et al.* Rapid discrimination of rabies viruses isolated from various host species in Brazil by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Clin. Virol.* 33(4), 267–273 (2005).
- 55 Macedo CI, Carnieli P Jr, Brandao PE *et al.* Diagnosis of human rabies cases by polymerase chain reaction of neck-skin samples. *Braz. J. Infect. Dis.* 10(5), 341–345 (2006).
- 56 Hughes GJ, Smith JS, Hanlon CA, Rupprecht CE. Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus RNA: influence of sequence variation and application to quantification of viral loads. *J. Clin. Microbiol.* 42(1), 299–306 (2004).
- Describes the effect of sequence mismatches between gene-specific oligonucleotides and the target sequence on the amplification step of TaqMan real-time PCR.
- 57 Kulonen K, Fekadu M, Whitfield S, Warner CK. An evaluation of immunofluorescence and PCR methods for detection of rabies in archival Carnoy-fixed, paraffin-embedded brain tissue. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 46(3), 151–155 (1999).
- 58 Vazquez-Moron S, Avellon A, Echevarria JE. RT-PCR for detection of all seven genotypes of *Lyssavirus* genus. *J. Virol. Methods* 135(2), 281–287 (2006).
- Describes the detection of all seven lyssaviruses by RT-PCR method.
- 59 Black EM, McElhinney LM, Lowings JP, Smith J, Johnstone P, Heaton PR. Molecular methods to distinguish between classical rabies and the rabies-related European bat lyssaviruses. *J. Virol. Methods* 87(1–2), 123–131 (2000).
- 60 Gupta PK, Singh RK, Sharma RN, Rao YU, Butchiah G. Preliminary report on a single-tube, non-interrupted reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of rabies virus in brain tissue. *Vet. Res. Commun.* 25(3), 239–247 (2001).
- 61 Ito M, Ito T, Sakai T *et al.* Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 63(12), 1309–1313 (2001).
- 62 Picard-Meyer E, Bruyere V, Barrat J, Tissot E, Barrat MJ, Cliquet F. Development of a hemi-nested RT-PCR method for the specific determination of European bat lyssavirus 1. Comparison with other rabies diagnostic methods. *Vaccine* 22(15–16), 1921–1929 (2004).
- 63 Heaton PR, McElhinney LM, Lowings JP. Detection and identification of rabies and rabies-related viruses using rapid-cycle PCR. *J. Virol. Methods* 81(1–2), 63–69 (1999).
- 64 Whitby JE, Heaton PR, Whitby HE, O'Sullivan E, Johnstone P. Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods* 69(1–2), 63–72 (1997).

- 65 Johnson N, Wakeley PR, Brookes SM, Fooks AR. European bat lyssavirus type 2 RNA in *Myotis daubentonii*. *Emerg. Infect. Dis.* 12(7), 1142–1144 (2006).
 - 66 Laothamatas J, Wacharapluesadee S, Lumlerdacha B *et al.* Furious and paralytic rabies of canine origin: neuroimaging with virological and cytokine studies. *J. Neurovirol.* 14(2), 119–129 (2008).
 - 67 Smith IL, Northill JA, Harrower BJ, Smith GA. Detection of Australian bat lyssavirus using a fluorogenic probe. *J. Clin. Virol.* 25(3), 285–291 (2002).
 - 68 Nagaraj T, Vasanth JP, Desai A, Kamat A, Madhusudana SN, Ravi V. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *J. Clin. Virol.* 36(1), 17–23 (2006).
 - 69 Black EM, Lowings JP, Smith J, Heaton PR, McElhinney LM. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. *J. Virol. Methods* 105(1), 25–35 (2002).
 - 70 Orłowska A, Smreczak M, Trêbas P, Zmudzinski JF. Comparison of real-time PCR and heminested RT-PCR methods in the detection of rabies virus infection in bats and terrestrial animals. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 52(3), 313–318 (2008).
 - 71 Shankar V, Bowen RA, Davis AD, Rupprecht CE, O'Shea T J. Rabies in a captive colony of big brown bats (*Eptesicus fuscus*). *J. Wildl. Dis.* 40(3), 403–413 (2004).
 - 72 Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350(6313), 91–92 (1991).
 - 73 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28(12), E63 (2000).
 - 74 Boldbaatar B, Inoue S, Sugiura N *et al.* Rapid detection of rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62(3), 187–191 (2009).
 - 75 Lin B, Blaney KM, Malanoski AP *et al.* Using a resequencing microarray as a multiple respiratory pathogen detection assay. *J. Clin. Microbiol.* 45(2), 443–452 (2007).
 - 76 Berthet N, Dickinson P, Filliol I *et al.* Massively parallel pathogen identification using high-density microarrays. *Microbial Biotechnol.* 1(1), 79–86 (2008).
 - 77 Berthet N, Reinhardt AK, Leclercq I *et al.* Phi29 polymerase based random amplification of viral RNA as an alternative to random RT-PCR. *BMC Mol. Biol.* 9, 77 (2008).
 - 78 Gurrall R, Dastjerdi A, Johnson N *et al.* Development of a DNA microarray for simultaneous detection and genotyping of lyssaviruses. *Virus Res.* 144(1–2), 202–208 (2009).
- Describes the detection and genotyping of lyssaviruses by microarray.

Website

- 101 Rabnet database
www.who.int/rabies/rabnet/en

Affiliations

- Supaporn Wacharapluesadee, PhD
 WHO Collaborating Centre for Research and Training on Viral Zoonoses, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand, 10330
 Tel.: +66 2256 4000
 Fax: +66 2652 3122
 spwa@hotmail.com
- Thiravat Hemachudha, MD
 WHO Collaborating Centre for Research and Training on Viral Zoonoses, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand, 10330
 Tel.: +66 2256 4000
 Fax: +66 2652 3122
 fmedthm@gmail.com



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet



Short communication

Comparative detection of rabies RNA by NASBA, real-time PCR and conventional PCR

Supaporn Wacharapluesadee^{a,*}, Patta Phumesin^a, Pornpun Supavonwong^a, Pakamat Khawplod^b, Nirun Intarut^c, Thiravat Hemachudha^a

^a WHO Collaborating Centre for Research and Training on Viral Zoonoses, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand

^b Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand

^c Chula Clinical Research Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

A B S T R A C T

Article history:

Received 3 November 2010

Received in revised form 20 April 2011

Accepted 4 May 2011

Available online 11 May 2011

Keywords:

Rabies virus

Nucleic acid sequence-based amplification

Real-time RT-PCR

RT-PCR

Diagnosis

Five methods for the RNA detection of rabies virus were directly compared in this study. These included conventional nucleic acid sequence-based amplification with electrochemiluminescence (NASBA-ECL) assay, reverse transcription (RT)-heminested (hn) polymerase chain reaction (PCR) and TaqMan real-time RT-PCR using protocols as described previously. The first two methods have been routinely utilised for ante-mortem diagnosis of human rabies in Thailand and other rabies-endemic Asian and African countries. In addition, two real-time NASBA assays based on the use of a NucliSens EasyQ analyser (NASBA-Beacon-EQ) and LightCycler real-time PCR machine (NASBA-Beacon-LC) were studied in parallel. All methods target the N gene, whereas the L gene is used for RT-hnPCR. Using serial dilutions of purified RNA from rabies-infected dog brain tissue to assess sensitivity, all five methods had comparable degrees of sensitivities of detection. However, both real-time NASBA assays had slightly lower sensitivities by 10-fold than the other three assays. This finding was also true (except for TaqMan real-time RT-PCR due to a mismatch between the target and probe sequences) when laboratory-adapted (challenge virus standard-11) virus was used in the assays. Testing on previously NASBA-ECL positive clinical samples from 10 rabies patients (saliva [6] and brain [4]) and 10 rabies-infected dog brain tissues, similar results were obtained among the five methods; real-time NASBA assays yielded false-negative results on 2 saliva samples. None of the assays showed positive results on cerebrospinal fluid specimens of 10 patients without rabies encephalitis. Due to the unavailability of the NASBA-ECL assay, the results show that TaqMan real-time RT-PCR and RT-hnPCR can be useful for ante- and post-mortem diagnosis of rabies.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Diagnosis of human rabies in living specimens using nucleic acid amplification tests is becoming a standard procedure. Although the direct fluorescent antibody (DFA) test on brain impression smears is the gold standard for rabies post-mortem diagnosis, it may yield a false negative result when the brain tissue starts to decompose, which can lead to omission of rabies post-exposure prophylaxis. Detection of rabies viral RNA can be used as an alternative or to confirm a DFA negative result, and it can be completed more rapidly with superior sensitivity than either the mouse inoculation or rabies tissue-culture infection test (Picard-Meyer et al., 2004). Diagnosis of rabies in living humans is important to prevent contamination of health personnel and individuals who have been in close contact with infected patients. Exposure to mucous membranes such as conjunctiva and to areas of broken skin may occur

during care of the patient, and rabies post-exposure prophylaxis is then required. The specimens for human ante-mortem testing such as saliva, urine and cerebrospinal fluid (CSF) cannot be processed by DFA so nucleic acid amplification tests are the method of choice (Wacharapluesadee and Hemachudha, 2001; Dacheux et al., 2008). This finding is also true in the case of skin biopsy tissue containing hair follicles, as immunohistochemical techniques on frozen sections may not be practical.

The sensitivity of diagnosing rabies using nucleic acid amplification tests may also depend on types of technology, target gene sequence of amplification and selection and amount of samples. Other factors that might have an influence on test sensitivity are the intermittent nature of viral shedding, the clinical type of disease (furious versus paralytic) and time after clinical onset at which the specimen is collected. Nucleic acid sequence-based amplification assay with electrochemiluminescence detection (NASBA-ECL) has been shown to be of greater sensitivity than reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in terms of the detection

* Corresponding author. Tel.: +66 2 256 4000x3561; fax: +66 2 652 3122.
E-mail address: spwa@hotmail.com (S. Wacharapluesadee).

limit (0.04 pg and 4.0 pg, respectively) (Wacharapluesadee and Hemachudha, 2001). TaqMan-based quantitative RT-PCR was 100–1000 times more sensitive than nested RT-PCR (0.01 and 100 of 50% tissue culture infective dose equivalent unit, respectively) (Nadin-Davis et al., 2009). These techniques target sequences in the nucleocapsid (N) gene. The RT-heminested PCR (RT-hnPCR) targeting the large (L) polymerase gene was demonstrated to be sensitive and reproducible for the detection of 6 species of lyssaviruses (Dacheux et al., 2008). In case of Rabies virus species (formerly genotype 1), the mean threshold for detection was 4.9 ± 6.1 fluorescence forming units.

Sources of specimens for nucleic acid amplification tests for ante-mortem rabies detection include saliva, CSF, extracted hair follicles, biopsied skin tissue at the nape of the neck containing hair follicles and urine. Sensitivity ranges from 39% to $\geq 98\%$. The results of data collected from 56 patients using the NASBA-ECL method revealed that this method was more sensitive when using saliva (47/62 specimens, 75.8%) compared to extracted hair follicles (13/26, 50%), CSF (13/30, 43%) and urine (16/41, 39%) (Wacharapluesadee and Hemachudha, 2010). The RT-hnPCR targeting the L gene exhibited the highest sensitivity ($\geq 98\%$) when performed on skin biopsy specimens (20 mm³ volume) regardless of time points after clinical onset (Dacheux et al., 2008).

The present study compared five molecular methods based on the amplification of N and L genes for the detection of rabies virus. RT-hnPCR (Dacheux et al., 2008) and NASBA-ECL (Wacharapluesadee and Hemachudha, 2001) are the methods used currently in Thailand and different other Asian and African countries. Some other methods included a one step TaqMan real-time RT-PCR (Wacharapluesadee et al., 2008) and molecular beacon-based real-time NASBA with a NucliSens EasyQ analyser (bioMérieux, Boxtel, The Netherlands). Both are being introduced to replace NASBA-ECL in Thailand. Molecular beacon-based real-time NASBA with a Light Cycler apparatus (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was also evaluated in this study. It is important to note that RT-hnPCR targets the L gene, whereas the remaining methods target the N gene.

NASBA is a single-step isothermal amplification technology that has been used to detect a number of RNA viruses. Amplified RNA products are detected by hybridisation using ECL-labelled probes. Rabies detection by NASBA-ECL was performed as described previously (Wacharapluesadee and Hemachudha, 2001). Briefly, 5 μ l of RNA extract was added directly to the primer mixture. A two-step incubation of 5 min at 65 °C and 5 min at 41 °C was performed before adding 5 μ l of enzyme mixture. The amplification was performed at 41 °C for 90 min. The amplification products were identified by ECL detection using the NucliSens Basic Kit detection module and the NucliSens Reader (bioMérieux).

Alternatively, RNA amplified by NASBA can be specifically detected in real time through the use of a molecular beacon probe included in the amplification reaction (Landry et al., 2005). Primers and molecular beacon probes for real-time NASBA (NASBA-Beacon) were based on the same nucleotide sequences as in the NASBA-ECL (Wacharapluesadee and Hemachudha, 2001). The molecular beacon probe consisted of the sequence 5'-CGATCGACTGTGCCCACTCTGATTGCTGAATCGATCG-3' with under-scored bases comprising the stem regions. The 5' end of the molecular beacon was labelled with reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) and the 3' end with the non-fluorescent quencher 4-(4-dimethylaminophenylazo)-benzoic acid (DABCYL). The amplification and simultaneous detection of NASBA-Beacon can be performed by using the NucliSens EasyQ analyser (bioMérieux) as recommended by the manufacturer or using other real-time PCR instruments, such as the glass capillary, PCR tube or plate-block format (Costa et al., 2008; Gore et al., 2003; Templeton et al., 2003; Lanciotti and Kerst, 2001). Two real-time NASBA assays

were employed in this study based on the use of a NucliSens EasyQ analyser (NASBA-Beacon-EQ) and LightCycler real-time PCR machine (NASBA-Beacon-LC).

The NASBA-Beacon-EQ reaction was performed using the NucliSens basic kit (bioMérieux). Each reaction mixture consisted of 0.2 μ M of each primer, 0.1 μ M of molecular beacon probe, 5 μ l of RNA template and 5 μ l of NASBA enzyme mixture (T7 RNA polymerase, avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, RNase H, bovine serum albumin) in a total volume of 20 μ l. The enzyme mixture was added after the rest of the reaction mixture was incubated at 65 °C for 2 min and at 41 °C for another 2 min. The results were analysed using the NucliSens Easy Q Analyser (bioMérieux). The development of fluorescence was monitored in closed tubes for 90 min at 41 °C according to the manufacturer's instructions.

The NASBA-Beacon-LC assay was performed using the NucliSens Basic Kit (bioMérieux) as described previously (Costa et al., 2008) with minor modifications. Briefly, the amplification mix consisted of 80 mM KCl solution, 0.2 μ M of primers and 0.1 μ M of the molecular beacon probe in the reagent premix buffer. For each amplification reaction, 5 μ l of extracted nucleic acid was added to the amplification mixture. Following a two-step incubation of 2 min at 65 °C and 2 min at 41 °C, 5 μ l of the enzyme mixture was added and incubated for an additional 2 min at 41 °C. The amplification and simultaneous detection were performed using a LightCycler instrument (version 2.0; Roche Diagnostics). The 20 μ l of reaction mixture was incubated at 41 °C for 90 cycles with 1 min acquisition at a wavelength of 530 nm.

The primer sets used in RT-hnPCR were described previously (Dacheux et al., 2008). RT and hnPCR conditions were slightly modified as follows. RT of RNA to complementary DNA (cDNA) was performed with the ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA). Four microliters of extracted RNA were incubated at 70 °C for 5 min with 1 μ l of random primers (500 μ g/ml), cooled on ice and added to 15 μ l of RT reaction mix. After incubation at 42 °C for 60 min, 2 μ l of cDNA was added to the PCR reaction in a 25 μ l total volume reaction mixture containing 2 mM magnesium chloride, 200 μ M of each nucleotide triphosphate, 1.25 U of Taq polymerase (GoTaq[®], Promega) and 0.6 μ M of primer PVO5m (5'-ATGACAGACAAYTTGAACAA-3') and primer PVO9 (5'-TGACCATTCCARCARGTNG-3') for the first round of PCR and primers PVO5m and PVO8 (5'-GGTCTGATCTRTCWGARYAATA-3') in the second round of PCR. The thermal profile in both PCR rounds was in the following order: 3 min denaturation at 94 °C and 35 cycles of 30 s of denaturation at 94 °C, 45 s of annealing at 56 °C and 45 s of elongation at 72 °C. Elongation was extended for 3 additional min in the last cycle. The second round PCR product of 249 base pairs was analysed on a 2.0% agarose gel containing ethidium bromide.

One step TaqMan real-time RT-PCR for rabies virus detection was performed as described previously (Wacharapluesadee et al., 2008). In brief, TaqMan PCR reactions were performed in 20 μ l of PCR buffer containing 10 μ l of 2 $\times$ QuantiTectTM Probe RT-PCR Master Mix (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), 20 pmol each of forward and reverse primers, 4 pmol of probe and 5 μ l of extracted RNA. The reaction was performed in a 20 μ l glass capillary on the LightCycler real-time PCR version 2.0 (Roche Diagnostics). The thermal profile was set for 1 cycle at 50 °C for 20 min, 1 cycle at 95 °C for 15 min, 45 cycles of 95 °C for 0 min [a denature temperature of PCR profile at 95 °C for 0 s, according to the manufacturer's instructions (QuantiTectTM Probe RT-PCR Kit, Qiagen)] and annealing/extension at 60 °C for 1 min.

In this study, rabies viral RNA samples were obtained from naturally infected dog brain tissue and laboratory adapted challenge virus standard (CVS)-11. For determination of assay sensitivity, 10-fold serial dilutions of RNA from CVS-11 and street viruses

Table 1
Comparison of NASBA and PCR detection systems for detection of rabies viruses.

Sample (dilution)	NASBA-ECL ^a	NASBA-Beacon-EQ ^b	NASBA-Beacon-LC ^c	TaqMan RT-PCR ^d	RT-hnPCR ^e
CVS (10 ⁻⁴) ^f	+/+/+	+/+/+	+/+/+	ND	+/+/+
CVS (10 ⁻⁵)	+/+/+	+/+/+	+/+/+	ND	+/+/+
CVS (10 ⁻⁶)	+/+/+	-/-/-	-/-/-	ND	+/+/+
CVS (10 ⁻⁷)	+/-/-	-/-/-	-/-/-	ND	-/-/-
CVS (10 ⁻⁸)	-/-/-	-/-/-	-/-/-	ND	-/-/-
D4 (10 ⁻³) ^g	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+
D4 (10 ⁻⁴)	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+
D4 (10 ⁻⁵)	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+
D4 (10 ⁻⁶)	+/+/+	-/+/-	-/-/-	+/+/+	+/-/+
D4 (10 ⁻⁷)	+/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-
D4 (10 ⁻⁸)	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-

ND = not done due to mismatch between probe and target.

^a NASBA assay with electrochemiluminescence detection.

^b Real-time molecular beacon NASBA performed with the NucliSens EasyQ analyser.

^c Real-time molecular beacon NASBA performed with the LightCycler real-time PCR machine.

^d One step TaqMan real-time RT-PCR.

^e RT-heminested PCR.

^f RNA concentration = 0.018 ng/μl.

^g RNA concentration = 0.374 ng/μl.

were tested. RNA extracts of these samples were tested in triplicate in three different runs. The original stock titer of the CVS-11 rabies virus was 10⁻⁴ of the 50% tissue culture infective dose. The High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics) was used to extract RNA from 50 μl of CVS-11 virus stock according to the manufacturer's instructions. The concentration of total RNA, as determined by OD (A260) measurement, was 180 ng/μl. The RNA samples were diluted serially with RNase-free water to dilutions of 10⁻⁴–10⁻⁸ and used for testing. The experiments were repeated using naturally rabies-infected dog brain, and all five methods were employed. Total RNA was extracted directly from dog brain tissue using an RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). The concentration of total RNA was 374 ng/μl. Serial dilutions of 10⁻³–10⁻⁸ were used (Table 1), and 5 μl of RNA template was used in each reaction. The RNA amount for each amplification reaction contained the same final concentration. For example, at a dilution of 10⁻⁴ of CVS-11 rabies RNA, the final RNA concentration per reaction was 0.0045 ng/μl. A volume of 5 μl of RNA template (0.018 ng/μl) contained 0.09 ng of total RNA in one NASBA or real-time PCR reaction (20 μl), while 2 μl of cDNA at a concentration of 0.05625 ng/μl was added to a 25 μl reaction of RT-hnPCR.

The results showed a similar limit of detection pattern regardless of the rabies viral RNA source (Table 1). NASBA-ECL, TaqMan real-time RT-PCR and RT-hnPCR had equal limits of detection at 10⁻⁶ dilution of street rabies viral RNA (D4). In the NASBA system, the limit of detection of NASBA-ECL was 10-fold more sensitive than NASBA-Beacon-EQ and NASBA-Beacon-LC (dilution of 10⁻⁶ as compared to 10⁻⁵ and 10⁻⁵, respectively). A similar result was found when using CVS-11 as a target on NASBA-ECL and RT-hnPCR. TaqMan real-time RT-PCR was not included in this comparison due to a mismatch between target and probe sequences (Wacharapluesadee et al., 2008).

All five methods yielded negative results when performed on CSF samples of 10 patients with encephalitis including herpes simplex virus type 2 (2 samples), Japanese encephalitis virus (2 samples), cytomegalovirus (2 samples), varicella-zoster (2 samples) and Epstein-Barr viruses (2 samples) (data not shown). NASBA-ECL positive clinical samples from 10 patients (6 saliva and 4 brain samples) and 10 naturally rabies-infected dog brain samples were re-examined by the other four molecular methods. All 20 samples were positive by TaqMan real-time RT-PCR and RT-hnPCR assays. Real-time NASBA assays yielded false negative results on 2 saliva samples (data not shown).

This is the first time that detection of rabies virus in clinical specimens from patients and rabies-infected dogs were compared

among different assay systems in terms of their sensitivity by using the same RNA preparation. The NASBA assays used two formats for the detection of amplicons; end-point detection by post-amplification hybridisation with ECL probe or using real-time molecular beacon as probe. There was no statistically significant difference ($p = 1.00$, exact McNemar's test) in the sensitivity between NASBA-Beacon-EQ and -LC. Both real-time NASBA assays had slightly lower sensitivities than the NASBA-ECL. This finding was similar to previously published reports (Hibbitts et al., 2003; Landry et al., 2005). However, other reports have shown similar degrees of sensitivity between these methods (Loens et al., 2006; Yoo et al., 2007). The NASBA-ECL assay has been used as a routine technique for ante-mortem diagnosis of suspected rabies patients at King Chulalongkorn Memoria Hospital between 1998 and 2009 (Wacharapluesadee and Hemachudha, 2010). Of 50 furious rabies patients, the highest percent of positivity was found in saliva (45 [84.9%] of 53 specimens), followed by three other types of specimens; hair follicles, urine and CSF (13 [52%] of 25 specimens, 16 [44.4%] of 36 specimens and 11 [44%] of 25 specimens, respectively). This assay showed superior sensitivity to nested RT-PCR, which targeting the N gene, in ante-mortem specimens (Wacharapluesadee and Hemachudha, 2001). Because there was no alternative source of reagents that could be used, the real-time NASBA format using a molecular beacon probe was developed to replace the ECL system.

The RT-hnPCR assay targets conserved blocks in the L polymerase gene of rabies virus, and its sensitivity was comparable to those of other assays. This assay was developed for routine ante-mortem diagnosis in suspected rabies patients (Dacheux et al., 2008), and it has demonstrated high specificity (100%) and sensitivity (100%) as performed on skin biopsy specimens from 29 patients at hospital admission. It is not known whether the modified protocol in this study affected the test sensitivity of RT-hnPCR. Furthermore, this assay was not applied to skin biopsy samples in this study.

TaqMan real-time RT-PCR demonstrated a similar limit of detection to NASBA-ECL or the RT-hnPCR assay and had a slightly higher sensitivity than real-time NASBA assays ($p = 1.00$, exact McNemar's test). These results were concordant to other studies. For example, real-time RT-PCR and NASBA-ECL had an equal detection limit in detecting *Leishmania* parasites (van der Meide et al., 2008) or St. Louis encephalitis (Lanciotti and Kerst, 2001). However, discordant results could also be found. The NASBA-Beacon-LC assay demonstrated a higher level of sensitivity than TaqMan real-time RT-PCR for enterovirus detection (Costa et al., 2008). On the other hand,

real-time RT-PCR assays were 100–1000 times more sensitive than the nested PCR for rabies detection (Nadin-Davis et al., 2009).

The TaqMan real-time RT-PCR platform for the detection of the rabies virus is currently used in many laboratories. The quantifications of rabies virus by quantitative TaqMan real-time RT-PCR and mouse inoculation test showed a significant correlation (Hughes et al., 2004). In some instances, TaqMan real-time RT-PCR may replace the need for time-consuming viral isolation, such as mouse inoculation or rabies tissue-culture infection test. The method of quantitative real-time RT-PCR has been shown to be more sensitive than the rabies tissue-culture infection test, further suggesting that real-time RT-PCR may replace rabies tissue-culture infection test as a confirmatory assay (Panning et al., 2010).

The real-time RT-PCR assay is less than half as expensive as the NASBA-ECL assay and twice as rapid (van der Meide et al., 2008). For rabies amplification and detection, TaqMan real-time RT-PCR requires the shortest assay time of only 1.5 h, while NASBA-ECL, real-time NASBA and RT-hnPCR require 3.0 h, 2.0 h and 5.0 h, respectively. The NASBA assay includes an extensive time course between pre-amplification steps, and the number of handling steps per sample for RT-hnPCR was higher than the other four methods. Although this advantage may increase risk of PCR product carry over contamination, RT-hnPCR has been shown to be of the highest sensitivity and specificity when applied to clinical specimens from patients suspected of having rabies in multi-centre trials across continents (Dacheux et al., 2008). Such trials may be needed to verify the applicability of other assays in the diagnosis of human rabies in living specimens.

The RT-hnPCR method has been demonstrated to detect a wide range of lyssaviruses, including rabies virus, Lagos bat virus, Mokola virus, Duvenhage virus, European bat lyssavirus type 1 and Australian bat lyssavirus (Dacheux et al., 2008). The TaqMan real-time RT-PCR primers and probe set used in this study were designed based on the local (country) rabies nucleotide database; therefore, it cannot be employed for detection of a wide range of rabies virus strains. A real-time PCR system designed for detecting worldwide lyssaviruses or the use of multiple tests targeting two or more sequences may be the best option for rabies diagnosis with worldwide diversity or for viruses from different sources or geographic locations (Nadin-Davis et al., 2009; Wakeley et al., 2005). Ante-mortem diagnosis of human rabies using TaqMan real-time PCR targeting the highly conserved N gene (Hughes et al., 2004; Nadin-Davis et al., 2009; Wacharapluesadee et al., 2008) in conjunction with RT-hnPCR, which targets conserved blocks among the L gene (Dacheux et al., 2008), would likely ensure an accurate diagnosis.

It is noted that internal controls, such as β -actin mRNA, should be incorporated in the real-time PCR and RT-hnPCR systems (Nadin-Davis et al., 2009; Dacheux et al., 2008), particularly in ante-mortem rabies diagnosis in humans. However, the β -actin mRNA may show a faint or negative result in the absence of PCR inhibition for samples that contain very limited amounts of cellular materials, such as CSF. External synthesised control RNA adding during sample extraction or master mix preparation should be favoured in this case. The molecular protocols for rabies diagnosis on steps for sample collection and preparation, amplification and detection should be standardised across laboratories world-wide to promote accurate ante-mortem diagnosis in humans.

The reverse transcription loop-mediated isothermal amplification was developed for rabies detection from brain tissue samples. However, this method requires more universal primers that are applicable to a variety of rabies viruses from various regions (Boldbaatar et al., 2009). A DNA microarray-based assay is the new molecular tool for detection and genotyping 7 classical lyssaviruses (Gurrall et al., 2009). Overall, 8 out of the 11 species of lyssaviruses, including West Caucasian bat lyssaviruses, were detected by high-density resequencing microarray (Dacheux et al.,

2010). The sensitivity and specificity of this technique for detection and identification of lyssaviruses in clinical specimens are similar to conventional rabies diagnostic methods. Furthermore, this tool was shown to be able to detect novel rhabdoviruses. One such unclassified lyssavirus was tentatively named Dakar bat lyssavirus. The applicability of this new method in laboratories in rabies-endemic countries remains debatable due to the high cost of the machine and reagents.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund (DBG5180026), Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission HR1160A and the Thai Red Cross Society, Thailand. We also acknowledge the help from the Division of Research Affair, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in the preparation of this manuscript.

References

- Boldbaatar, B., Inoue, S., Sugiura, N., Noguchi, A., Orbina, J.R., Demetria, C., Miranda, M.E., Yamada, A., 2009. Rapid detection of rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62, 187–191.
- Costa, A.M., Lamb, D., Garland, S.M., Tabrizi, S.N., 2008. Evaluation of LightCycler as a platform for nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) in real-time detection of enteroviruses. *Curr. Microbiol.* 56, 80–83.
- Dacheux, L., Reynes, J.M., Buchy, P., Sivuth, O., Diop, B.M., Rousset, D., Rathat, C., Jolly, N., Dufourcq, J.B., Nareth, C., Diop, S., Lehle, C., Rajerison, R., Sadorge, C., Bourhy, H., 2008. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin. Infect. Dis.* 47, 1410–1417.
- Dacheux, L., Berthet, N., Dissard, G., Holmes, E.C., Delmas, O., Larrous, F., Guigon, G., Dickinson, P., Faye, O., Sall, A.A., Old, I.G., Kong, K., Kennedy, G.C., Manuguerra, J.C., Cole, S.T., Caro, V., Gessain, A., Bourhy, H., 2010. Application of broad-spectrum resequencing microarray for genotyping rhabdoviruses. *J. Virol.* 84, 9557–9574.
- Gore, H.M., Wakeman, C.A., Hull, R.M., McKillip, J.L., 2003. Real-time molecular beacon NASBA reveals hblC expression from *Bacillus* spp. in milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 386–390.
- Gurrall, R., Dastjerdi, A., Johnson, N., Nunez-Garcia, J., Grierson, S., Steinbach, F., Banks, M., 2009. Development of a DNA microarray for simultaneous detection and genotyping of lyssaviruses. *Virus Res.* 144, 202–208.
- Hibbitts, S., Rahman, A., John, R., Westmoreland, D., Fox, J.D., 2003. Development and evaluation of NucliSens basic kit NASBA for diagnosis of parainfluenza virus infection with 'end-point' and 'real-time' detection. *J. Virol. Methods* 108, 145–155.
- Hughes, G.J., Smith, J.S., Hanlon, C.A., Rupprecht, C.E., 2004. Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus RNA: influence of sequence variation and application to quantification of viral loads. *J. Clin. Microbiol.* 42, 299–306.
- Lancioti, R.S., Kerst, A.J., 2001. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4506–4513.
- Landry, M.L., Garner, R., Ferguson, D., 2005. Real-time nucleic acid sequence-based amplification using molecular beacons for detection of enterovirus RNA in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3136–3139.
- Loens, K., Beck, T., Goossens, H., Ursi, D., Overdijk, M., Sillekens, P., Ieven, M., 2006. Development of conventional and real-time nucleic acid sequence-based amplification assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1241–1244.
- Nadin-Davis, S.A., Sheen, M., Wandeler, A.I., 2009. Development of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction methods for human rabies diagnosis. *J. Med. Virol.* 81, 1484–1497.
- Panning, M., Baumgarte, S., Pfefferle, S., Maier, T., Martens, A., Drosten, C., 2010. Comparative analysis of rabies virus reverse transcription-PCR and virus isolation using samples from a patient infected with rabies virus. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2960–2962.
- Picard-Meyer, E., Bruyere, V., Barrat, J., Tissot, E., Barrat, M.J., Cliquet, F., 2004. Development of a hemi-nested RT-PCR method for the specific determination of European Bat Lyssavirus 1. Comparison with other rabies diagnostic methods. *Vaccine* 22, 1921–1929.
- Templeton, K.E., Scheltinga, S.A., Graffelman, A.W., Van Schie, J.M., Crielaard, J.W., Sillekens, P., Van Den Broek, P.J., Goossens, H., Beersma, M.F., Claas, E.C., 2003. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4366–4371.
- van der Meide, W., Guerra, J., Schoone, G., Farenhorst, M., Coelho, L., Faber, W., Peekel, I., Schallig, H., 2008. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. *J. Clin. Microbiol.* 46, 73–78.

- Wacharapluesadee, S., Hemachudha, T., 2001. Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies. *Lancet* 358, 892–893.
- Wacharapluesadee, S., Sutipanya, J., Damrongwatanapokin, S., Phumesin, P., Channanpood, P., Leowijuk, C., Hemachudha, T., 2008. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. *J. Virol. Methods* 151, 317–320.
- Wacharapluesadee, S., Hemachudha, T., 2010. Ante- and post-mortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 10, 207–218.
- Wakeley, P.R., Johnson, N., McElhinney, L.M., Marston, D., Sawyer, J., Fooks, A.R., 2005. Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2786–2792.
- Yoo, J.H., Choi, S.M., Lee, D.G., Park, S.H., Choi, J.H., Kwon, E.Y., Shin, W.S., 2007. Comparison of the real-time nucleic acid sequence-based amplification (RTi-NASBA) with conventional NASBA, and galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Korean Med. Sci.* 22, 672–676.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Virological Methods
Manuscript Draft

Manuscript Number: VIRMET-D-11-00313

Title: Detection of rabies viral RNA from non-neural specimens of rabies infected dogs by Taqman real-time RT-PCR

Article Type: Short Communication

Keywords: Rabies virus, Real-time RT-PCR, Diagnosis, Post-mortem

Corresponding Author: Dr. Supaporn Wacharapluesadee, PhD

Corresponding Author's Institution:

First Author: Supaporn Wacharapluesadee, PhD

Order of Authors: Supaporn Wacharapluesadee, PhD; Veera Tepsumethanon, DVM; Pornpun Supavonwong, MSc; Thongchai Kaewpom, BSc; Nirun Intarut, MSc; Thiravat Hemachudha, MD

Suggested Reviewers: Francois-Xavier Meslin
meslinf@who.int

Deborah J Briggs
briggs@vet.ksu.edu

Henry Wilde
wildehenry@yahoo.com

Detection of rabies viral RNA from non-neural specimens of rabies infected dogs
by Taqman real-time RT-PCR

Supaporn Wacharapluesadee ^{a,*}, Veera Tepsumethanon^b, Pornpun Supavonwong ^a, Thongchai
Kaewpom ^a, Nirun Intarut ^c, Thiravat Hemachudha ^a

*^a WHO Collaborating Centre for Research and Training on Viral Zoonoses, Faculty of Medicine,
Chulalongkorn University and King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, ^b
Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society, ^c Chula Clinical Research Center,
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

* Corresponding author

Supaporn Wacharapluesadee, PhD

WHO Collaborating Centre for Research and Training on Viral Zoonoses,

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and King Chulalongkorn Memorial Hospital,

Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand, 10330.

Tel: (662) 256 4000 ext: 3561

Fax: (662) 652 3122

E-mail address: spwa@hotmail.com

Abstract

In order to analyze the burden of rabies in developing countries, a reliable and accurate diagnostic test for animal brain examination is needed. Currently, head and carcass submissions to rabies diagnostic units have been declining. A method of obtaining tissues from different regions of the brain is even more difficult, and direct fluorescent antibody examinations may fail if the samples become liquefied under hot climates. The centrifugal spread of rabies virus to peripheral non-nervous tissues starts early in the pre-clinical phase. It has been shown that saliva and biopsy skin tissue at the neck containing hair follicles can be used in ante-mortem diagnosis of rabies in humans. Obtaining saliva, whisker or hair follicles from dogs' heads is easy, practical, and can be done without special equipment. The objective of this study was to determine whether these specimens can be sources for rabies viral RNA detection. Extracted RNAs from these specimens were tested using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) method. The sensitivity of TaqMan real-time RT-PCR on saliva, extracted whisker and hair follicles from confirmed rabies infected dogs were 83.3% (55/66), 81.8% (54/66) and 66.7% (44/66) with no false positive results. The negative predictive values were 76.0, 74.4 and 61.4%, respectively. Although the rate of positivity when combining 3 non-neural specimen types was increased to 86.4 %, it was not sufficient in aiding the clinical decision of whether to administer rabies postexposure prophylaxis. However, these specimens may serve to enhance epidemiological surveillance; such data should be helpful in rabies control planning.

Keywords: Rabies virus, Real-time RT-PCR, Diagnosis, Post-mortem

Rabies remains an important zoonotic disease. Laboratory examination is mandatory for prevention and control of the disease. A reliable, accurate and rapid diagnostic test is required to determine whether the bitten individual should receive rabies post exposure prophylaxis (PEP). Microscopic examination of brain tissue stained with direct fluorescent antibody (DFA) is the gold standard for postmortem diagnosis as recommended by World Health Organization (WHO) (WHO, 2005). A previous study of DFA test showed that examination of 2 brainstem and 1 hippocampus samples yielded accurate results in 8,987 canine, feline and human brain samples (Tepsumethanon et al., 1997). However, the brain collection process involved the opening the skull of dead animals. Furthermore, the brain tissue was required to be intact, as decomposed specimens gave unreliable result (Kamolvarin et al., 1993). This has been a major limitation for rabies endemic countries, especially those in tropical climates. Detecting rabies RNA, however, was still possible in brain material left at room temperature for longer than 72 hours (Heaton et al., 1997; Kamolvarin et al., 1993). It has been shown that specimens such as saliva, cerebrospinal fluid (CSF), urine, extracted hair follicles and skin biopsy tissue containing hair follicles are also reliable sources for rabies viral RNA detection in humans for ante-mortem diagnosis (Crepin et al., 1998; Dacheux et al., 2008; Nagaraj et al., 2006; Wacharapluesadee and Hemachudha, 2001, 2002). Using molecular techniques to diagnose rabies in dogs during life, however, has proven to be unreliable and should not be used to determine whether rabies PEP should be administered to a bite victim. Nested real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) yielded a sensitivity of 87% (13 of 15) and 27% (4 of 15) in saliva and CSF, respectively (Saengseesom et al., 2007). In the case of rabies ante-mortem diagnosis in humans, nested RT-PCR yielded almost 100% sensitivity and specificity when applied on skin biopsy tissue containing hair follicles (Dacheux et al., 2008).

The aim of this study was to determine whether the non-neural specimens, specifically saliva, whisker follicles, and hair follicles obtained from dead animals, could be used to enhance rabies epidemiological surveillance by using real-time RT-PCR assay for RNA detection. Such specimens are more readily accessible in dogs than brain tissues. Previous study has shown that the sensitivity of real-time RT-PCR was comparable to nested RT-PCR (Wacharapluesadee et al., 2011).

A total of 101 dog carcasses submitted to the rabies diagnostic laboratory at Queen Saovabha Memorial Institute, Bangkok, Thailand, were included in this study. All animals were brought in between 1 to 24 hours after death. Brain tissue, saliva, and extracted whisker and hair follicle specimens were collected from each dog. The saliva, whisker follicles, and hair follicles were collected before opening the skull to avoid contamination with brain tissue.

The entire surface of each dog's head was thoroughly cleansed before whisker and hair follicles were extracted, followed by the collection of saliva. Ten whisker follicles and 20 hair follicles were extracted using the separate sterile forceps. They were put separately into 1 ml of lysis buffer containing guanidine thiocyanate (bioMérieux, Boxtel, The Netherlands). The buffer inactivates the virus and preserves viral RNA from RNase. Saliva was collected by applying sterile cotton swabs on the surface of the tongue and buccal mucosa. The saliva swab was then put into 1 ml of similar lysis buffer. These specimens in lysis buffer were stored at -70°C until use.

All brain tissue samples were examined by the DFA technique (Goldwasser and Kissling, 1958). Two regions of brain tissue, hippocampus and brain stem, were combined and smeared on the glass slides. Impression smears of fresh brain tissue were stained with fluorescein labeled antibodies (Fujirebio Diagnostics, Inc., Malvern, PA, USA). The fluorescein signal was examined under fluorescent microscope.

RNA was extracted from brain tissue specimens with RNeasy Lipid reagents (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The total nucleic acid from saliva, whisker follicles, and hair follicles were extracted using MiniMag isolation kit (bioMérieux) according to the manufacturer's instruction. A pre-extraction step was required for extracted whisker and hair follicle specimens. The follicles were dissolved in the lysis buffer and mixed with a rotator for 2 h. After centrifugation at 5,000 rpm for 10 min, the supernatant was removed for further extraction.

The TaqMan real-time RT-PCR was performed according to the previously published report (Wacharapluesadee et al., 2008). Briefly, the assay was carried out in 20 µl PCR mixture volume consisting of 10 µl of QuantiTect ProbeTM PCR master mix (Qiagen) with 1.0 µl of forward and

reverse primer (20 μ M), 0.4 μ l of 10 μ M of TaqMan probe, 2.4 μ l of nuclease – free water, 0.2 μ l of QuantiTect RT Mix, and 5 μ l of RNA extract. The PCR reactions were performed in 20 μ l glass capillaries on the Light Cycler real-time PCR version 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The cycling conditions included reverse transcription at 50°C for 20 min, incubation at 95°C for 15 min, and 45 cycles of 95°C for 1 s and 60°C for 1 min according to the manufacturer’s instruction (Qiagen). The cut off crossing point (CP) value for a positive sample was set at 30 cycles.

The DFA test on brain tissue specimens served as a gold standard and was used for statistical evaluation. The sensitivity, specificity, negative predictive value (NPV), positive predictive value (PPV) and 95% confidence interval (CI) were calculated for real-time RT-PCR results as compared to DFA test. Statistical analysis was performed using STATA version 11.0 (Stata Corp, TX, USA). Qualitative real-time RT-PCR was used in this study, with the higher CP value representing lower amounts of viral RNA and vice versa.

Sixty six of 101 dogs were found rabies positive as examined by DFA test and TaqMan real-time RT-PCR on brain tissue specimens. Of 66, twenty had history consistent with paralytic form of rabies. Saliva, whisker follicles, and hair follicles from 35 rabies negative dogs had negative results on TaqMan real-time RT-PCR. The specificity and PPV of saliva and follicles were 100% (Table 1).

The sensitivity of TaqMan real-time RT-PCR on saliva, extracted whisker follicles and hair follicles from rabies positive dogs were 83.3% (55/66, 95%CI: 76.1, 90.6), 81.8% (54/66, 95%CI: 74.3, 89.3) and 66. 7% (44/66, 95%CI: 57.5, 75.9) with CP value ranges of 20.73 to 29.69, 22.59 to 29.69 and 23.52 to 29.92 cycles, respectively. The NPV were 76.0 (95%CI: 67.8, 84.4), 74.4 (95%CI: 66.0, 83.0) and 61.4% (95%CI: 51.9, 70.9), respectively (Table 1).

When the results of all 3 specimen types were combined, the rate of positivity was slightly increased to 86.4% (57/66). There were 44 of 66 (66.7%) rabies infected dogs that had all 3 specimen types positive (Table 2). Nine of 66 rabies infected dogs had all 3 specimen types negative. Six of these 9 dogs had clinical signs consistent with paralytic rabies.

This study confirms that diagnosis of rabies in animals should be done only in brain tissue. Diagnostic confirmation of rabies is essential for making clinical management decision. A reliable method for rabies confirmation should show PPV and NPV of 100%. The test with lower PPV, high false positivity, can lead to unnecessary rabies PEP. On the contrary, method which carries false negative result can potentially cause death since rabies PEP may be omitted.

The DFA test is a reliable diagnosis tool and can be accomplished within 3 hours. There were no false negative or positive results in the series of 8,987 animal brains analyzed by DFA test on 2 brain regions of brainstem and hippocampus (Tepsumethanon et al., 1997). A total of 5,070 brains were negative on the analysis with DFA and mouse inoculation tests, and the remaining 3,917 brains were found positive on both tests.

Molecular methods have been increasingly used in routine practice such as quantitative real-time PCR and TaqMan real-time RT-PCR (Hughes et al., 2004; Wacharapluesadee et al., 2008). These have been applied for ante-mortem rabies diagnosis in humans and for postmortem diagnosis both in humans and animals. Detecting rabies viral RNA in specimens other than brain tissue is an attractive alternative. This can avoid the tedious procedure of breaking the skull open to obtain brain tissues. Further, brain tissue may become liquefied and putrefied in hot weather condition. Although molecular detection methods can detect rabies viral RNA in brain samples left at ambient temperature (20–30°C) during 72 hours, the detection sensitivity is not equally good as examinations done on fresh specimens (Araujo et al., 2008). Non-neural specimens such as saliva, skin biopsy tissue at the neck containing hair follicles, showed promising results in ante-mortem diagnosis in humans (Dacheux et al., 2008; Wacharapluesadee and Hemachudha, 2010). In comparing two detection methods, testing extracted hair follicles with nucleic acid sequence-based amplification assay or real-time RT-PCR, and testing skin biopsy tissues containing hair follicles with nested RT-PCR, it was found that the latter showed 98% sensitivity (versus 52 % in the former) (Dacheux et al., 2008; Wacharapluesadee and Hemachudha 2010). Recent study suggested that such higher sensitivity might not be attributable to the gene target (nucleocapsid gene in the former versus large polymerase gene in

the latter) or technique used (Wacharapluesadee et al., 2011). It is possible that skin biopsy tissue containing hair follicles contains higher amount of rabies viral RNA than extracted hair follicles.

In this study, extracted whisker and hair follicles were chosen instead of skin biopsy tissue for the sake of practicality with the belief that whisker follicles, theoretically, may contain more abundant nerve supply. The whole procedure to obtain all 3 non-neural specimen types was short and easy. The results of the study were roughly similar to those in ante-mortem rabies diagnosis in humans. Saliva yielded a high positivity rate of 83%. However, it is not certain whether this rate of positivity will remain high if the specimen was left at high temperature until the surface of the tongue and buccal mucosa was completely dry. Whisker follicles had a comparable rate of positivity to saliva, and hair follicles yielded the lowest rate. It is intriguing why paralytic rabies infected dogs had higher rate of false negative tests on non-neural specimens. Six of nine false negative tests belonged to paralytic dogs. This was similar to the case of paralytic rabies in humans. Only 4 of 20 non-neural specimens (CSF, saliva, urine, extracted hair follicles) were found positive in paralytic rabies cases. Three of 6 paralytic cases had false negative results (Wacharapluesadee and Hemachudha, 2010). This can be explained by the fact that much lower amount of rabies viral RNA was found in the brains of paralytic dogs as compared to furious counterpart (Laothamatas et al., 2008). This may affect the amount of virus that is centrifugally spread to non-neural organs including whisker and hair follicles. None or few of rabies infected dogs had rabies viral RNA detected exclusively in whiskers (2/66) or hair (0/66) follicles. This was usually accompanied by the presence of rabies viral RNA in saliva.

Although the rate of positivity on whisker follicles was as high as 83% (or 86% when all 3 specimen types combined), this was not sufficient to be used for rabies diagnosis in animals after death since it may deter physicians from giving the appropriate rabies PEP. However, these specimens may be used as alternative sources to strengthen the epidemiological surveillance particularly in rabies endemic developing countries.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund (DBG5180026), the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (HR1160A) and the Thai Red Cross Society, Thailand. We also acknowledge Mr. Henry Cheng, Henry Luce Scholar, WHO Collaborating Centre for Research and Training on Viral Zoonoses, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for help in the preparation of this manuscript.

Table 1 Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of TaqMan real-time RT-PCR results in 4 specimens

Position	Sensitivity [95% CI]	Specificity [95% CI]	PPV [95% CI]	NPV [95% CI]
Brain	100.0	100.0	100.0	100.0
Saliva	83.3 [76.1, 90.6]	100.0	100.0	76.0 [67.8, 84.4]
Whisker follicles	81.8 [74.3, 89.3]	100.0	100.0	74.4 [66.0, 83.0]
Hair follicles	66.7 [57.5, 75.9]	100.0	100.0	61.4 [51.9, 70.9]

PPV = Positive predictive value, NPV = Negative predictive values

Table 2 Results of TaqMan real-time RT-PCR from 3 types of non-neural specimen in dogs with and without rabies infection

TaqMan real-time RT-PCR result	Rabies infected dog* (n=66) [%]	Non-rabies infected dog* (n=35)
Saliva positive	55/66 [83.3]	0/35
Whisker follicles positive	54/66 [81.8]	0/35
Hair follicles positive	44/66 [66.7]	0/35
Saliva, whisker and hair follicles positive	44/66 [66.7]	0/35
Saliva and/or whisker and/or hair follicles positive	57/66 [86.4]	0/35

*Diagnosis of rabies in dog was confirmed by both DFA and TaqMan real-time RT-PCR. Both tests had perfect agreement.

References

- Araujo, D.B., Langoni, H., Almeida, M.F., Megid, J. 2008. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. *BMC Res Notes* 1, 17.
- Crepin, P., Audry, L., Rotivel, Y., Gacoin, A., Caroff, C., Bourhy, H. 1998. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 36, 1117-1121.
- Dacheux, L., Reynes, J.M., Buchy, P., Sivuth, O., Diop, B.M., Rousset, D., Rathat, C., Jolly, N., Dufourcq, J.B., Nareth, C., Diop, S., Ihle, C., Rajerison, R., Sadorge, C., Bourhy, H., 2008. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin Infect Dis.* 47, 1410-1417.
- Goldwasser, R.A., Kissling, R.E. 1958. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc Soc Exp Biol Med.* 98, 219-223.
- Heaton, P.R., Johnstone, P., McElhinney, L.M., Cowley, R., O'Sullivan, E., Whitby, J.E. 1997. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J Clin Microbiol.* 35, 2762-2766.
- Hughes, G.J., Smith, J.S., Hanlon, C.A., Rupprecht, C.E. 2004. Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus RNA: influence of sequence variation and application to quantification of viral loads. *J Clin Microbiol.* 42, 299-306.
- Kamolvarin, N., Tirawatnpong, T., Rattanasiwamoke, R., Tirawatnpong, S., Panpanich, T., Hemachudha, T. 1993. Diagnosis of rabies by polymerase chain reaction with nested primers. *J Infect Dis.* 167, 207-210.
- Laothamatas, J., Wacharapluesadee, S., Lumlertdacha, B., Ampawong, S., Tepsumethanon, V., Shuangshoti, S., Phumesin, P., Asavaphatiboon, S., Worapruekjaru, L., Avihingsanon, Y., Israsena, N., Lafon, M., Wilde, H., Hemachudha, T. 2008. Furious and paralytic rabies of canine origin: neuroimaging with virological and cytokine studies. *J Neurovirol.* 14, 119-129.
- Nagaraj, T., Vasanth, J.P., Desai, A., Kamat, A., Madhusudana, S.N., Ravi, V. 2006. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *J Clin Virol.* 36, 17-23.

- Saengseesom, W., Mitmoonpitak, C., Kasempimolporn, S., Sitprija, V. 2007. Real-time PCR analysis of dog cerebrospinal fluid and saliva samples for ante-mortem diagnosis of rabies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 38, 53-57.
- Tepsumethanon, V., Lumlertdacha, B., Mitmoonpitak, C., Fagen, R., Wilde, H. 1997. Fluorescent antibody test for rabies: prospective study of 8,987 brains. *Clin Infect Dis*. 25, 1459-1461.
- Wacharapluesadee, S., Hemachudha, T. 2001. Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies. *Lancet*. 358, 892-893.
- Wacharapluesadee, S., Hemachudha, T. 2002. Urine samples for rabies RNA detection in the diagnosis of rabies in humans. *Clin Infect Dis*. 34, 874-875.
- Wacharapluesadee, S., Sutipanya, J., Damrongwatanapokin, S., Phumesin, P., Chamnanpood, P., Leowijuk, C., Hemachudha, T. 2008. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. *J Virol Methods*. 151, 317-320.
- Wacharapluesadee, S., Hemachudha, T. 2010. Ante- and post-mortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests. *Expert Rev Mol Diagn*. 10, 207-218.
- Wacharapluesadee, S., Phumesin, P., Supavonwong, P., Khawplod, P., Intarut, N., Hemachudha, T. 2011. Comparative detection of rabies RNA by NASBA, real-time PCR and conventional PCR. *J Virol Methods*. 175, 278-282.
- World Health Organization (WHO). 2005. WHO Expert Consultation on Rabies. WHO Press, Geneva. Available at www.who.int/rabies/931/en/index.html.



WHO Collaborating Centre
for Research and Training on Viral Zoonose
Department of Medicine
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
Rama 4 Road, Bangkok 10330
Thailand

July 06, 2011

The Editor
Journal of Virological Methods

Dear Sir or Madam,

We would like to submit a manuscript entitled **Detection of rabies viral RNA from non-neural specimens of rabies infected dogs by Taqman real-time RT-PCR** as a short communication. Attached please find manuscript file. This work has not been published previously and the final manuscript has been seen and approved by all of us.

This work has been supported by grants from the Thailand Research Fund and Thai Red Cross Society. We have no financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence our work.

We greatly appreciate your consideration.

Sincerely yours,

Supaporn Wacharapluesadee

Supaporn Wacharapluesadee, PhD.
Corresponding author
Email: spwa@hotmail.com

Four possible referees knowledgeable in this field.

1. Dr Francois-Xavier Meslin

e-mail: meslinf@who.int

2. Dr. Deborah J. Briggs

e-mail: briggs@vet.ksu.edu

3. Dr. Henry Wilde

e-mail: wildehenry@yahoo.com

Table 1 Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of TaqMan real-time RT-PCR results in 4 specimens

Position	Sensitivity [95% CI]	Specificity [95% CI]	PPV [95% CI]	NPV [95% CI]
Brain	100.0	100.0	100.0	100.0
Saliva	83.3 [76.1, 90.6]	100.0	100.0	76.0 [67.8, 84.4]
Whisker follicles	81.8 [74.3, 89.3]	100.0	100.0	74.4 [66.0, 83.0]
Hair follicles	66.7 [57.5, 75.9]	100.0	100.0	61.4 [51.9, 70.9]

PPV = Positive predictive value, NPV = Negative predictive values

Table 2 Results of TaqMan real-time RT-PCR from 3 types of non-neural specimen in dogs with and without rabies infection

TaqMan real-time RT-PCR result	Rabies infected dog* (n=66) [%]	Non-rabies infected dog* (n=35)
Saliva positive	55/66 [83.3]	0/35
Whisker follicles positive	54/66 [81.8]	0/35
Hair follicles positive	44/66 [66.7]	0/35
Saliva, whisker and hair follicles positive	44/66 [66.7]	0/35
Saliva and/or whisker and/or hair follicles positive	57/66 [86.4]	0/35

*Diagnosis of rabies in dog was confirmed by both DFA and TaqMan real-time RT-PCR. Both tests had perfect agreement.

Marine Fish Ciguatera toxin:

Case series report and survey at fish markets in Bangkok

Abhinbhen Saraya^a, Thiravat Hemachudha^a, Chirapol Sintunawa, Pornpun Supavonwong, Kusuma
Sawangpun^b, Supaluk Damrongsheaur^b, Supaporn Wacharapluesadee^{a*}

*^a Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and King Chulalongkorn Memorial Hospital, and WHO
Collaborating Centre for Research and Training on Viral Zoonoses, Thai Red Cross Society, ^bPhuket
provincial Hospital, Ministry of Public Health, Thailand.*

* Corresponding author

Supaporn Wacharapluesadee, PhD

WHO Collaborating Centre for Research and Training on Viral Zoonoses,

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and King Chulalongkorn Memorial Hospital,

Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand, 10330.

Tel: (662) 256 4000 ext: 3561

Fax: (662) 652 3122

E-mail address: spwa@hotmail.com

Introduction

Ingestion of ciguatera toxin (CTX) containing fish meat produces illness very much similar to other food poisoning or gastrointestinal infections. Reef disturbance by military and tourism developments as well as the effect of global warming increases the risk of ciguatera by increasing benthic substrate for dinoflagellate growth. The destruction and death of coral reef allow for larger growth of the harboring algae which inhabited by dinoflagellates. *Gambierdiscus toxicus*, the most commonly found dinoflagellate has rapid growing pattern. This may be influenced by the degree of sunlight exposure with the presence of silicates and oxides from land lateral soils, and with algal detritus which results in the development of peculiar algal turfs *Turbinaria*, *Jania* and *Amphiroa species*. Such growth patterns presumably underlie the spatial and temporal variability of ciguatera outbreaks.

We here reported 6 cases with marine fish poisoning with critical analysis on their symptoms, clinical course and severity to distinguish between ciguatera and other poisonings. Random survey at 3 fish markets in Bangkok revealed fish meat possibly contaminated with ciguatoxin. With an accumulative effect of climate change and global warming effect and its nature of heat resistance, ciguatera fish poisoning situation may be escalating and deserves attention to the national level.

Materials and Methods

Patient data

Six patients of 2 incidents in 2008 were reported in this study. The first 2 patients were admitted to King Chulalongkorn Memorial Hospital (AS and TH) and the remaining 4 (KS and SD) to Phuket provincial Hospital. They were exposed to the same source of contamination; sea bass (incident 1) and red snapper (incident 2). Inclusion of these patients was based on the presence of severe diarrhea, nausea and vomiting and absence of reflex tachycardia and dramatic recovery of clinical symptoms and signs within

24-72 hours despite severe degree of organ system involvement (cardiovascular and neuromuscular systems) at nadir.

Survey of ciguatoxin in fish meat

Sample collection

A total of 69 fresh fish samples were collected randomly from 3 markets in Bangkok between July and December 2008. In addition, five packs of frozen sliced fish fillet (Lined silver Grouper, *Pomadasys kaakan*) were randomly collected from the same markets, between March and December 2009. Each pack contained 30-40 slices. These samples were further investigated for ciguatera toxin. Transportation of these specimens from the markets to laboratory were done on ice and kept frozen at -80 °C until use.

Cigua-Check[®] test

Each of the 69 fish samples and 158 slices from frozen packs were tested for CTX with commercially available test kit, Cigna-Check (Toxi Tec, Inc, Hawaii, USA) according to the manufacturer's instruction. Briefly, after cleaning, a small, rice-grain-sized piece of meat underneath the skin was cut blood free and handled with a clean scissors and forceps. Each sample was put into the bottom of the vial containing clear liquid methanol. Then test stick was placed into the vial containing clear liquid and fish sample. After incubation at room temperature for 20 min, the test stick was removed and direct air dry for 15 to 20 min to remove solvent attached on the surface of the stick. The dry test stick was placed into well-mixed blue liquid solution containing latex immunobead for 10 min, then removed and rinsed in distilled water. The test stick was examined under white background provided on the inside box lid, to distinguish any color change on the paper-covered side. Any color change on the test stick indicates that the fish contains CTXs. The darker the color the more CTXs fish contains.

The positive control was carried out by inserting a positive control stick to a well mixed latex immunobead suspension. After 10 min incubation, the stick was rinsed with distilled water. A very faint

blue (positive) color appeared on the stick. The negative control test was conducted in the same manner as those used for fish sample test, but without fish sample. The test stick resulted with no color.

Results

First incident: Patients 1 and 2

Patient 1 was a 20 years old student of the Faculty of Pharmacy, Chulalongkorn University. She was previously healthy with no known underlying diseases. She had lunch, rice topped with sea bass with chinese celery, at the dormitory cafeteria. Within the following hour, she felt numbness at perioral area. Numbness progressed to involve both hands and feet within a couple hours. At that time she felt dizzy and became clumsy while walking. She went to bed. On the following morning, she woke up with severe vertigo, nausea and vomiting and was very fatigue. Ataxia was noted during standing and walking. She was taken to the King Chulalongkorn Memorial Hospital immediately after. Upon admission, her vital signs were normal with a blood pressure of 110/60 mmHg, a heart rate of 70 beats per minute. There was no significant focal neurological deficit except abnormal balance on maintaining posture and ataxia without side predilection. Sensory examination was normal in all modalities. Deep tendon reflexes were normal at 1+. She was discharged after one day with no sequel.

Patient 2 was a 35 year-old female employed as a nurse assistant at the King Chulalongkorn Memorial Hospital. She had sea bass with chinese celery for lunch at the same canteen and on same day as Patient 1. Half-an-hour after meal, she had abdominal pain and diarrhea. A diminished sensation at perioral area and both hands was also noted shortly after onset. Within a few hours, her numbness was increased in severity. She also felt dizzy, and experienced more severe degree of nausea and vomiting. At emergency department, she was noted having moderated degree of dyspnea and was in impending respiratory failure state. During the following 2 hours, she developed hoarseness of voice, and weakness of all limbs of MRC grade 4/5 with preservation of deep tendon reflexes. Her peak respiratory flow was recorded to be less than 300 millilitres and her peripheral oxygen saturation was 57%. Blood pressure was

144/100 mmHg. Her heart and respiratory rates showed no compensatory responses to severe hypoxia. Heart rate was at 80 beats per minute and respiratory rate was only 20 times per minute. She subsequently developed severe weakness of all limbs and facial musculatures and required intubation and assisted ventilation. Neurology consultation was made to exclude brainstem stroke. Upon examination, she was flaccid with normal papillary size and responses and was in de-efferent state. She was then admitted to intensive care unit (ICU). Laboratory investigations including electrolytes were within normal limits. She was on ventilatory support for 24 hours and was extubated by the end of the day and had full recovery by day 3 after admission.

Second Incident: Patient 3, 4, 5, and 6

Patient 3, 4, 5, and 6 were in the same family. Patient 6 went to the market and bought red snapper fish. She cooked red snapper fish curry and pork rib soup with salted vegetable for the whole family of 12. All shared the same dinner but there were 4 persons who had symptoms.

Patient 3 was a 9-years-old boy. Two hours after dinner, he had nausea, vomiting and abdominal pain with watery diarrhea (of more than 20 times). He also experienced perioral, tongue and both legs numbness. He was brought to the hospital where he was observed to have hypotension and signs of volume depletion with systolic blood pressure of lower than 90 mm Hg and a heart rate of 80 beats per minute. Neurological examination was within normal limit. Numb feeling around his mouth and legs was complaint but spontaneously resolved in 24 hours. He received supportive care and intravenous fluid replacement.

The 2nd member of the family was patient 4. He was a healthy man 24 years of age. Six hours after dinner, during when his nephew (patient 3) was hospitalized, he had nausea and vomiting, abdominal cramp, diarrhea, headache and numbness of perioral area, tongue, both hands and feet. Physical examination showed that he was afebrile and moderately severe dehydrated with a blood pressure of 80/40mmHg and had relatively slow heart rate (48 beats per minute). There was no abnormal

neurological sign. His laboratory investigations were within normal limit. He was resuscitated, and was improved by one day after admission.

Patient 5 had longest incubation period. She was a 29-years-old housewife and previously was healthy. She developed the symptoms 8 hours after meal. She had nausea and vomiting and watery diarrhea of more than 10 times along with abdominal pain, and numbness along perioral region, hands and feet. Vital signs at admission were normal except for a slow heart rate of 52 beats per minute with a blood pressure of 110/60mmHg. There was no neurological deficit. Her blood tests were normal. She was admitted for observation for 1 day.

The last patient 6 was 34 years old previously healthy female who prepared the food. The symptoms occurred 5 hours after meal comprising of perioral and limb numbness, abdominal pain, diarrhea, nausea and vomiting. She went to the same hospital. Physical examination revealed a blood pressure of 90/60mmHg and a relatively bradycardia of 50 beats per minute. She was fully conscious and there was no neurological deficit. Her laboratory investigations showed elevated white blood cell count of 18,700 cells per cubic milliliters, otherwise they were within normal limits. She was admitted for observation for 24 hours and completely recovered at the time of discharge.

Table 1: Symptoms and signs of patients with marine fish poisoning

Patient No.	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Year	2007	2007	2009	2009	2009	2009
Age (year)	20	50	9	24	29	34
Demographic	Bangkok	Bangkok	Phuket	Phuket	Phuket	Phuket
Gender	Female	Female	Male	Male	Female	Female
Onset of symptom	1 hr after meal (16 hrs prior to admission)	30 min after meal(6 hrs prior to admission)	2hrs after meal(4 hrs prior to admission)	2 hrs after meal(4 hrs prior to admission)	4 hrs after meal(4 hrs prior to admission)	2hrs after meal(3hrs prior to admission)
Symptoms	Perioral/hands /feet numbness, ataxia, vertigo, nausea & vomiting	Abdominal pain, diarrhea, perioral numbness, nausea & vomiting	Diarrhea, perioral & tongue numbness, nausea & vomiting	Abdominal pain, perioral /legs numbness, nausea, vomiting ,diarrhea	Diarrhea, Perioral/hands /feet numbness, nausea, vomiting, abdominal pain, cramping	Diarrhea, nausea, vomiting, abdominal pain, cramping, perioral/ hands/feet numbness
History of food taking	Sea bass with Chinese celery	Sea bass with Chinese celery	Red snapper fish curry	Red snapper fish curry	Red snapper fish curry	Red snapper fish curry
Underlying	No	Dyslipidemia	No	No	No	No
Vital signs	Normal	Respiratory failure	Hypotension	Normal	Hypotension	Hypotension
Conscious	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Neurosigns	Normal (improved)	Horseness of voice, quadriparesis with normal reflexes	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant
CBC	Normal	Normal	NA	NA	NA	Leukocytosis
Electrolyte	Normal	Normal	NA	NA	NA	NA
Ventilator support	No	Yes	No	No	No	No
Result	Recover in 1 day	Recover in 3 days	Recover in 1 day	Recover in 1 day	Recover in 1 day	Recover in 1 day

All but patient 1 had abnormal slow heart rate of 40-50 beats/minute in the presence of hypotension/volume depletion and/or hypoxemic state. All had nausea, vomiting and diarrhea (except patient 1 who had nausea and vomiting).

Survey of CTX in fish meat

Of sixty-nine fish samples examined, no sample was evidently positive as examined by Cigux-Check® kit. However, two samples of 158 fish-fillet slices showed border line results. The color change was demonstrated but not obvious enough as compared to positive control.

Discussion

There are many kinds of marine toxins that can cause human diseases; most of them are caused by ingestion of contaminated food. History of eating fish before their illness points to ciguatera or puffer fish poisoning whereas those who consume shellfish may have risk of shellfish poisoning in the forms of paralytic shellfish poisoning, neurotoxic shellfish poisoning and amnesic shellfish poisoning. (1) Each marine toxin manifests with several signs and symptoms, some are unique but many of them can be shared among all (Table 2). Due to the difficulty in identifying marine toxin in human body or even in fish meat and in shellfish, the diagnosis depends on history of eating particular kind of seafood, clinical symptoms and time of recovery. Detection of toxin in remnant of the food can be done in only special laboratory but usually is not successful due to unavailability of food for examination by the time that patient develops illness.

The main clinical symptoms of puffer fish poisoning (Table 2) resulting from tetrodotoxin, a heat-stable and water-soluble molecule that inhibits Na^+ channel and post synaptic acetylcholine receptor. (2) This process reduces synaptic transmission of the neuromuscular and other nervous systems. Furthermore, tetrodotoxin can stimulate chemoreceptor trigger zone at medulla oblongata, that causes nausea, vomiting and it can also depress the function of respiratory centre in brainstem.(3) Symptoms usually occur within 30 minutes to 6 hours after ingestion of toxin in most of the patients (85%) (Table 2). Normally, the initial symptom of puffer fish poisoning is perioral paresthesia (68-71%) that can evolve to whole-body or limbs paresthesia (34-44%). Half of the patients have headache (40-47%), nausea and vomiting (45-48%) and some has dizziness (22-30%). The muscle weakness or paralysis begins later (22-

62%). (3-5) The typical pattern of marine toxin weakness is ascending paralysis; weakness starts at lower extremities then spreads to trunk and upper extremities. Moreover, coma (0-11%) and respiratory failure (0-22%) can be found in severe cases of tetrodotoxin. For other non-neurological symptoms, patients may have abdominal pain (17-22%) but there is no diarrhea. The autonomic nervous system symptoms that has been reported is hypersalivation (0-11%) and late cardiac dysfunction (rare). (4)

The worldwide most common marine toxins poisoning is ciguatera. Many types of reef-fish are high risk to have CTX, especially barracuda, grouper, sea bass, snapper, and amberjack (6). The endemic areas of ciguatera are the oceans in latitudes 35 north and south of the equator. Ciguatoxin is a lipophilic polyether that can open voltage sensitive Na^+ channel at the neuromuscular junction. It causes hyper-excitability and inhibits synaptic transmission. The majority of patients begin to have signs and symptoms of ciguatera at 6-10 hours after intoxication (range 1-48 hours) (Table 2). Neurological symptoms often manifest early, such as headache, numbness, “classic” reversal of temperature perception, ataxia (rare) and muscle paralysis. Some sensory symptoms (tingling sensation, cold allodynia or small fiber polyneuropathy) can persist for weeks, but gastrointestinal symptoms (diarrhea, nausea & vomiting) and cardiovascular symptoms (hypotension, cardiac arrhythmia) usually resolve within 2-3 days. Besides, CTX from fishes in India ocean and Pacific ocean is more toxic than those from Caribbean (7). Common neurological symptoms of CTX (8-9) consist of perioral numbness (38-91%), whole-body or limbs paresthesia (36-100%), temperature dysesthesia (19-94%), dizziness (25-62%), nausea and vomiting (37-69%), headache (19-62%), limbs weakness (30-100%) and myalgia (34-86%). When compared with puffer fish poisoning, ciguatera has more prominent gastrointestinal symptoms, especially diarrhea (67-83%) and abdominal pain (30-74%). There also reports of cardiac dysrhythmia (0-33%). Generally, the severity of ciguatera is milder than puffer fish poisoning, but it can cause acute and chronic effects that result in hallucination, depression and anxiety (10).

Table 2: Clinical symptoms of ciguatera and puffer fish poisoning (3, 4, 5, 8, 9)

Symptoms	Tetrodotoxin	Ciguatoxin
Neurological symptoms		
perioral numbness	71-68%	38-91%
generalized paresthesia	34-44%	36-100%
temperature dysesthesia	-	19-94%
vertigo	22-30%	25-62%
nausea and vomiting	45-48%	37-69%
headache	40-47%	19-62%
limbs weakness	22-62%	30-100%
myalgia	-	34-86%
ataxia	0-15%	rare
coma	0-11%	-
respiratory failure	0-22%	rare
Gastrointestinal symptoms		
abdominal pain	17-22%	30-74%
diarrhea	0%	67-83%
Autonomic nervous system symptoms		
hypersalivation	0-7.5%	-
cardiac dysrhythmia	-	0-33%

In our case series, Patient 1 had perioral numbness 1 hour after eating fish, then within the following 6 hours, she developed whole body paresthesia, severe vertigo, nausea, vomiting and ataxia within half day. This patient was difficult to diagnose whether she had ciguatera or mild to moderate form of puffer fish poisoning. But due to prominent vertiginous symptoms, her illness might be best explained by CTX. Patient 2 had an onset at 30 minutes. She had abdominal pain and watery diarrhea, perioral and both hands numbness. She felt dizzy and nausea after 3 hours and at 6 hours her clinical symptoms worsen, and finally had acute respiratory failure. Although muscular paralysis was prominent, diarrhea and abdominal pain were rarely found in puffer fish poisoning. We concluded that this case may be the case of severe form of CTX. Patient number 3 also had abdominal pain, watery diarrhea within 2 hours of ingestion, followed by nausea, vomiting and legs numbness. This child should have been diagnosed as CTX poisoning because of prominent gastrointestinal symptoms. Patient number 4, 5 and 6 all had similar

symptoms. Their clinical onset ranged from 5 to 8 hours after meal. They had abdominal pain, diarrhea, nausea and vomiting. The interesting point was that all of them had relatively bradycardia despite of volume depletion or hypotension. Such autonomic involvement in the form of bradycardia or dysrhythmia, abdominal pain, nausea and vomiting and dramatic recovery are indicative of CTX poisoning.

Treatment and prevention

Treatment of CTX poisoning is mainly supportive and symptomatic, such as volume replacement for dehydration. There were some studies advocating that mannitol of 0.5-1 g/kg intravenous drip in 30-45 minutes within 48-72 hours after onset would help improving the severity of symptoms. It was believed that due to its high osmolarity, mannitol could reduce neuronal edema and act as scavenger of free radical (11). However, in some controlled trials, benefit of mannitol over normal saline infusions could not be demonstrated (12). Besides, the osmotic diuresis can potentially worsen patient's condition by increase volume depletion. Until recently, there is no appropriate randomized controlled trial that can prove the efficacy of mannitol over normal saline.

The prevention of ciguatera is very difficult, because of its colorless, odorless and tasteless of CTX. Most importantly, CTX is resistant to heat and cannot be destroyed by cooking. The current recommendation is that one should avoid eating fish or internal organs of high risk fishes, such as Moray eel, Barracuda, Grouper, Kingfish, Jacks, Snapper, Surgeonfish, Parrot fish, Wrasses, Hogfish, Narrow barred Spanish mackerel, Coral trout, Flowery cod and Red emperor. (8) However, if needed or unavoidable, it has been suggested to consume small amount of many types of fish (<50g). This is much safer than eating large amount (>200g) of single fish.

References:

1. Isbister GK, Kiernan MC. Neurotoxic marine poisoning. *Lancet Neurol.* 2005 Apr;4(4):219-28.
2. Noguchi T, Arakawa O. Tetrodotoxin--distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Mar Drugs.* 2008;6(2):220-42.
3. Chowdhury FR, Nazmul Ahasan HA, Mamunur Rashid AK, Al Mamun A, Khaliduzzaman SM. Tetrodotoxin poisoning: a clinical analysis, role of neostigmine and short-term outcome of 53 cases. *Singapore Med J.* 2007 Sep;48(9):830-3.
4. Silva CC, Zannin M, Rodrigues DS, Santos CR, Correa IA, Haddad Junior V. Clinical and epidemiological study of 27 poisonings caused by ingesting puffer fish (Tetrodontidae) in the states of Santa Catarina and Bahia, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2010 Jan-Feb;52(1):51-6.
5. Homaira N, Rahman M, Luby SP, Haider MS, Faruque LI, Khan D, et al. Multiple outbreaks of puffer fish intoxication in Bangladesh, 2008. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Aug;83(2):440-4.
6. Sobel J, Painter J. Illnesses caused by marine toxins. *Clin Infect Dis.* 2005 Nov 1;41(9):1290-6.
7. Dickey RW, Plakas SM. Ciguatera: a public health perspective. *Toxicon.* 2010 Aug 15;56(2):123-36.
8. Friedman MA, Fleming LE, Fernandez M, Bienfang P, Schrank K, Dickey R, et al. Ciguatera fish poisoning: treatment, prevention and management. *Mar Drugs.* 2008;6(3):456-79.
9. Wong CK, Hung P, Lee KL, Mok T, Chung T, Kam KM. Features of ciguatera fish poisoning cases in Hong Kong 2004-2007. *Biomed Environ Sci.* 2008 Dec;21(6):521-7.
10. Lewis RJ. The changing face of ciguatera. *Toxicon.* 2001 Jan;39(1):97-106.
11. Birinyi-Strachan LC, Davies MJ, Lewis RJ, Nicholson GM. Neuroprotectant effects of iso-osmolar D-mannitol to prevent Pacific ciguatoxin-1 induced alterations in neuronal excitability: a comparison with other osmotic agents and free radical scavengers. *Neuropharmacology.* 2005 Oct;49(5):669-86.
12. Schnorf H, Taurarii M, Cundy T. Ciguatera fish poisoning: a double-blind randomized trial of mannitol therapy. *Neurology.* 2002 Mar 26;58(6):873-80.

Epidemic Marine Fish Ciguatoxin: special appraisals on global warming and climate changes

Chirapol Sintunawa, PhD

Faculty of Environmental Science Studies, Mahidol University

Introduction

Causal relations of climate change and ciguatera epidemic depict influences of drivers, changes, responses in interconnected variables. Ciguatera epidemic is one important issue among many catastrophic consequences from climate changes. In order to appreciate and have a clear understanding of ciguatera toxin from marine fish poisoning, thorough understanding of accumulative effect of global warming on land and oceanic water current balancing system which in turn affects the acidic content of water. This results in abundance of coral pathogens and resultant coral diseases with colonization of dinoflagellates which inhabit the surface of macroalgae. Herbivorous fishes feed on these macroalgae, thus, contain excessive amount of ciguatera toxin.

Critical analysis of climate change and global warming effect on coral reef ecosystems

As global temperature rises, regional evaporation in the lower latitudes and regional precipitation in the higher latitudes increases (Klige, 1990; Zestser and Loaiciga, 1993; Manabe et al., 1994; Palmer and Räisänen, 2002). Shifts in the evaporation/precipitation regime could have significant consequences to the continents, including worsening conditions for flood control and water storage (Loaiciga et al., 1996; Milly et al., 2002). In addition, excess ground water runoff (in relation to evaporation) will contribute to lowering of groundwater levels (Zestser and Loaiciga, 1993; Manabe et al., 1994). Moreover, approximately 6% of the total water influx to the oceans and seas comes from direct groundwater discharge (Zestser and Loaiciga, 1993). An increase in the amount of groundwater entering the ocean would lead to a net gain in oceanic volume. Melt water from glaciers may also contribute to increasing oceanic volume (Klige, 1990; Daniels et al., 1993; Schøtt Hvidberg, 2000; Stevenson et al., 2002). As water temperatures rise, the volume of the oceans will also increase due to thermal expansion (Daniels et al., 1993; Stevenson et al., 2002).

Sea levels have risen (0.1-0.3 m over the past century) in conjunction with the rising global temperature (Wigley and Raper, 1987; Liu, 2000; IPCC, 2001) but with a time lag of 19 years (Klige,

1990). This rise has been occurring at a faster rate than plants can colonize and establish wetland habitat (Daniels et al., 1993; Stevenson et al., 2002). Another major consequence of a changing climate is the likely perturbation of oceanic circulations. Currents are driven directly by winds (upper layer of ocean), fluxes of heat and freshwater (thermohaline circulation), or by the gravitational pull of the sun and moon (tides; Rahmstorf, 2002). Thermohaline circulation is the deep ocean water (> 200 m) that is conveyed in slow large-scale circulations, driven by water density, and dependent on heat and salinity (Garrison, 1996). Although there is much debate on the predicted future of this circulation (Hansen et al., 2004), many global climate change models suggest weakening, and possibly complete breakdown, of the

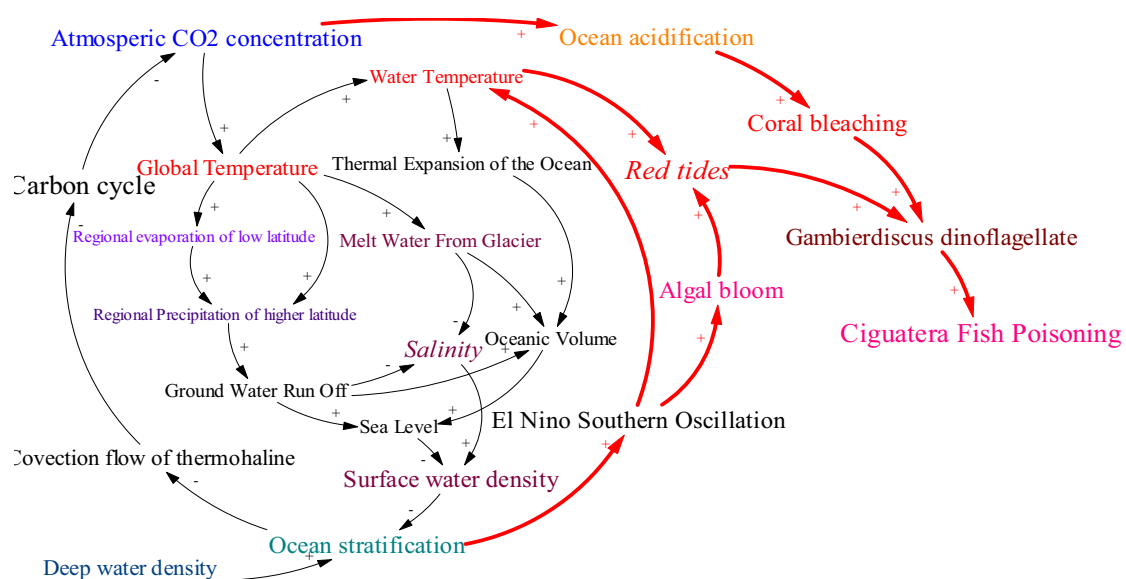


Figure 1. Causal relations of factors interrelating ciguatera epidemic and climate change

thermohaline circulation, particularly in the Atlantic Ocean (Bernal, 1993; Manabe et al., 1994; Sarmiento et al., 1998; Plattner et al., 2001; Vellinga and Wood, 2002). Furthermore, a rise in sea level may also decrease the formation of North Atlantic Deep Water (NADW) which in turn, has direct impact upon massive ocean water circulations (Mikolajewicz et al., 1990). This is caused, in

part, to increased density-driven stratification of the upper water column in the higher latitudes, which decreases vertical mixing and convective overturning (Sarmiento et al., 1998).

Evidence of this has been uncovered in the Gulf of Alaska. Here, surface temperatures have been rising from warmer air temperatures, while salinities have been decreasing from melting ice, thereby decreasing the water's density. Meanwhile, deep waters have had little change in density, leading to increased ocean stratification and decreased formation of mixed layers (Whitney and Freeland, 1999; Freeland and Whitney, 2000). This halts the convective flow that drives thermohaline circulation, and consequently, disturbs the circulation of nutrients and heat that these deep waters contain.

In the Pacific Ocean, increased stratification could increase the frequency of El Niño/Southern Oscillation (ENSO) events and more extreme climatic variations (Timmermann et al., 1999). ENSO events are characterized by an intrusion of warm water from the western equatorial Pacific into the eastern equatorial Pacific, where it causes a rise in sea level, higher sea surface temperatures, and a weakened thermocline, which is associated with reduced primary productivity (Miller and Fluharty, 1992). Thermohaline circulation is intimately linked to the Carbon cycle and deep ocean ventilation, and any change in either would further disrupt the carbon cycle and biogeochemistry of the coupled system (Bernal, 1993; Manabe et al., 1994; Roessing et al., 2004; Roessing et al., 2005; Sarmiento et al., 1998).

When CO₂ is introduced to ocean waters and hydrated, more hydrogen ions are produced, and this equation shifts to the right:



When the CO₂ concentration increases, the equilibrium of the equation shifts such that more carbonic acid (H₂CO₃) is formed, which partially dissociates into bicarbonate (HCO₃⁻) and hydrogen (H⁺) ions, lowering water pH. Bicarbonate may further dissociate so that 2 H⁺ are created for one molecule of CO₂. The pH is a measure of H⁺ activity, and is an important water quality indicator because fish and other organisms are sensitive to pH. Ocean surface pH has already decreased by 0.1

pH units in colder waters and almost 0.09 pH units in warmer waters (Haugen, 1997). If atmospheric CO₂ concentrations continue to increase, another 0.3 pH unit decrease of oceanic surface waters may occur (Haugen, 1997). Furthermore, as temperature increases, an increased proportion of the water molecules dissociate to H⁺ and OH⁻, decreasing water pH.

Coral diseases may have wide influences on coral reef ecosystems. Three coral pathogens (*Aspergillus sydowii*, *Vibrio shiloi*, and Black Band Disease) grow well at temperatures close to or exceeding probable host optima, suggesting that their population sizes would increase in warmer waters (Harvell et al., 2002). Certain bacteria (e.g., *V. shiloi*) cause bleaching of certain coral species (e.g., *Oculina patagonica*), while fungi grow optimally at temperatures that coincide with thermal stress and bleaching in corals (Harvell et al., 2002). This may lead to a co-occurrence of bleaching and infection (Harvell et al., 2002). Along with disrupting the fish communities associated with these corals, the leftover dead coral surfaces can become colonized by macroalgae, which support the proliferation of toxic dinoflagellates (de Sylva, 1994; Hales et al., 1999).

Emergence of Ciguatera marine fish poisoning

Ciguatera is the most frequent source of human illness caused by ingesting marine toxins, although many marine organisms produce toxins that affect humans (Hales et al., 1999). Ciguatoxins are produced by marine dinoflagellates that inhabit the surface of macroalgae. Herbivorous fish feed on this macroalgae, become contaminated, and the toxins bioaccumulate enough to cause illness when fish (e.g., groupers [Serranidae], snappers [Lutjanidae], and jacks [Carangidae]) are consumed by humans (de Sylva, 1994; Hales et al., 1999). Fish poisoning is therefore related to physical disturbances of coral reefs, which are sensitive to changes in environmental variables such as temperature and pollutants (Hales et al., 1999).

Annual reports of fish poisonings in the South Pacific are positively correlated with ENSO events, and there is a linear relationship between fish poisoning and sea-surface temperatures (Hales et al., 1999). Blooms of algae, called red tides, can also occur in marine and estuarine environments, causing poisoning of fish and humans eating contaminated fish (Anderson, 1997). These blooms are

very variable, lasting anywhere from weeks to years, and can stay localized in a specific area, or can be massive, covering thousands of square miles (Anderson, 1997). More intense rains wash more fertilizer and sewage into coastal waters, and this runoff triggers algal blooms and consequent poisoning of fish and humans (Epstein, 2000).

Ciguatera fish poisoning (CFP) occurs in tropical regions worldwide and globally. It is the most common non-bacterial food-borne illness associated with consumption of fish (Baden et al., 1995; Ansdell, 2009). The toxic organisms, most commonly associated with CFP, are benthic dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus*. These dinoflagellates are reported to produce ciguatoxins (Yasumoto et al., 1979; Durand-Clement, 1987; Lewis and Holmes, 1993) which bioconcentrate in marine food chains, reaching their highest levels in top predators such as, barracuda and other tropical reef fish (Tester, P.A., et al., 2010), with barracuda as the most cited cause in the medical literature.

Fishes, containing ciguatera toxin, look, smell, and taste normal. It is unrecognized and frequently misdiagnosed as gastrointestinal infections or poisoning from other bacterial causes. At least 50,000 people per year have been affected with CFP worldwide; with 2 to 10 per cent in the United States (Winter, 2009). These numbers may be underestimated. The toxin in fish concentrates more in internal organs than in muscle, thus, explaining why consumption of viscera results in more severe illness. (Winter, 2009).

Among *Gambierdiscus* genus, *G. toxicus* is the most common source of marine toxin on our planet. *G. toxicus* is a slow growing dinoflagellate distributed circum-tropically between 32° N and 32° S. Most ciguateric endemic areas are being characterized by oceanic salinity waters (<http://fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e0q.htm> last accessed 16/7/2009). It appears to be most prolific in the shallow waters away from terrestrial influences. Low salinity and high light intensities adversely affected *G. toxicus* growth. Research on *G. toxicus* population in Florida Keys showed that *G. toxicus* preferred depths of 1 to 4 meters; grew best at 11 per cent of full sun light and that maximum abundance occurred at a water temperature of about 30° C. *G. toxicus* is commonly found growing epiphytically on macroalgae colonizing damaged coral reefs, such as *Turbinaria omata*,

Amphiroa spp., *Halimeda opuntia* and *Jania spp.* (<http://fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e0q.htm> last accessed 16/7/2009).

What have been learnt?

Extensive and worldwide researches and studies lead us to better understand that ciguatera outbreak and climate change are related, causal relations in Figure 1 show that scientific findings in the past decades supported relationships of variables and these elements are clearly comprehended.

Warm water temperature: Several studies indicate that water temperature plays a significant role in the abundance of the *Gambierdiscus* dinoflagellate. Algal blooms are more common during summer months when water temperatures are at their warmest. With increasing incidences of climate change impacts, water temperatures will increase and this is particularly worrisome that there will be more incidents of ciguatera outbreaks in Thailand and around the world.

Coral damage: A strong correlation between ciguatera outbreaks and damaged coral reefs was discovered. There is more ciguatera when reefs are damaged, whether by man (e.g. tourism, dredging, excavation) or nature (e.g. cyclones, crown of thorns, coral bleaching events). In fact, researchers have found a pattern of ciguatera outbreaks, usually within 5 to 6 months after a reef has suffered major destruction. Such interval is the time that it takes for seaweeds to settle and start growing on the bare new surfaces on the reef; for toxic dinoflagellates to settle on the seaweed fronds; and large numbers of herbivorous (seaweed eating) fish to move into the area to graze, and finally, large numbers of predatory piscivorous (fish-eating) fish to come in to the area to hunt the smaller herbivorous fish. Coral reefs suffer from a variety of other diseases such as white syndrome, yellow band disease and black band disease. Although the links between rising ocean temperatures and the increased reporting of coral diseases in the last two decades remains tenuous and requires much further research, there is preliminary evidence that major outbreaks of coral disease only occur on reefs with high coral cover after especially warm years. These results indicate that climate change could be increasing the severity of coral diseases in the ocean.

What are the next steps?

Miller and Fluharty in 1992 pointed that research base needs to expand to elucidate the interactions among climate, biological processes, and socio-economic activities dependent on these processes. Nationwide communications of ciguatera outbreaks must be promoted (Miller and Fluharty, 1992). Public health and community education personals should spread messages of ciguatera outbreaks and its health impacts and make sure that communities are aware of potential health hazards and are brought to be better prepared and adapted to this outbreak.

Scientists in Thailand have reported reefs suffering 90% of their corals being bleached and up to 20% of the corals dead. Olivia Durkin, who is leading the bleaching monitoring at the Centre for Biodiversity in Peninsular Thailand, said: "This year's severe coral bleaching has the potential to be the worst on record" and "Extensive bleaching, death and disease are reported not only in corals, but giant clams, sea anemones and soft corals are also losing their symbiotic alga."

<http://www.telegraph.co.uk/earth/earthnews/7896403/Coral-reefs-suffer-mass-bleaching.html>. Corals in other parts of Southeast Asia, Australia, South America and the Caribbean also suffered severe damage from warming in 2010, in what scientists are calling one of the worst global coral bleaching events ever recorded. Global temperature data sets show that 2010 was one of the two warmest years in the historical record.

<http://green.blogs.nytimes.com/2011/01/21/thailand-closes-diving-sites-to-protect-corals/>

A relative lack of recognition exists among physicians, health care personals and those who work in emergency medical units. Medical practices in primary treatments and diagnosis should be significantly improved, developed and disseminated especially to physicians and staff in emergency units. Ministry of Public Health should mandate central reporting of ciguatera fish poisoning cases. Goals must be established to making progress toward bringing ciguatera fish poisoning surveillance programs online in response to outbreaks of CFP. Future efforts need to focus on developing a standardized reporting protocol and website where CFP data can be uploaded. In addition the CFP website needs to be linked to near real time environmental data.

References

Anderson, D.M. (1997) Turning back the harmful red tide. *Nature* 388, 513–514.

Ansdell, V.E., 2009. The pre-travel consultation counseling and advice for travelers: food poisoning from marine toxins. In: *Travelers' Health –Yellow Book*. Centers for Disease Control and Prevention. <http://wwwn.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-2/food-poisoningfrom-marine-toxins.aspx> (last accessed 31 August 2009).

Baden, D.G., Fleming, L.E., Bean, J.A., 1995. Marine toxins. In: de Wolff, F.A. (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the Nervous System. II. Natural Toxins and Drugs*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 141–175.

Bernal, P.A. (1993) Global climate change in the oceans: a review. In: Mooney, H.A., Fuentes, E.R., and Kronberg, B.I., *Earth system responses to global change: contrast between North and South America*. Academic Press, San Diego, CA, 1-15.

Daniels, R.C., White, T.W., and Chapman, K.K. (1993) Sea-level rise: Destruction of threatened and endangered species habitat in South Carolina. *Environ. Manage.* 17, 373-385.

de Sylva, D.P. (1994) Distribution and ecology of ciguatera fish poisoning in Florida, with emphasis on the Florida Keys. *Bull. Mar. Sci.* 54, 944–954.

Durand-Clement, M., 1987. Study of production and toxicity of cultured *Gambierdiscus toxicus*. *Biol. Bull.* 172 (1), 108–121.

Ecosys. Health 5, 20–25.

Epstein, P.R. (2000) Is global warming harmful to health? Sci. Am. August 2000, 50–57.

F.David Winter Jr.,MD, MSc, (2009) Ciguatera poisoning : an underwelcome vacation experience;

Freeland, H., and Whitney, F. (2000) Climatic changes: Gulf of Alaska. In: Sheppard, C., Global Issues and Processes, III., Pergamon, Amsterdam, Netherlands, 179-186.

Garrison, T. (1996) Oceanography: An Invitation to Marine Science, 2. Wadsworth Publishing, Belmont, CA, 567.

Global Climate Change on Marine and Estuarine Fishes and Fisheries. Climate Change ProgramWorld Wildlife Fund Washington DC.

Hales, S., Weinstein, P. and Woodward, A. (1999) Ciguatera (fish poisoning), El Niño, and Pacific sea surface temperatures.

Hansen, B., Østerhus, S., Quadfasel, D., and Turrell, W. (2004) Already the day after tomorrow? Science 305, 953-954.

Harvell, C.D., Mitchell, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S. and Samuel, M.D. (2002) Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. Science 296, 2158–2162.

Haugen, P.M. (1997) Impacts on the marine environment from direct and indirect ocean storage of CO₂. Waste Manage. 17, 323–327.

<http://fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e0q.htm> last accessed 16/7/2009

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (2001) Coastal zones and marine ecosystems. In: McCarthy, J.J., Canziani, O.F., Leary, N.A., Dokken, D.J. and White, K.S., Climate Change 2001: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Cambridge University Press, UK, 1032.

Julie M. Roessig, Christa M. Woodley, Joseph J. Cech, Jr., and Lara J. Hansen (2005) Effects of

Julie M. Roessig, Christa M. Woodley, Joseph J. Cech, Jr.,* & Lara J. Hansen (2004) Effects of global climate change on marine and estuarine fishes and fisheries *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14: 251–275

Klige, R.K. (1990) Influence of global climatic processes on the hydrosphere regime. In: Paepe, R., Fairbridge, R.W. and Jelgersma, S., *Greenhouse effect, sea level and drought*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, 165-181.

Lewis, R.J., Holmes, M.J., 1993. Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 106 (3), 615–628.

Liu, S. (2000) Effects of climate change and sea level on coastal systems. In: Sheppard, C., *Global Issues and Processes, III*. Pergamon, Amsterdam, Netherlands, 187-196.

Loaiciga, H.A., Valdes, J.B., Vogel, R., Garvey, J., and Schwarz, H. (1996) Global warming and the hydrologic cycle. *J. Hydrol.* 174, 83-127.

Manabe, S., Stouffer, R.J., and Spelman, M.J. (1994) Response of a coupled ocean atmosphere model to increasing atmosphere carbon dioxide. *Ambio* 23(1), 44-49.

Mikolajewicz, U., Santer, B.D., and Maier-Reimer, E. (1990) Ocean response to greenhouse warming. *Nature* 345, 589-593.

Miller, K.A., and Fluharty, D.L. (1992) El Niño and variability in the northeastern Pacific salmon fishery: implications for coping with climate change. In: Glantz, M., *Climate Variability, Climate Change and Fisheries*. Cambridge University Press, UK, 49-88.

Milly, P.C.D., Wetherald, R.T., Dunne, K.A., and Delworth, T.L. (2002) Increasing risk of great floods in a changing climate. *Nature* 415, 514-517.

Palmer, T.N., and Räisänen, J. (2002) Quantifying the risk of extreme seasonal precipitation events in a changing climate. *Nature* 415, 512-514.

Plattner, G.-K., Joos, F., Stocker, T.F., and Marchal, O. (2001) Feedback mechanisms and sensitivities of ocean carbon uptake under global warming. *Tellus* 53B, 564-592.
Proc (Baly Univ Med Cent) 142-143

Rahmstorf, S. (2002) Ocean circulation and climate during the past 120,000 years. *Nature* 419, 207-214.

Roessing, J.M., Woodley, C.M., Cech, J.J.Jr, Hansen, L.J. (2004). Effects of global climate change on marine and estuarine fishes and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14: 251–275.

Roessig, J.M., Woodley, C.M., Cech, J.J.Jr , Hansen, L.J. (2005). Effects of global climate change on marine and estuarine fishes and fisheries. *Climate Change Program World Wildlife Fund*; Washington DC.

Sarmiento, J.L., Hughes, T.M.C., Stouffer, R.J., and Manabe, S. (1998) Simulated response of the ocean carbon cycle to anthropogenic climate warming. *Nature* 393, 245-249.

Schøtt Hvidberg, C. (2000) When Greenland ice melts. *Nature* 404, 551-552.

Stevenson, J.C., Kearny, M.S., and Kock, E.W. (2002) Impacts of sea level rise on tidal wetlands and shallow water habitats: A case study from Chesapeake Bay. In: McGinn, N.A., *Fisheries in a Changing Climate*. American Fisheries Society Symposium 32, Bethesda, MD, 23-36.

Tester, P.A., et al., Ciguatera fish poisoning and sea surface temperatures in the Caribbean Sea and the West Indies, *Toxicon* (2010), doi:10.1016/j.toxicon.2010.02.026

Tester, P.A., et al., Ciguatera fish poisoning and sea surface temperatures in the Caribbean Sea and the West Indies, *Toxicon* (2010)

Timmermann, A., Oberhuber, J., Bacher, A., Esch, M., Latif, M., and Roeckner, E. (1999) Increased El Niño frequency in a climate model forced by future greenhouse warming. *Nature* 398, 694-696.

Vellinga, M., and Wood, R.A. (2002) Global climatic impacts of a collapse of the Atlantic thermohaline circulation. *Clim. Chang.* 54, 251-267.

Whitney, F.A., and Freeland, H.J. (1999) Variability in upper-ocean water properties in the NE Pacific. *Deep-Sea Res. II* 46, 2351-2370.

Wigley, T.M.L., and Raper, S.C.B. (1987) Thermal expansion of sea water associated with global warming. *Nature* 330, 127-131.

Yasumoto, T., Nakajima, I., Oshima, Y., Bagnis, R., 1979. A new toxic dinoflagellate found in association with ciguatera. In: Taylor, D.L., Seliger, H.H. (Eds.), *Toxic Dinoflagellate Blooms*. Elsevier, New York, pp. 65–70.

Zestser, I.S., and Loaiciga, H.A. (1993) Groundwater fluxes in the global hydrologic cycle: Past, present and future. *J. Hydrol.* 144, 405-427.

Editorial Manager(tm) for Journal of NeuroVirology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Canine furious and paralytic rabies: pattern differences in rabies antigen and inflammation localization in the central nervous system

Article Type: Full Paper

Corresponding Author: Shanop Shuangshoti, M.D.

Corresponding Author's Institution: Chulalongkorn Hospital

First Author: Shanop Shuangshoti, M.D.

Order of Authors: Shanop Shuangshoti, M.D.; Nischol Thepa; Pornchai Phukpattaranont; Preecha Ruangvejvoracha; Akanitt Jittmittraphap; Nirun Intarut; Veera Tepsumethanon; Supaporn Wacharapluesadee; Thiravat Hemachudha, M.D.

Abstract: 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 entire neuraxis. Postmortem examination of brains and spinal cords from furious and paralytic rabid dogs (5 of each) was performed. These animals were sacrificed shortly after they showed symptoms and signs of rabies. Quantitative image analysis revealed greater rabies antigen parameters (percentage of positive neurons, antigen positive area per positive neuron and antigen outside cell body) at several CNS regions of the furious dog. Viral quantities were highly 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.

Suggested Reviewers:

Opposed Reviewers:

Canine furious and paralytic rabies: pattern differences in rabies antigen and inflammation localization in the central nervous system

1,2,5Shanop Shuangshoti
 3Nischol Thepa
 4Pornchai Phukpattaranont
 1Preecha Ruangvejvoracha
 5Akanitt Jittmittraphap
 6Nirun Intarut
 7Veera Tepsumethanon
 5,8Supaporn Wacharapluesadee
 5,8Thiravat Hemachudha

¹Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
²Chulalongkorn GenePRO Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
³Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
⁴Department of Electrical Engineering, Faculty of Engineering, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand
⁵WHO Collaborating Center for Research and Training on Viral Zoonoses, Bangkok, Thailand
⁶Clinical Research Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
⁷Queen Saovabha Memorial Institute, Bangkok, Thailand
⁸Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Running Title: Rabies antigen and inflammation localization in canine furious and paralytic rabies.

Correspondence: Professor Shanop Shuangshoti, MD, Department of Pathology, Chulalongkorn GenePRO Center and WHO Collaborating Center for Research and Training on Viral Zoonoses, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama 4 Road, Bangkok 10330, Thailand.
 Phone: +66-2-256-4235; Fax: +66-2-652-4208
 e-mail: Shanop@gmail.com

Abstract

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 entire neuraxis. Postmortem examination of brains and spinal cords from furious and paralytic rabid dogs (5 of each) was performed. These animals were sacrificed shortly after they showed symptoms and signs of rabies. Quantitative image analysis revealed greater rabies antigen parameters (percentage of positive neurons, antigen positive area per positive neuron and antigen outside cell body) at several CNS regions of the furious dog. Viral quantities were highly 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.

Keywords: Rabies, furious rabies, paralytic rabies, rabies antigen, inflammation

Introduction

Rabies is an incurable and almost universally fatal infectious disease of the central nervous system (CNS). The disease is caused by a neurotropic RNA virus of genotype 1 in the family *Rhabdoviridae*, genus *Lyssavirus* (Rupprecht *et al*, 2002). The worldwide number of rabies deaths as estimated by the World Health Organization survey in 1998 was 55,000 annually with the highest incidence in Asia (Knobel *et al*, 2005). Approximately 21 patients (0.03 per 100,000 populations) die of rabies each year in Thailand (Chuxnum and Choomkasien, 2010).

Rabies can manifest either as furious or paralytic in humans and dogs. Limbic symptoms dominate the clinical picture in the former, whereas paralysis of lower motor neuron type dominates the latter (Mitrabhakdi *et al*, 2005). The ratio between furious and paralytic rabies in human cases is approximately 3: 1 (Hemachudha *et al*, 2002). Furious rabies patients tend to survive shorter (average 5.7 days compared to 11 days in paralytic form) (Mitrabhakdi *et al*, 2005). The mechanisms contributed to the two distinct clinical forms remain enigmatic.

Several recent clinical, electrophysiological, and neuropathological findings suggested possible different mechanisms for the furious and paralytic forms of rabies. Dysfunction of peripheral nerves, axon- or myelinopathy, is responsible for clinical weakness in paralytic rabies (Hemachudha *et al*, 2005). Electrophysiological studies demonstrated spinal cord anterior horn cell dysfunction in the case of furious rabies despite absence of weakness. This was supported by identification of central chromatolysis of the neurons at postmortem examination (Mitrabhakdi *et al*, 2005).

Although previous magnetic resonance (MR) imaging studies in human rabies patients revealed no differences between both clinical forms (Laothamatas *et al*, 2003), our recent study in canine rabies at the early stage of disease has shown

otherwise (Laothamatas *et al*, 2008). Abnormal lesion localization was similar in both clinical forms at the inferomedial temporal lobes, hippocampi, hypothalami, brainstem, and upper spinal cord. However, this was more pronounced in paralytic cases. This should be explained by timing of examination which may be relatively late in human rabies cases.

Regarding the amount of rabies virus and degree of inflammation, there were no differences in antigen distribution or amount and in inflammation degree in furious and paralytic rabies patients at post-mortem examination (Tirawatnpong *et al*, 1989). However, rabies antigen was mainly confined to midline structures of thalamus, brainstem and basal ganglia in patients who died earlier than 5 days. Such localization at thalamus, brainstem particularly at midbrain, and basal ganglia was found in the case of rabies infected dogs at early stage regardless of clinical forms. Greater quantities of rabies viral RNA were detected in the brains of furious dogs than its paralytic counterpart. Greater numbers of cytokine mRNAs transcripts were demonstrated in paralytic dog brains. Further, interleukin- 1β and interferon- γ mRNAs were found exclusively in the case of paralysis (Laothamatas *et al*, 2008). Timing of examination, late in the disease course in the case of humans, should be the explanation.

It is plausible that abnormal MR imaging, which is more intense in paralytic rabies infected dogs, may be influenced by degree of CNS immune responses. The immune responses may partly explain why there is less amount of viral load in the brains of paralytic dogs. Nevertheless, there has been no available data on virus amount at spinal cord of patients or dogs with furious and paralytic rabies particularly at the early stage when consciousness remains preserved. The current study was aimed to evaluate the distribution of rabies antigen and inflammation in the central

nervous system of canine furious and paralytic rabies at the early stage of disease, whether they correlate with the recent MRI and cytokine findings in rabid dogs.

Materials and Methods

Animals

Ten naturally rabies-infected dogs, 5 of each clinical forms (furious and paralysis), were enrolled in the study. None of them had previously been vaccinated. Each animal was brought in by owner and was observed for rabies symptoms at the quarantine and diagnostic unit of the Queen Saovabha Memorial Institute. All had been bitten by other unowned dogs. Sites of bites were mainly the head and face. After symptoms suggestive of rabies developed, the diagnosis was confirmed by identification of rabies viral RNA in saliva by nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) (Wacharapluesadee and Hemachudha, 2001). Categorization of canine furious or paralytic rabies was based on the following clinical features; aggression and biting behavior in furious and hind limb paresis with none or only mild degree of aggression in paralytic rabies (Tepsumethanon *et al*, 2005). All of them were sacrificed for rabies examination during when they remained fully conscious. Brains were available for pathological examination in all cases while spinal cords were obtained in 6 cases (3 of each clinical form).

Collection of samples and tissue preparations

Brain and spinal cord tissues from 11 brain and 4 spinal cord anatomical locations were fixed with 10% buffered formalin. The regions included neocortices (frontal, parietal, temporal, and occipital regions), cerebellum, caudate nucleus, hippocampus (including CA1–4 regions), thalamus, brainstem (midbrain, pons and medulla) and

spinal cord (cervical, thoracic, lumbar, and sacral levels). All specimens were routinely processed and embedded in paraffin wax. Four-micrometer-thick sections of all paraffin blocks were stained with hematoxylin and eosin. Standard indirect immunohistochemical method was carried out by automated stainer (Ventana Benchmark LT, Tucson, USA), using anti-rabies nucleocapsid polyclonal antibody (Bio-Rad; Marnes-la-Coquette, France) at a dilution of 1:80. Negative control was performed by omission of the primary antibody.

Quantitative analysis of rabies antigen

All immunostained slides, prepared from various anatomical sites as mentioned, were digitally captured in color by digital camera (Nikon DXM1200F) attached to microscope (Nikon ECLIPSE 80i) (Nikon Instech Co., Ltd., Japan) at 400x magnification, covering an area of 0.0705 mm². As many as 10-20 fields (0.7-1.41 mm²) were examined for each slide. Images were saved as 3840 x 3072 Jpeg files.

All neurons in each area (except those in the dentate gyrus of hippocampus) were manually outlined by Adobe Photoshop. Quantitative assessment was performed by a computer-aided system for microscopic images (Cell Image Analyzer) (Fig. 1) (Phukpattaranont *et al*, 2009). Parameters assessed included 1) percentage of positive neurons, 2) average number of antigen dot per positive neuron, 3) average antigen area in positive neuron, and 4) percentage of antigen area outside neuronal cell body. For the dentate gyrus (Fig. 2), the entire dentate area was manually outlined. Extent of viral antigen was expressed by percentage of antigen area to the total dentate area outlined above.

Semi-quantitative analysis of inflammatory response

Inflammatory response in each anatomical site was semi-quantitatively scored by one of us (Knobel *et al*). Scores 0 to 3 represented the following: 0 = no inflammation, 1 = mild inflammation (mild microglial activation without formation of microglial nodule and/or mild perivascular lymphocytic cuffings); 2 = moderate inflammation (microglial activation with formation of microglial nodule and moderate lymphocytic perivascular cuffings), and 3 = marked inflammation (microglial activation with formation of microglial nodule with extension of microglia aggregates outside nodules, severe perivascular lymphocytic cuffings with aggregates of lymphocytes outside the perivascular area).

Statistical analysis

All antigen parameters were compared between the furious and paralytic groups of rabid dogs using the Mann-Whitney U test for a one-tailed test. Statistical analyses were performed using Statistical Package for Social Science software (SPSS version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

Results

Pattern of rabies antigen

Rabies antigen-positive neurons

In both furious and paralytic rabies, spinal cord neurons were most severely infected, followed by brainstem neurons (Table 1). Cerebral cortical neurons were the least affected group of nerve cells examined. The percentage of rabies antigen-positive neurons was significantly greater in the furious dogs as compared to the paralytic in

the frontal ($p = 0.038$) and occipital ($p = 0.029$) lobes. No significant difference was observed at the parietal and temporal cortices, caudate, thalamus, hippocampal cornu ammonis, and cerebellum. The viral antigen was ubiquitous in the brainstem neurons of both clinical forms with no significant difference. Viral antigen was also widespread in the spinal cord of both forms, with significantly greater number noted in furious dogs at the cervical ($p = 0.025$), lumbar ($p = 0.025$), and sacral ($p = 0.025$) levels. Two of the five furious canines with absence or nearly absence of viral antigen in the cerebrum revealed numerous rabies antigen-containing neurons in the spinal cord.

Rabies antigen dot per positive neuron

In furious and paralytic rabies, the average number of antigen dots per infected neuron was greatest in the spinal cord and brainstem neurons (Table 1). There was, however, no significant difference between the two clinical forms in all anatomical regions, except for the cervical spinal cord where greater number was observed in the furious canines ($p = 0.025$).

Rabies antigen area per positive neuron and in hippocampal dentate fascia

In each clinical form (furious and paralytic), rabies antigen-positive area within infected neuron was greater in the brainstem and spinal cord, compared to the supratentorial structures and the cerebellum (Table 1). The average rabies antigen area was larger in furious than paralytic group at several brain regions; including occipital cortex ($p = 0.038$), hippocampal cornu ammonis ($p = 0.023$), caudate nucleus ($p = 0.038$), thalamus ($p = 0.025$), midbrain ($p = 0.014$), medulla ($p = 0.043$), and cervical cord ($p = 0.025$). At the hippocampal dentate fascia, percentage of antigen-positive

area was also significantly greater in the furious rabies as compared to paralytic (0.43 vs 0.01%, $p = 0.042$).

Percentage of antigen area outside neuronal cell body

Rabies antigen outside neuronal cell body was frequently observed at the brainstem and spinal cord of furious canine. Percentage of the antigen area was greater in the furious dogs as compared to paralytic at multiple anatomical sites (Table 1); including the frontal cortex ($p = 0.024$), temporal cortex ($p = 0.038$), occipital cortex ($p = 0.024$), hippocampal cornu ammonis ($p = 0.024$), brainstem, and spinal cord at the cervical ($p = 0.025$) and thoracic ($p = 0.025$) levels.

Pattern of inflammation

Inflammatory response in the brain of both clinical forms was generally mild. More intense inflammation was, however, appreciated at the brainstem of paralytic dogs than in the furious counterpart (p values = 0.002, 0.007, 0.01, at the midbrain, pons, and medulla, respectively) (Fig. 3). The degree of inflammation in the paralytic dog brainstem gradually decreased along the caudal length of spinal cord. Mild inflammation was observed in the brainstem and spinal cord of furious canines.

Discussion

It is intriguing why rabies can manifest as furious or paralysis. This is particularly distinct in human and dog. The observation that the same rabid dog transmitted paralytic rabies to one and furious to another may suggest differential response of host (Hemachudha *et al*, 1988). Sequence analysis of glycoprotein (G), nucleoprotein and phosphoprotein genes of rabies virus isolated from human patients and dogs with

1 furious and paralysis did not show any specific pattern (Hemachudha *et al*, 2003).

2 Study of genetic diversity of the G gene of rabies virus within a single rabies infected
3
4 dog by comparing the cloned sequences in the virus population showed closely related
5
6 heterogeneous populations with minor substitutions at nucleotide and amino acid
7
8 levels (Khawplod *et al*, 2006).
9
10

11
12 Comprehensive neuroanatomical distribution of rabies nucleocapsid viral antigen
13
14 has been reported in 10 dogs infected with street virus (Suja *et al*, 2009). The overall
15
16 distribution of viral antigen was essentially the same in all animals, with greater
17
18 involvement of the brainstem than the supratentorial structures. In the cerebral
19
20 hemisphere, antigen was maximally found in the frontal lobe. Involvement of the
21
22 limbic system, hippocampus, amygdala, cingulate gyrus, and the indiseum griseum
23
24 was also pronounced. Despite the detailed anatomic description, only dogs with
25
26 furious rabies were studied, and no spinal cord was available for examination. In our
27
28 study, examination of rabies antigen by using combined approach; percentage of
29
30 positive neurons, average number of antigen dot per positive neuron, average antigen
31
32 area in positive neuron, and percentage of antigen area outside neuronal cell body,
33
34 may offer a more accurate assessment than examination of percentage of positive
35
36 neurons alone (Table 1).
37
38
39
40
41
42
43

44 In line with the above study (Suja *et al*, 2009), the furious dogs in our cohort
45
46 also demonstrated greater amount of viral antigen in the brainstem than in the
47
48 supratentorial structures. In addition, we demonstrated that the spinal cord was the
49
50 most severely affected site where almost all neurons contained rabies antigen.
51
52
53 Preferential involvement of the midline structures (thalamus, basal ganglia, and
54
55 brainstem) regardless of the clinical forms was similar to the studies in rabies patients
56
57 who died earlier than 5 days (Tirawatnpong *et al*, 1989) and in dogs at the early stage
58
59
60
61
62
63
64
65

of disease (Laothamatas *et al*, 2008). However, no preferential involvement of the frontal cortex was found among the neocortices as previously described (Suja *et al*, 2009).

Inclusion of paralytic dogs and spinal cord tissue for examination in this study has allowed us to examine thoroughly whether there were any differences in degree and in distribution of rabies antigen and inflammation in the whole CNS within the same group (brain vs spinal cord) and between the 2 groups (furious vs paralysis). With quantitative image analysis, we were able to identify greater percentage of positive neurons in furious cases, as compared to paralysis, in several regions; including the frontal and occipital cortices, as well as in the spinal cord particularly towards the caudal end. Significantly larger rabies antigen dot(s) area per positive neuron was found in furious canines at the hippocampus, caudate, thalamus, and brainstem, as well as the occipital lobe and cervical cord where the percentage of infected neurons was also greater. Granular neurons in the dentate gyrus of hippocampus appeared to be affected more severely in furious cases than in the other form. In addition, percentage of positive antigen area outside the neuronal cell body, presumably representing antigen in the neuronal cell processes, was also greater in several regions in furious dogs (cerebral cortices, hippocampus, brainstem, and spinal cord). All of these findings imply that the virus in furious form of rabies is more aggressive, with greater ability to widely colonize the CNS.

The brainstem neurons were extensively involved in both forms of rabies. The most intrigue finding in this region is the more intense inflammation noted in the paralytic dogs, compared to the furious. The entire spinal cord of both clinical forms was full of viral antigen, including 2 paralytic dogs in which the antigen in the brain was absent or nearly absent. This finding suggests that, in paralytic rabies,

1 inflammatory response at the brainstem might act as a barrier that impedes viral
2 entrance to the brain, from the bites at the head and face into the cranial nerves and
3 brainstem.
4
5

6
7 It has been shown that inflammatory cells in furious street dogs undergo
8 apoptosis, thereby interfering with release of cytotoxic cytokines and preventing cell
9 lysis (Suja *et al*, 2009). This finding is in line with the previous demonstration of
10 early triggering of Fas ligand (FasL) production in rabies-infected neurons, leading to
11 the destruction of migratory T cells by the Fas/FasL apoptosis pathway (Baloul *et al*,
12 2004). However, if apoptosis does occur in leukocytes in paralytic dogs, it would
13 enhance viral spreading into the brain. The opposite is true in paralytic dogs in our
14 cohort where a lesser extent of virus was found in the brain. In addition, our previous
15 demonstration of greater cytokine mRNAs in paralytic dog brains argues against
16 leukocyte dysfunction (Laothamatas *et al*, 2008). A possible difference in apoptotic
17 pattern of the inflammatory cells between the furious and paralytic rabies is under
18 investigation.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 In conclusion, distribution of rabies antigen and inflammatory response differs
37 between the furious and paralytic rabies at the early stage of disease. Rabies virus
38 appears to be more aggressive, with greater ability for dissemination in the furious
39 subtype, compared to the paralytic counterpart. Virus is ubiquitous in the brainstem
40 and spinal cord in both clinical forms. Inflammatory response is, however, more
41 severe at the brainstem of paralytic dogs. Rabies virus quasispecies and/or different
42 host immune response might contribute to the diverse clinical forms of rabies
43 encephalitis.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund (DBG5180026), Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (HR1160A), and Ratchadapisek Somphot Endowment Fund (to Dr Shanop Shuangshoti) Chulalongkorn University, Thailand.

References

- Baloul L, Camelo S, Lafon M (2004). Up-regulation of Fas ligand (FasL) in the central nervous system: a mechanism of immune evasion by rabies virus. *J Neurovirol* **10**: 372-82.
- Chuxnum T, Choomkasien P (2010). Epidemiology of Human Rabies in Thailand, B.E.2546 - 2550 (2003 - 2007 AD). *Tren Res Sci Technol* **2**: 71-5.
- Hemachudha T, Laothamatas J, Rupprecht CE (2002). Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Neurol* **1**: 101-9.
- Hemachudha T, Phanuphak P, Sriwanthana B, Manutsathit S, Phanthumchinda K, Siriprasomsup W, Ukachoke C, Rasameechan S, Kaoroptham S (1988). Immunologic study of human encephalitic and paralytic rabies. Preliminary report of 16 patients. *Am J Med* **84**: 673-7.
- Hemachudha T, Wacharapluesadee S, Lumlertdaecha B, Orciari LA, Rupprecht CE, La-Ongpant M, Juntrakul S, Denduagboripant J (2003). Sequence analysis of rabies virus in humans exhibiting encephalitic or paralytic rabies. *J Infect Dis* **188**: 960-6.
- Hemachudha T, Wacharapluesadee S, Mitrabhakdi E, Wilde H, Morimoto K, Lewis RA (2005). Pathophysiology of human paralytic rabies. *J Neurovirol* **11**: 93-100.
- Khawplod P, Shoji Y, Ubol S, Mitmoonpitak C, Wilde H, Nishizono A, Kurane I, Morimoto K (2006). Genetic analysis of dog rabies viruses circulating in Bangkok. *Infect Genet Evol* **6**: 235-40.

- Knobel DL, Cleaveland S, Coleman PG, Fevre EM, Meltzer MI, Miranda ME, Shaw A, Zinsstag J, Meslin FX (2005). Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull World Health Organ* **83**: 360-8.
- Laothamatas J, Hemachudha T, Mitrabhakdi E, Wannakrairot P, Tulayadaechanont S (2003). MR imaging in human rabies. *AJNR Am J Neuroradiol* **24**: 1102-9.
- Laothamatas J, Wacharapluesadee S, Lumlertdacha B, Ampawong S, Tepsumethanon V, Shuangshoti S, Phumesin P, Asavaphatiboon S, Worapruekjaru L, Avihingsanon Y, Israsena N, Lafon M, Wilde H, Hemachudha T (2008). Furious and paralytic rabies of canine origin: neuroimaging with virological and cytokine studies. *J Neurovirol* **14**: 119-29.
- Mitrabhakdi E, Shuangshoti S, Wannakrairot P, Lewis RA, Susuki K, Laothamatas J, Hemachudha T (2005). Difference in neuropathogenetic mechanisms in human furious and paralytic rabies. *J Neurol Sci* **238**: 3-10.
- Phukpattaranont P, Limsiroratana S, Boonyaphiphat P (2009). Computer-aided system for microscopic images: Application to breast cancer nuclei counting. *Int J Appl Biomed Eng* **2**: 69-74.
- Rupprecht CE, Hanlon CA, Hemachudha T (2002). Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis* **2**: 327-43.
- Suja MS, Mahadevan A, Madhusudhana SN, Vijayasarithi SK, Shankar SK (2009). Neuroanatomical mapping of rabies nucleocapsid viral antigen distribution and apoptosis in pathogenesis in street dog rabies--an immunohistochemical study. *Clin Neuropathol* **28**: 113-24.
- Tepsumethanon V, Wilde H, Meslin FX (2005). Six criteria for rabies diagnosis in living dogs. *J Med Assoc Thai* **88**: 419-22.
- Tirawatnpong S, Hemachudha T, Manutsathit S, Shuangshoti S, Phanthumchinda K, Phanuphak P (1989). Regional distribution of rabies viral antigen in central nervous system of human encephalitic and paralytic rabies. *J Neurol Sci* **92**: 91-9.
- Wacharapluesadee S, Hemachudha T (2001). Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies. *Lancet* **358**: 892-3.

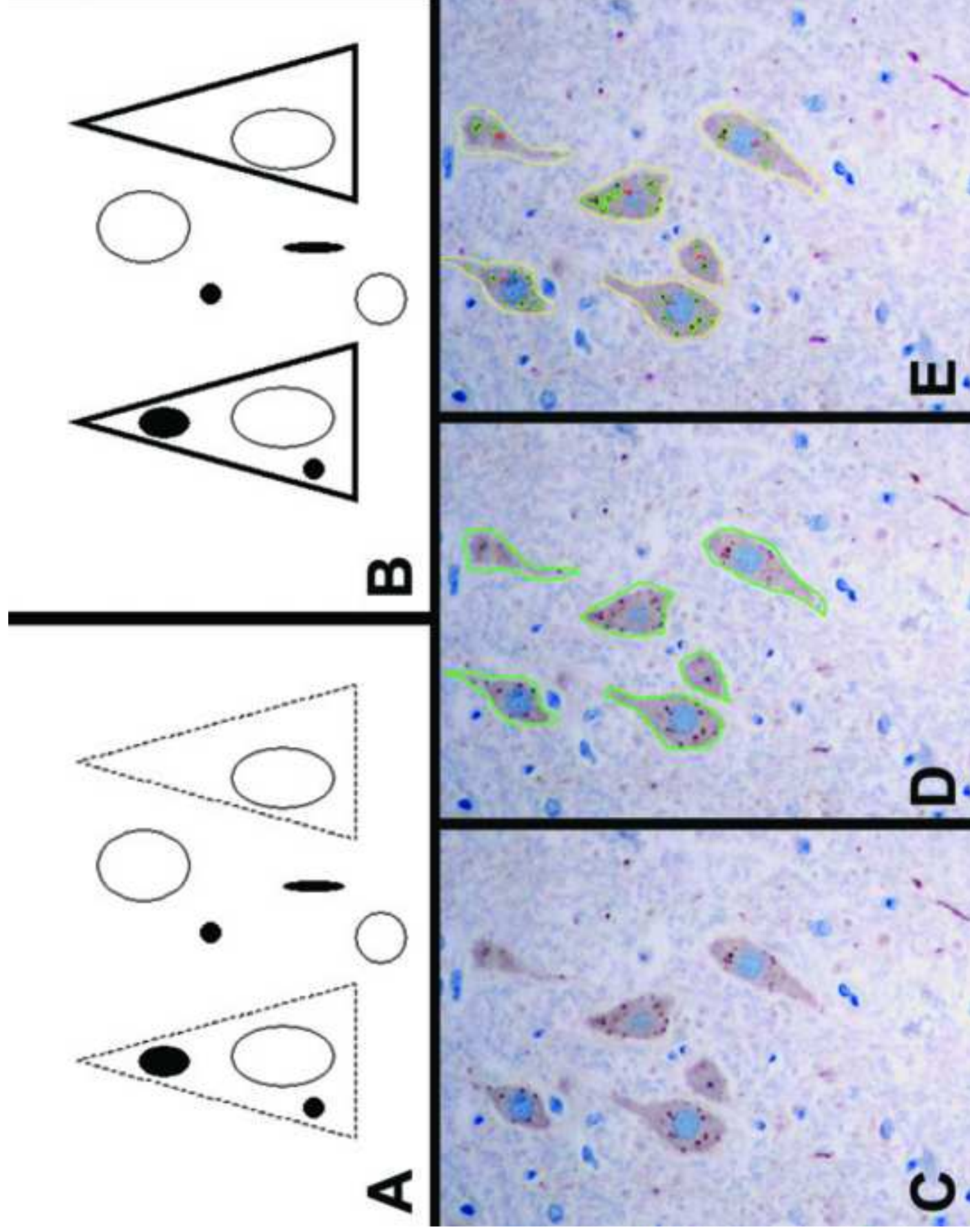
Legend for Figures

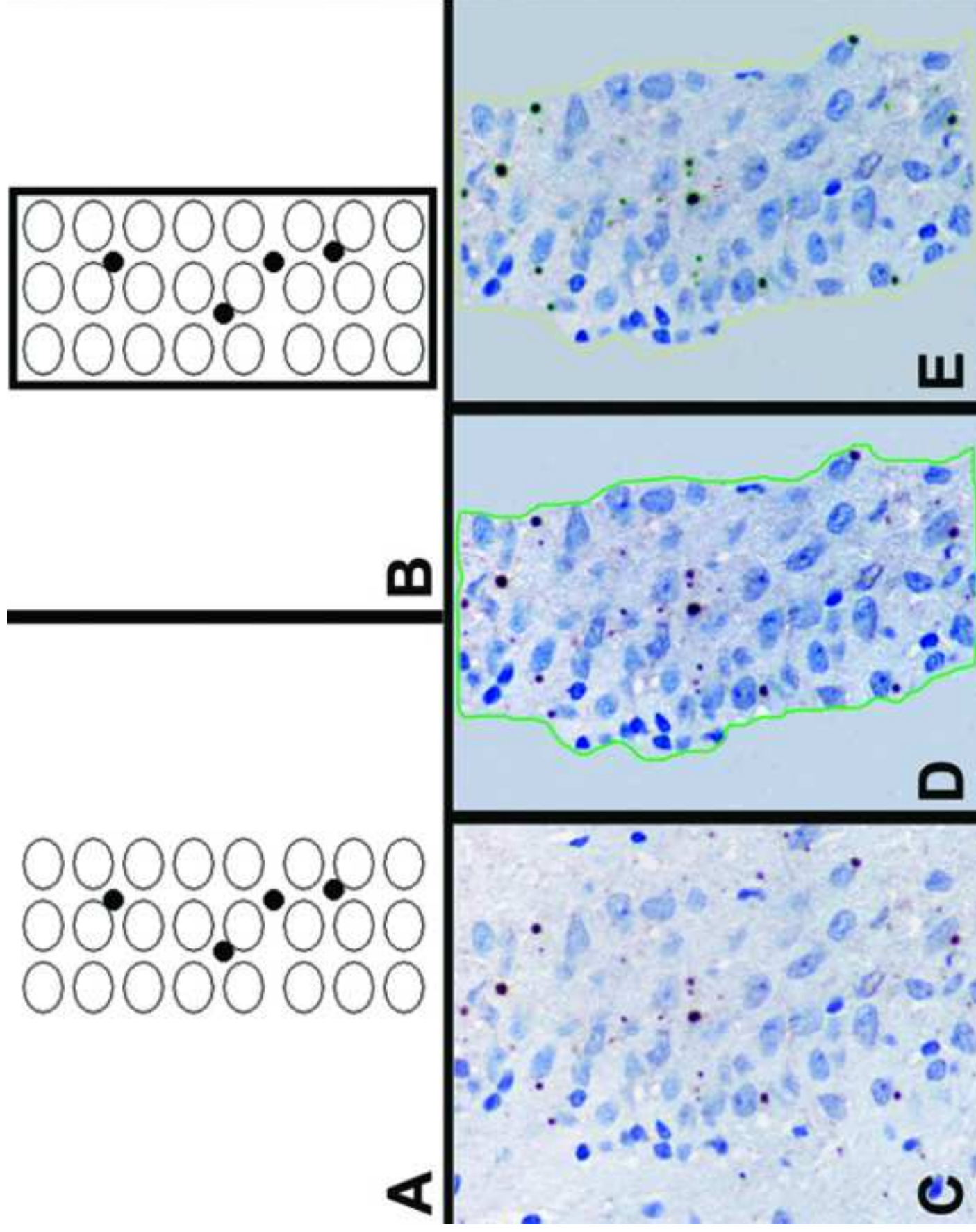
Fig 1. Quantitative analysis of rabies antigen (for all regions except hippocampal dentate fascia). *Upper panel:* Diagram shows 2 neurons (triangles) and 2 non-neuronal cells (circles without surrounding triangle) (A). Black areas represent rabies antigen within neurons and outside cell body (in the neuropil background). All neurons are outlined (B) and computer program calculates 4 antigen parameters: 1.) percentage of positive neurons, 2) average number of antigen dot per positive neuron, 3) average antigen area in positive neuron, and 4) percentage of antigen area outside neuronal cell body. *Lower panel:* Neurons in an original image of rabies immunostain (C) are manually outlined (D), and undergo image analysis to detect rabies antigen (E).

Fig 2. Quantitative rabies antigen analysis for hippocampal dentate fascia. *Upper panel:* Diagram shows granular neurons of the hippocampal dentate fascia (white circles) and rabies antigen (black dots) (A). The entire dentate area is outlined (B), and computer program calculates percentage of the antigen area to the total dentate area. *Lower panel:* Original hippocampal dentate fascia stained with rabies antibody (A) is outlined (B), and undergoes image analysis to detect rabies antigen within the dentate fascia (E).

Fig 3. Inflammation of the nervous system in canine rabies. More intense inflammation is observed at the brainstem of paralytic rabies compared to the furious counterpart; p values = 0.002, 0.007, 0.01, at the midbrain, pons, and medulla, respectively (A). Inflammation in the brain and spinal cord is generally mild in both clinical forms. In the X-axis (A); C, T, L and S stand for cervical, thoracic, lumbar,

and sacral, respectively. Pathology of brainstem in paralytic (B) and furious (C) canines is shown (hematoxylin and eosin stain). Note intense inflammation in the paralytic rabies.





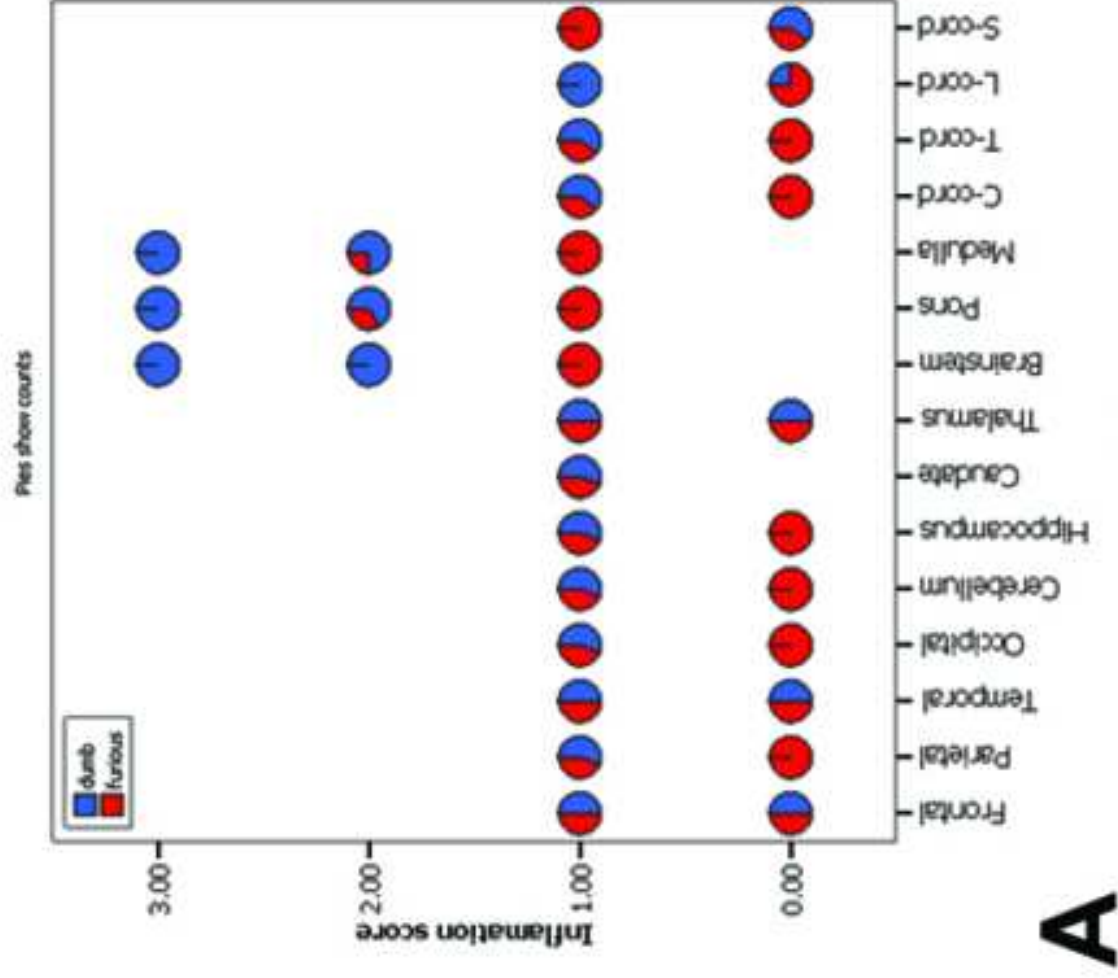
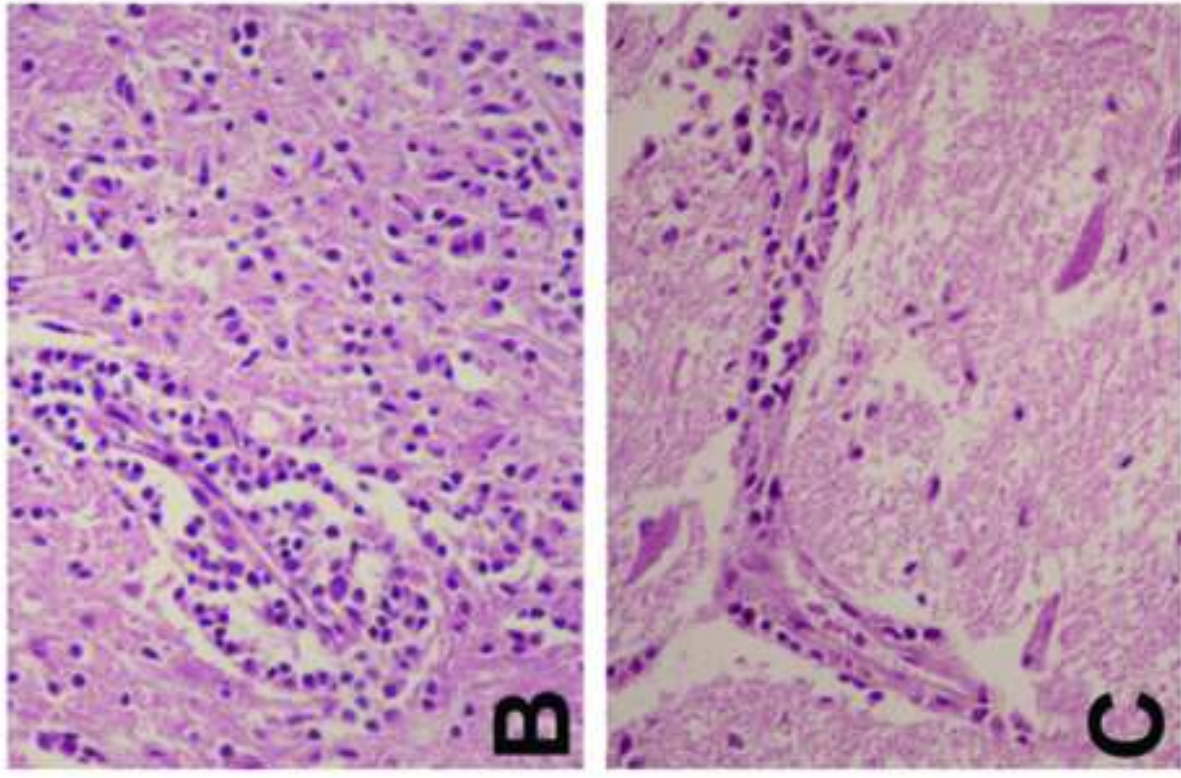


Table 1. Extent of rabies viral antigen in canine furious and dumb rabies

Locations	% RVA-positive neurons (Mean ± SD)		P	Number of RVA dots per positive neuron (Mean ± SD)		P	% RVA-positive area per positive neuron (Mean ± SD)		P	% RVA area outside cell body (Mean ± SD)		P
	Dumb Rabies	Furious Rabies		Dumb Rabies	Furious Rabies		Dumb Rabies	Furious Rabies		Dumb Rabies	Furious Rabies	
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 ± 1.86	<u>0.023</u>
Parietal lobe	30.4 ± 26.52	39.8 ± 21.6	0.301	1.69 ± 1.14	1.66 ± 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 ± 11.19	37.2 ± 25.66	<u>0.029</u>	1.19 ± 0.78	1.48 ± 0.31	0.377	1.44 ± 1.49	3.8 ± 2.06	<u>0.038</u>	0.2 ± 0.41	1.96 ± 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	0.058	1.18 ± 0.72	1.65 ± 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 ± 28.09	56 ± 32.42	0.109	1.59 ± 0.94	2.48 ± 0.93	0.134	1.34 ± 0.97	2.76 ± 0.79	<u>0.025</u>	0.26 ± 0.28	1.02 ± 0.83	0.071
Cerebellum	50.8 ± 30.78	68 ± 14.07	0.232	2.05 ± 1.22	1.94 ± 0.49	0.232	1.87 ± 1.06	2.97 ± 2.67	0.458	0.3 ± 0.44	0.76 ± 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	59.6 ± 36.81	84 ± 8.41	0.110	4.71 ± 4.08	6.02 ± 1.95	0.163	3.07 ± 2.3	7.49 ± 2.87	<u>0.043</u>	0.83 ± 1.26	5.9 ± 4.79	<u>0.025</u>
Cervical cord	84.33 ± 17.6	97.37 ± 2.47	<u>0.025</u>	5.29 ± 2.83	10.87 ± 1.01	<u>0.025</u>	4.6 ± 1.5	9.84 ± 3.65	<u>0.025</u>	1.38 ± 0.85	4.64 ± 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>	8.26 ± 7.09	12.07 ± 4.04	0.138	6.47 ± 0.65	8.56 ± 2.51	0.063	1.69 ± 1.09	3.64 ± 1.59	0.063
Sacral cord	60.13 ± 8.98	97.1 ± 1.51	<u>0.025</u>	8.25 ± 9.53	12.9 ± 5.86	0.138	4.02 ± 4.92	8.34 ± 3.2	0.138	1.13 ± 1.512	4.31 ± 1.5	0.063

RVA = Rabies viral antigen, SD = standard deviation. * Underlined p values indicate statistical significance.



Short communication

Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus

Supaporn Wacharapluesadee^{a,*}, Jittapawan Sutipanya^a, Sudarat Damrongwatanapokin^b, Patta Phumesin^a, Pornchai Chamnanpood^b, Chaweewan Leowijuk^b, Thiravat Hemachudha^a^a Molecular Biology Laboratory for Neurological Diseases, Department of Medicine, Chulalongkorn University Hospital, Rama 4 Road, Bangkok 10330, Thailand^b Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2008

Received in revised form 17 April 2008

Accepted 8 May 2008

Available online 24 June 2008

Keywords:

Rabies virus

Real-time RT-PCR

Diagnosis

ABSTRACT

Diagnosis of rabies relies on the fluorescent antibody test (FAT) from brain impression smears. The mouse brain inoculation test is used to confirm FAT but requires weeks until the result is known. TaqMan real-time PCR has been described for rabies viral RNA detection; however, this is burdened by primer and probe binding site mismatches. The purpose of this study was to develop a TaqMan real-time RT-PCR assay as an adjunct to FAT, based on national data of 239 rabies nucleoprotein sequences from rabies-infected brain specimens collected between 1998 and 2003. Two showed as many as 3 mismatches. However, mismatches on primer and/or probe binding sites did not affect amplification or detection. One hundred and forty-three brain samples submitted for rabies diagnosis from all over the country between 2005 and 2007 were also tested. Results were concordant with FAT. Thirteen rabies proven samples from Myanmar, Cambodia, Indonesia and India; 3 of which had up to 7 mismatches at primer/probe binding sites, could be detectable. Challenge Virus Standard, a fixed virus strain with 4 mismatches at probe binding site, could not be detected but remained amplified. This assay could be used as an adjunct to FAT and may serve as a rabies surveillance tool.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Rabies virus is a negative sense, single stranded RNA virus which belongs to the genus *Lyssavirus* of the family *Rhabdoviridae*. Its single-stranded RNA contains about 12,000 nucleotides associated with the 5 viral proteins: the nucleoprotein (N), the phosphoprotein, the matrix protein, the glycoprotein and polymerase (Rupprecht et al., 2002). The dog is the major reservoir and vector. Worldwide human mortality from rabies was estimated to be 55,000 deaths per year (Knobel et al., 2005). In Thailand, as many as 25% (338 of 1359 samples) of animal brains submitted for rabies testing during 2006 were rabies confirmed (Report of Department of Livestock Development). Rabies diagnosis in animal brains is based on the fluorescent antibody test (FAT) as the standard technique. The classic mouse inoculation test (MIT) (Koprowski, 1996) can lead to considerable delay, requires facilities for experimental animals, and is labor intensive. Real-time PCR methods have been developed and evaluated for the detection of rabies viral RNA (Black et al., 2002; Hughes et al., 2004; Wakeley et al., 2005; Nagaraj et al., 2006; Foord et al., 2006; Saengseesom et al., 2007).

The number of sequence mismatches between TaqMan primer and probe set and target sequences of rabies viruses significantly affects amplification and detection (Hughes et al., 2004; Wakeley et al., 2005).

In this study, a TaqMan real-time reverse transcription (RT)-PCR assay for the detection of rabies viral RNA in brain tissue specimens was developed based on rabies genetic sequence data acquired during the nationwide survey in Thailand between 1998 and 2003 (Denduangboripant et al., 2005). Analysis of 239 partial N gene sequences of rabies virus, isolated from rabies-infected humans and animals, revealed a single monophyletic tree of 2 distinct phylogroups (Denduangboripant et al., 2005). One phylogroup consists of 3 subgroups, distributed in the central region of the country, whereas another consists of 8 that are widely distributed throughout the country.

Sequence divergence may have impacted on the efficiency of the amplification or detection steps of TaqMan real-time RT-PCR assay. All previous RNA extracts of 239 samples collected between 1998 and 2003 (Denduangboripant et al., 2005), as well as those of rabies-infected animals and humans from Myanmar, Cambodia, Indonesia and India (5, 1, 4 and 3 samples, respectively) obtained during 2003–2006, and Challenge Virus Standard (CVS),

* Corresponding author. Tel.: +66 2 256 4000x3561; fax: +66 2 652 3122.
E-mail address: spwa@hotmail.com (S. Wacharapluesadee).

a fixed rabies virus strain, were included for analysis. RNA was extracted from brain tissue specimens with RNeasy lipid tissue minikit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. For other type of specimens, RNA was extracted by using the silica-guanidine thiocyanate protocol, NucliSense Isolation Reagent (Biomerieux, Boxtel, The Netherlands). Further evaluation was also performed on animal brain specimens submitted for rabies diagnosis in Thailand during 2005–2007.

The primers and probe targeting conserved sequences in rabies N gene of the above mentioned 239 isolates, GenBank accession numbers AY849022 to AY849260, were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (performed by Dr. Yingyos Avihingsanon, Chulalongkorn University Hospital). The forward primer (1129F 5'-CTGGCAGACGACGGAACC-3') and the reverse primer (1218R 5'-CATGATTGAGTATAGACAGCC-3') amplified a 90 base pairs fragment. The fluorescent probe (RB probe 5'-TCAATTCTGATGACGAGGATTACTTCTCCGG-3') was designed to anneal to a sequence internal to the PCR primer. The fluorescent reporter dye, a 6-carboxyfluorescent (FAM) was located at the 5'-end of the probe and the quencher 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA) was located at the 3'-end. Real-time RT-PCR was performed in a Roche LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with 20 µl glass capillaries. TaqMan real-time RT-PCR reactions were performed in a final volume of 20 µl using the QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Each reaction contained 10 µl of 2× QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix, 2.4 µl of RNase-free water, 0.2 µl of QuantiTect RT Mix, 1.0 µl of 20 µM of each primer, 0.4 µl of 10 µM of probe and 5 µl of RNA extract. Control samples in each run included rabies positive RNA extract and water instead of rabies RNA extract as negative control. Cycling conditions included reverse transcription at 50 °C for 20 min, incubation at 95 °C for 15 min, and 45 cycles of 95 °C for 0 s [a denature temperature of PCR profile at 95 °C for 0 s, according to the manufacturer's instructions (QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit, Qiagen)] and 60 °C for 1 min. The cycle number required to achieve a definite fluorescence signal (crossing point, CP) was calculated by the second derivative maximum method (LightCycler software version 4.05). The CP is correlated inversely with the logarithm of the initial template concentration.

The minimum detection threshold of the assay was determined by testing with known amounts of the *in vitro* transcribed negative-sense rabies RNA which were generated by T7 RNA transcription (Promega, Madison, WI, USA) of the PCR-generated DNA fragment (Logel et al., 1992). The resulting RNA was treated with DNase I to remove the DNA templates, purified with an RNA column (Qiagen), quantified by spectrophotometry, and expressed as copy numbers/ml. The *in vitro* runoff transcripts contained 338 bases of street rabies virus sequence (GenBank accession number DQ267925). This was complementary to primers and probe. A linear curve was obtained as the amount of input negative-sense RNA increased from 4.0 copies to 4×10^6 copies per reaction. The lowest detection limit was 4.0 copies per reaction (CP = 36.96). The specificity of the assay was tested against other 6 encephalitis viruses, including enterovirus, cytomegalovirus, varicella-zoster, herpes simplex, Epstein-Barr, and dengue viruses. No amplification was observed. The results confirmed the specificity of the assay (data not shown).

One hundred and sixty-eight out of 239 Thai rabies isolates had nucleotide sequences identical to designed forward and reverse primers as well as the probe. The remaining isolates were defined according to varieties of mismatch at primers or probe regions (Table 1, only representatives were shown). Twenty-five samples had 1 or 2 mismatch(es) in forward primer (category 1); 29 samples had 1 mismatch in probe (category 2); 7 samples had 1 mismatch in reverse primer (category 3); 2 samples had mismatches in both

forward primer and probe (category 4); 2 samples had 1 mismatch each in forward and reverse primers (category 5); 6 samples had 1 mismatch each in probe and reverse primer (category 6). There was no specimen that had mismatch in all 3 regions of forward primer, probe and reverse primer. Six categories of mismatch were summarized in Table 1.

In order to determine the validity of the assay and the effects of sequence variations, TaqMan real-time RT-PCR was applied to all previously extracted RNA of 239 isolates during 1998 and 2003. All were successfully amplified and could be detected by the probe. Total RNA yields from dog brain tissue, determined by spectrophotometry, were in the range of 16.17–367.38 µg/ml or 0.081–1.836 µg/reaction. There was no correlation between the amount of total RNA (of the brain and virus) and CP of real-time PCR in samples with and without mismatches (Table 1).

Thirteen rabies samples from Myanmar (5), Cambodia (1), Indonesia (4) and India (3), could be amplified and detected by TaqMan real-time RT-PCR. Four Myanmar, 1 Cambodian and 1 Indian samples had target sequences identical to primers and probe (Table 2). The remaining Myanmar sample had one mismatch each in forward primer and probe. Two Indonesian and 1 Indian samples had 4, 5 and 2 mismatches in primer alone or primer(s) and probe (Table 2). As many as 7 mismatches between the viral sequence and that of the TaqMan primer and probe set were found in 2 of the Indonesian and 1 of the Indian samples. Three mismatches in probe binding site were found in these 2 Indonesian samples. These samples had CP values at 23.21 and 17.45 (S618 and S621, respectively) but the maximum fluorescence value, representing the efficiency of probe-target binding at endpoint of the reaction, was low (data not shown). No significant effect was found on this Indian sample with 2 mismatches in probe binding site (Table 2). All 13 samples could be detected by SYBR green real-time RT-PCR (Qiagen) using the same primer pair (1129F/1218R). Six dilutions of CVS RNA extracts (ranging from 2 to 2×10^5 ng per reaction) were subjected to real-time RT-PCR. They could be detected by SYBR green but not by TaqMan real-time RT-PCR. An amplicon of the correct size was produced following the TaqMan RT-PCR assay (as determined by agarose gel electrophoresis). Four mismatches at probe binding site were found in CVS (Table 2).

This assay was evaluated further on 143 clinical samples obtained from 4 Regional Veterinary Research and Development Centers (Northern upper zone 25; Eastern 78; Northeastern upper zone 15; Southern 10 samples) and National Institute of Animal Health (15 samples), Department of Livestock Development. These samples were collected between 2005 and 2007 and tested for rabies virus using standard FAT and MIT. These brain samples belonged to different animal species, such as dog, corvine, elephant, hamster, guinea pig, rabbit, goat and cow.

All 143 brain samples of positive (58) or negative (85) FAT and MIT results were tested blindly at each individual facility with TaqMan real-time RT-PCR using its own extraction method. TaqMan real-time RT-PCR was performed in a final volume of 20 µl using the LightCycler RNA Master HybProbe (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Each reaction contained 7.5 µl of LightCycler RNA Master HybProbe, 1.3 µl of 50 mM Mn(OAc)₂, 6.8 µl of RNase-free water, 1.0 µl of 20 µM of each primer, 0.4 µl of 10 µM of probe and 2 µl of RNA extract. The reactions were then carried out in the LightCycler 2.0 instrument (Roche Diagnostics). Cycling conditions included reverse transcription at 61 °C for 20 min, incubation at 95 °C for 2 min, and 45 cycles of 95 °C for 2 s and 60 °C for 1 min. The results of TaqMan real-time RT-PCR were in accord with standard FAT and MIT results despite differences in extraction and amplification methods.

Certain mismatches between sequences of TaqMan primer and probe set and the target are detrimental to amplification and detec-

Table 1Categories of mismatches from nationwide survey samples during 1998–2003^a

Category/accession number	RNA ^b (μg/ml)	TaqMan result, CP ^c	Mismatch position ^d (nucleotide change)		
			F	P	R
1. Mismatch in forward primer region					
AY849025	40.14	15.59	1(A)	–	–
AY849030	69.58	13.15	15(G)	–	–
AY849031	162.15	13.85	3(T)	–	–
AY849033	16.71	15.89	15(G)	–	–
AY849055	49.50	14.83	12(T)	–	–
AY849067	89.58	15.43	12(T), 15(G)	–	–
AY849074	121.96	15.77	15(G)	–	–
AY849122	26.56	16.29	12(T)	–	–
2. Mismatch in probe region					
AY849105	32.87	15.25	–	30(A)	–
AY849106	234.83	22.11	–	13(G)	–
AY849139	90.10	21.45	–	30(A)	–
AY849140	73.48	14.96	–	11(C)	–
AY849183	367.28	14.99	–	23(T)	–
AY849194	266.62	17.77	–	11(C)	–
3. Mismatch in reverse primer region					
AY849023	47.34	16.14	–	–	14(G)
AY849053	205.17	17.09	–	–	2(A)
AY849056	96.39	18.10	–	–	1(A)
AY849072	75.37	16.12	–	–	4(C)
AY849192	49.65	25.87	–	–	7(T)
4. Mismatch in forward primer and probe regions					
AY849024	53.85	15.36	12(T), 18(G)	7(G)	–
AY849113	50.76	18.35	15(G)	23(T), 29(T)	–
5. Mismatch in forward and reverse primer regions					
AY849042	53.34	14.64	1(T)	–	14(A)
AY849241	58.36	14.56	12(T)	–	10(C)
6. Mismatch in probe and reverse primer regions					
AY849250	115.38	21.20	–	2(T)	7(T)
AY849258	24.30	17.93	–	2(T)	7(T)
AY849242	17.39	15.93	–	14(T)	10(C)
AY849259	26.09	15.52	–	14(T)	10(C)

^a Only representative samples were shown.^b Total RNA concentration of purified nucleic acid from brain tissue specimens.^c Crossing point.^d The nucleotide mismatch position between the target sequences and those of the forward primer (F), probe (P) and reverse primer (R). The total numbers of oligonucleotide of forward primer, probe and reverse primer were 18, 31 and 22 base pairs, respectively.**Table 2**

Results of TaqMan and SYBR green real-time RT-PCR on CVS virus and from other Asian samples

Number	Source/country	PCR result: TaqMan/SYBR green	Mismatch position ^a (nucleotide)			
			F	P	R	T
CVS	Laboratory strain	–/+	9(T)	5(C), 20(C), 23(T), 29(T)	1(A)	6
U71	Human/Myanmar	+/+	–	–	–	0
U87	Human/Myanmar	+/+	–	–	–	0
U640	Human/Myanmar	+/+	–	–	–	0
S871	Human/Myanmar	+/+	–	–	–	0
U121	Human/Myanmar	+/+	1(T)	16(T)	–	2
U563	Human/Cambodia	+/+	–	–	–	0
S618	Dog/Indonesia	+/+	1(T), 9(T)	20(C), 23(T), 29(T)	7(T), 10(C)	7
S619	Dog/Indonesia	+/+	1(T), 9(T)	23(T), 29(T)	10(C)	5
S620	Dog/Indonesia	+/+	1(T), 9(T)	23(T), 29(T)	–	4
S621	Dog/Indonesia	+/+	1(T), 9(T)	20(C), 23(T), 29(T)	10(C), 22(A)	7
A45	Dog/India	+/+	9(T), 18(T)	8(G), 20(C)	1(A), 7(T), 10(T)	7
R43	Human/India	+/+	–	–	–	0
R73	Human/India	+/+	–	–	7(T), 10(T)	2

^a The nucleotide mismatch position between the target sequences and those of the forward primer (F), probe (P) and reverse primer (R). The total numbers of oligonucleotide of forward primer, probe and reverse primer were 18, 31 and 22 base pairs, respectively. The total number (T) of mismatches is also shown.

tion. Mismatches of at least 4 nucleotides at primers and probe as well as mismatching of nucleotides between target and the center of probe have been suggested to significantly affect the outcome (Hughes et al., 2004). Mismatches at the probe binding site have the greatest effect on TaqMan assay (Smith et al., 2002). Two mismatches in the probe binding site resulted in a slight reduction in efficiency but no detectable influence on sensitivity (Yao et al., 2006). In this study, the maximum of 3 mismatches in TaqMan primer and/or probe set was found in samples from all over the country collected between 1998 and 2003. A maximum of 2 mismatches in probe region was found in only one sample (AY849113). These did not have any effect on detection system (Table 1). The number of mismatches in TaqMan primer and probe set varied from 2 to 7 in samples from Myanmar, Indonesia and India (Table 2). An earlier report demonstrated that even 5 mismatches in the probe binding position could still generate a detectable signal, although with a substantial reduction in efficiency and sensitivity (Yao et al., 2006). This was also true in the 2 Indonesian samples with 3 mismatches in the probe region. Nevertheless, mismatches in the probe binding position may remain significant. CVS virus with 6 mismatches (4 at probe) could be amplified but was not detectable by probe. Therefore, both numbers and positions of mismatches may prevent the generation of a fluorescent signal although the PCR itself can proceed normally. One Myanmar sample (U121; Table 2) had a mismatch at the center of the probe at position 16 of 31 nucleotides. There was no demonstrable effect on generation of the fluorescent signal as previously reported (Hughes et al., 2004). It is not certain to what extent that mismatches at the center of probe can adversely affect the outcome since samples studied were limited.

The fact that this real-time RT-PCR assay with TaqMan probe could identify the rabies variant prevalent in Thailand (from 1998 to 2007) as well as those in bordering countries (Myanmar, Cambodia) and in Indonesia and India, may suggest that it can be applicable for rabies RNA detection in Thailand and, perhaps, in this wider region if more samples can be tested and their sequences evaluated. Target sequences and primer binding sites may be less sensitive for mismatch as compared to that in the probe. Two to five mismatches were found in forward/reverse primer regions in samples from Indonesia and India (Table 2), yet a signal could be successfully generated by SYBR green assay.

The results suggest that TaqMan real-time RT-PCR assay, based on partial rabies N sequence, is a reliable and sensitive test for the detection of viral RNA from brain specimens. It may serve as an adjunct or even to confirm the results of FAT with the understanding that genetic sequence data must be constantly updated. It also may serve as a surveillance tool for newly emerged rabies variants

or variants that originate from different geographical locations if non-concordant results are found between FAT or SYBR green and TaqMan real-time RT-PCR. Sequencing or use of variant-specific primers and probe should further elucidate these findings.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development, Thailand, the Thailand Research Fund (grant DGB4880001) and the Thai Red Cross Society, Thailand. We also acknowledge the help from the Division of Research Affair, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in the preparation of this manuscript.

References

- Black, E.M., Lowings, J.P., Smith, J., Heaton, P.R., McElhinney, L.M., 2002. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. *J. Virol. Methods* 105, 25–35.
- Denduabboripant, J., Wacharapluesadee, S., Lumlertdacha, B., Ruankaew, N., Hoonsuwan, W., Puanghat, A., Hemachudha, T., 2005. Transmission dynamics of rabies virus in Thailand: implications for disease control. *BMC Infect. Dis.* 5, 52.
- Foord, A.J., Heine, H.G., Pritchard, L.I., Lunt, R.A., Newberry, K.M., Rootes, C.L., Boyle, D.B., 2006. Molecular diagnosis of lyssaviruses and sequence comparison of Australian bat lyssavirus samples. *Aust. Vet. J.* 84, 225–230.
- Hughes, G.J., Smith, J.S., Hanlon, C.A., Rupprecht, C.E., 2004. Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus RNA: influence of sequence variation and application to quantification of viral loads. *J. Clin. Microbiol.* 42, 299–306.
- Knobel, D.L., Cleaveland, S., Coleman, P.G., Fevre, E.M., Meltzer, M.I., Miranda, M.E., Shaw, A., Zinsstag, J., Meslin, F.X., 2005. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull. World Health Organ.* 83, 360–368.
- Koprowski, H., 1996. The mouse inoculation test. In: Meslin, F.-X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (Eds.), *Laboratory Techniques in Rabies*, 4th ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 80–86.
- Logel, J., Dill, D., Leonard, S., 1992. Synthesis of cRNA probes from PCR-generated DNA. *Biotechniques* 13, 604–610.
- Nagaraj, T., Vasanth, J.P., Desai, A., Kamat, A., Madhusudana, S.N., Ravi, V., 2006. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *J. Clin. Virol.* 36, 17–23.
- Rupprecht, C.E., Hanlon, C.A., Hemachudha, T., 2002. Rabies re-examined. *Lancet Infect. Dis.* 2, 327–343.
- Saengseesom, W., Mitmoonpitak, C., Kasempimolporn, S., Sitprija, V., 2007. Real-time PCR analysis of dog cerebrospinal fluid and saliva samples for ante-mortem diagnosis of rabies. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 38, 53–57.
- Smith, S., Vigilant, L., Morin, P.A., 2002. The effects of sequence length and oligonucleotide mismatches on 5' exonuclease assay efficiency. *Nucleic Acids Res.* 30, e111.
- Wakeley, P.R., Johnson, N., McElhinney, L.M., Marston, D., Sawyer, J., Fooks, A.R., 2005. Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5 and 6. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2786–2792.
- Yao, Y., Nelläker, C., Karlsson, H., 2006. Evaluation of minor groove binding probe and TaqMan probe PCR assays: influence of mismatches and template complexity on quantification. *Mol. Cell. Probes* 20, 311–316.

A Longitudinal Study of the Prevalence of Nipah Virus in *Pteropus lylei* Bats in Thailand: Evidence for Seasonal Preference in Disease Transmission

Supaporn Wacharapluesadee,¹ Kalyanee Boongird,² Sawai Wanghongsu,² Nitipon Ratanasetyuth,¹
Pornpun Supavonwong,¹ Detchat Saengsen,² G.N. Gongal,³ and Thiravat Hemachudha¹

Abstract

After 12 serial Nipah virus outbreaks in humans since 1998, it has been noted that all except the initial event in Malaysia occurred during the first 5 months of the year. Increasingly higher morbidity and mortality have been observed in subsequent outbreaks in India and Bangladesh. This may have been related to different virus strains and transmission capability from bat to human without the need for an amplifying host and direct human-to-human transmission. A survey of virus strains in *Pteropus lylei* and seasonal preference for spillover of these viruses was completed in seven provinces of Central Thailand between May 2005 and June 2007. Nipah virus RNA sequences, which belonged to those of the Malaysian and Bangladesh strains, were detected in the urine of these bats, with the Bangladesh strain being dominant. Highest recovery of Nipah virus RNA was observed in May. Of two provincial sites where monthly surveys were done, the Bangladesh strain was almost exclusively detected during April to June. The Malaysian strain was found dispersed during December to June. Although direct contact during breeding (in December to April) was believed to be an important transmission factor, our results may not entirely support the role of breeding activities in spillage of virus. Greater virus shedding over extended periods in the case of the Malaysian strain and the highest peak of virus detection in May in the case of the Bangladesh strain when offspring started to separate may suggest that there may be responsible mechanisms other than direct contact during breeding in the same roost. Knowledge of seasonal preferences of Nipah virus shedding in *P. lylei* will help us to better understand the dynamics of Nipah virus transmission and have implications for disease management.

Key Words: Bats—Transmission—Zoonosis.

Introduction

NIPAH VIRUS WAS FIRST DISCOVERED in 1999 after a major outbreak in pigs and humans occurred in peninsular Malaysia between September 1998 and April 1999. It resulted in the death of 105 out of 265 human cases, and the culling of over one million pigs (Chua et al. 1999, Goh et al. 2000). Pigs were the amplifying hosts. All human patients had occupational contact with infected pigs (Mohd Nor et al. 2000). Nipah virus has been isolated from the brain and spinal fluid of victims (Chua et al. 2000). Nipah and Hendra viruses belong to a new genus, *Henipavirus*, within the subfam-

ily Paramyxovirinae of the family Paramyxoviridae, order Mononegavirales (Wang et al. 2001). Six transcription units encode six major structural proteins: the nucleocapsid (N), phosphoprotein, matrix protein, fusion protein, glycoprotein, and large protein or RNA polymerase.

Human infections with Nipah virus continued in Bangladesh in 2001 and 2003 to 2008 with approximately 70% mortality (Table 1) (Record of WHO Regional Office for South East Asia [WHO/SEARO]). Nipah virus-associated encephalitis outbreaks were also reported from India in 2001 and 2007 (Chadha et al. 2006, WHO/SEARO record). As of February 2008, a total of 475 cases were recognized with 247

¹Molecular Biology Laboratory for Neurological Diseases, Department of Medicine, Chulalongkorn University Hospital, Bangkok, Thailand.

²Ministry of Natural Resources and Environment, Bangkok, Thailand.

³WHO Regional Office for South East Asia, New Delhi, India.

TABLE 1. MORBIDITY AND MORTALITY OF NIPAH OR NIPAH-LIKE VIRUS, ASIA-PACIFIC REGION, 1998–2008

Dates	Location	No. of cases	No. of deaths	Case fatality rate (%)
September 1998–April 1999	Malaysia	265	105	40
March 1999	Singapore	11	1	9
February 2001	Silguri, India	66	45	68
April–May 2001	Meherpur, Bangladesh	13	9	69
January 2003	Naogaon, Bangladesh	12	8	67
January 2004	Goaland, Bangladesh	29	22	76
April 2004	Faridpur, Bangladesh	36	27	75
January–March 2005	Tangail, Bangladesh	12	11	92
April 2007	Nadia, India	5	5	100
January–February 2007	Thakurgaon, Bangladesh	7	3	43
March–April 2007	Kustia, Bangladesh	8	5	62
February 2008	Manikganj and Rajbari, Bangladesh	11	6	54.5

deaths. The approximate case fatality rate was 52%. Comparing case fatality rate in Malaysian and the Indian-Bangladesh incidents, that of the latter was much higher (40% vs. 70.8%).

During the Malaysian outbreak, pigs were the apparent source for infection of humans. Domestic dogs and cats were also infected from eating pig carcasses (Yob et al. 2001). Studies of the prevalence of Nipah virus in bats showed that *Pteropus lylei* as well as other bats belonging to the same or other families (Table 2) could be infected and become reservoirs. In Malaysia, the highest seroprevalence was found in Megachiropteran bats (*Pteropodidae* family) (*Pteropus hypomelanus* [31%], *Eonycteris spelaea* [5%], and *Cynopterus brachyotis* [4%]), whereas only 3% of *Scotophilus kuhlii* (suborder of Microchiroptera) was antibody positive (Yob et al. 2001). Subsequent studies confirmed *Pteropus* bats as the main reservoir of this virus (Wacharapluesadee et al. 2005).

Relatively large amounts of urine after the morning meal (which may include the virus), type of feeding (same fruits eaten by humans and other animals), and their roosting sites (trees), which are usually close to a human community, may also be factors in enhancing viral transmission. Virus and its RNA were demonstrated in the urine and serum of flying foxes (Chua et al. 2002, Reynes et al. 2005, Wacharapluesadee et al. 2005, 2006).

Subsequent outbreaks in India and Bangladesh (Fig. 1), where pig farming was uncommon, suggested other intermediary sources or direct transmission from bats to humans. No cluster of ill animals, such as pigs, dogs, shrews, rodents, and birds, was observed or reported in Meherpur and Naogaon districts of Bangladesh (Hsu et al. 2004). Antibodies reactive to Nipah virus antigen were detected in *Pteropus giganteus* adult females. Investigations of different Nipah

TABLE 2. RANGES OF BAT SPECIES PREVIOUSLY SHOWN TO HAVE NIPAH VIRUS (ADAPTED FROM 2007 INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES RED LIST OF THREATENED SPECIES, WWW.IUCNREDLIST.ORG, DOWNLOADED ON AUGUST 24, 2008)

Species	Geographic range
<i>Pteropus hypomelanus</i>	Australia; Cambodia; Indonesia; Malaysia ^a ; Maldives; Myanmar; Papua New Guinea; Philippines; Solomon Islands; Thailand ; Viet Nam
<i>Pteropus vampyrus</i>	Brunei Darussalam; Cambodia ; Indonesia ; Malaysia ; Myanmar; Philippines; Thailand ; Tonga; Vanuatu
<i>Pteropus lylei</i>	Cambodia ^a ; Thailand ^b ; Viet Nam
<i>Pteropus giganteus</i>	Bangladesh ; China; India ; Maldives; Nepal; Pakistan; Sri Lanka
<i>Pteropus rufus</i>	Madagascar
<i>Eonycteris spelaea</i>	China; India (Andaman Is., Andhra Pradesh, Assam, Karnataka, Manipur, Meghalaya, Nagaland, Nicobar Is., Sikkim, Tamil Nadu, Uttaranchal); Indonesia; Malaysia ; Myanmar; Philippines; Thailand
<i>Cynopterus brachyotis</i>	Cambodia; China; India (Andhra Pradesh, Bihar, Goa, Karnataka, Maharashtra, Nagaland, Tamil Nadu); Indonesia (Sulawesi, Sumatera); Lao People's Democratic Republic; Malaysia ; Myanmar; Nepal; Philippines; Singapore; Sri Lanka; Thailand; Viet Nam
<i>Eidolon dupreanum</i>	Madagascar
<i>Scotophilus kuhlii</i>	Bangladesh; India; Indonesia; Malaysia ; Pakistan; Philippines; Sri Lanka; Taiwan, Province of China
<i>Hipposideros larvatus</i>	Bangladesh; Cambodia; China; India; Indonesia (Bali, Jawa, Kalimantan, Sumatera); Lao People's Democratic Republic; Malaysia (Peninsular Malaysia, Sabah, Sarawak); Myanmar; Thailand ^b ; Viet Nam

Boldface indicates countries where Nipah virus infection in bats was demonstrated by antibody detection method.

^aCountries where Nipah virus infection in bats was confirmed by isolation.

^bCountries where Nipah virus infection in bats was confirmed by RNA detection.

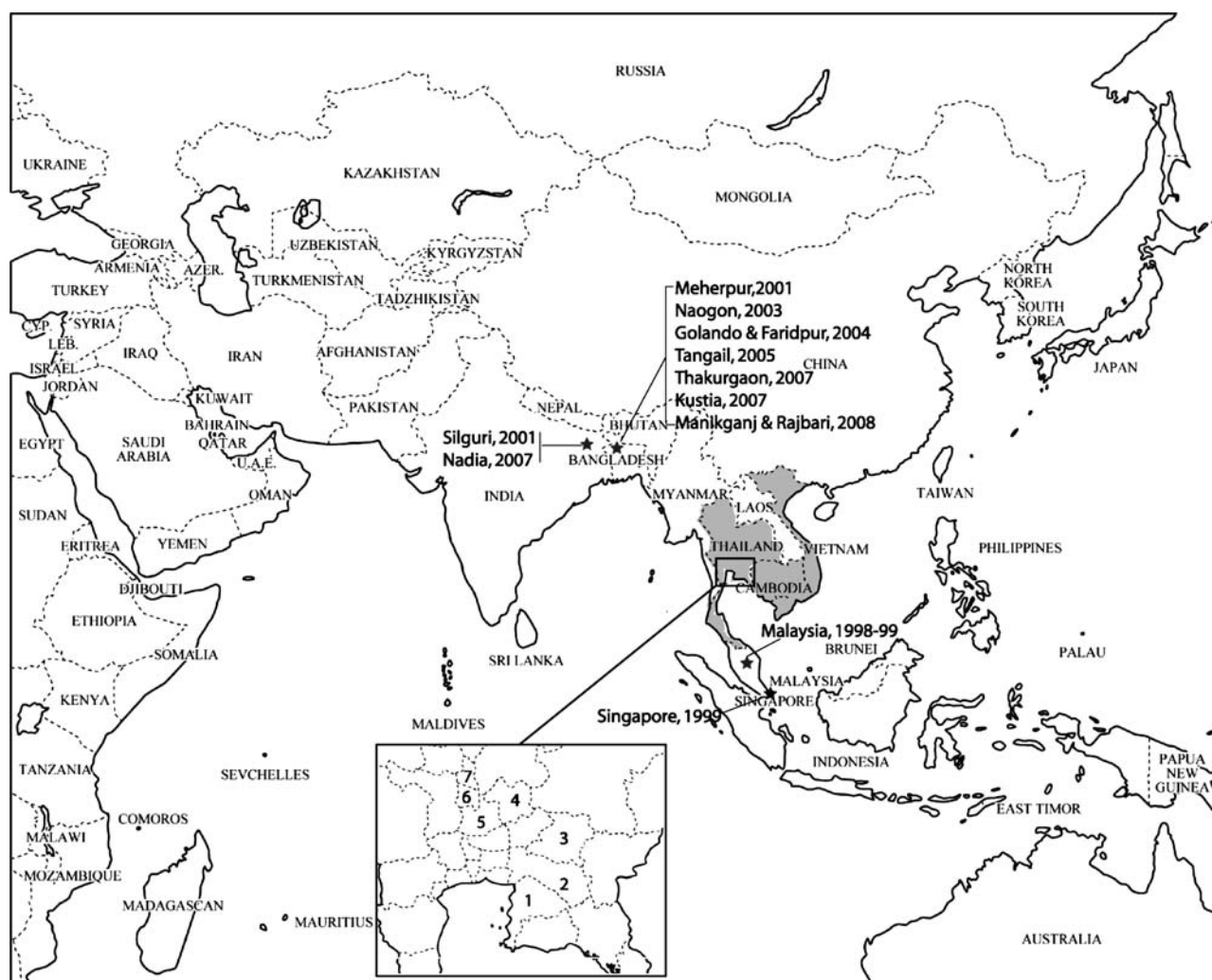


FIG. 1. Map shows field sampling locations in Thailand (detail in inset demonstrating all seven samplings sites: 1 = Chonburi, 2 = Chachoengsao, 3 = Prachinburi, 4 = Saraburi, 5 = Ayutthaya, 6 = Anghthong, and 7 = Singburi). Historic outbreak sites (designated by ★stars) in Malaysia, Singapore, India, and Bangladesh. Range of *Pteropus lylei* (shown as shaded area).

outbreaks in Bangladesh have identified different routes of transmission such as climbing trees, contact with sick persons, and contact with sick animals (Hsu et al. 2004, Gurley et al. 2007). Drinking of fresh date palm sap, possibly contaminated by fruit bats (*P. giganteus*) during the winter season, may have been responsible for indirect transmission of Nipah virus to humans (Luby et al. 2006).

Periodic excretion of Nipah virus from bat urine was suggested in one study from Malaysia (Chua et al. 2002). No virus was isolated from the urine of *P. hypomelanus* on the first two attempts in August 17, 1999, and August 23, 1999, but it was successfully isolated on the third trip (June 11, 2000). Here we report a systematic surveillance for Nipah virus infection in *P. lylei* bats in Thailand to determine whether there is a seasonal preference for virus transmission and whether this correlates to bat behavior(s). Population dynamics of *P. lylei* by bounded count method were also studied to determine the correlation between the number of bats and breeding activities.

Materials and Methods

Study sites

All of the study sites were at temples (wat). Two sites at Wat Luang, Chonburi province, and Wat Pho, Chachoengsao province, and other five roosting sites at Singburi, Ayutthaya, Saraburi, Anghthong, and Prachinburi provinces (Fig. 1; Table 3) were chosen as study sites for evidence of Nipah virus shedding. *P. lylei* bats in Wat Luang were studied monthly from May 2005 to June 2007 and at Wat Pho monthly from June 2005 to June 2007 (Table 4). Those in the remaining sites were studied three times in February, May, and October of 2006 (Table 5). The criteria for selecting the sites were based on information from the Department of National Park, Wildlife and Plant Conservation, Ministry of Natural Resources and Environment. They included bat populations of greater than 1000, whether it was possible to spread plastic sheets, and areas containing only one species (*P. lylei*). Direct observation by bat ecologists both before and during the

TABLE 3. STUDY SITES AND THEIR LOCATIONS WITH DESCRIPTIONS

Site, province	Specific location (latitude/longitude)	Site descriptions
Wat Luang, Chon Buri	13°30'18.9"N, 101°09'54.9"E, 6 m asl	A temple near community and public school
Wat Poh, Cha Choeng Sao	13°43'20.3"N, 101°12'06.7"E, 6 m asl	A temple close to a river and market
Wat Kao Chang, Sing Buri	14°45'59.2"N, 100°26'48.0"E, 13 m asl	A temple close to a river with grove of <i>Dipterocarpus</i> trees
Wat Tha Sung, Ayutthaya	14°09'13.3"N, 100°30'14.9"E, 7 m asl	A temple close to a river and forest plant
Wat Mongkolthiparam, Sara Buri	14°20'26.4"N, 100°52'08.2"E, 8 m asl	A temple in the middle of the city with roost trees close to temple's fence
Wat Chantaram, Ang Thong	14°40'13.3"N, 100°22'32.2"E, 9 m asl	A temple close to community and paddy field where there were bat roosts on figs and tamarind trees
Wat Thawabuttri, Pra Chin Buri	14°03'26.3"N, 101°21'01.4"E, 4 m asl	A temple close to a river with paddy field surroundings

asl, Above sea level.

process of bat urine collection was done to ensure that *P. lylei* was the only species. However, one of seven survey sites, Wat Chantaram, Angthong, was also found to contain two bird species (*Phalacrocorax niger* and *Casmerodius albus*) as well. Birds and bats were found together on the same tree only in October 2006. In such cases, areas where only bats were found were selected for urine collection. The plastic sheets were spread at 5 a.m., and urine was collected at 6 a.m.

Population dynamics and behavioral studies

We used the bounded count method (Choudhary 1987) to completely enumerate all *P. lylei* bats at Wat Luang between October 2005 and September 2006. Roost areas were divided into 10 sections. Bats in all sections were concurrently counted within 1 day. This process involved 10 visits by 10 skilled forest officials. Monthly population numbers were obtained based on calculations according to a formula previously described (Choudhary 1987). Behavior of bats related to breeding activities was observed during each survey to determine when the breeding season would commence and when the offspring would appear, which should coincide with an increase in population.

Urine sample collection

Bat urine samples were collected using a plastic sheet as reported previously (Chua 2003). At each site, plastic sheets were laid at 26 spots under the trees where the urine and feces of fruit bats were expected to be deposited as indicated by the presence of previous droppings. Each sheet was 1.5×1.5 m. Sterile cotton swabs were used to soak up the urine on the plastic sheet. These were immersed immediately into 9 mL of Nuclisense Lysis buffer containing guanidine thiocyanate and Triton X-100 (Biomerieux, Boxtel, The Netherlands). Two cotton swabs containing approximately 1.2 mL of bat urine were pooled in each Lysis buffer tube. The tubes were kept cold by placing them in a cooled box and transporting back to the laboratory within 24 h.

Nipah virus genome detection

Pooled bat urine samples were tested for Nipah virus using the duplex-nested RT-PCR method as described (Wacharapluesadee and Hemachudha 2007). After vortex, the urine swabs were removed from the Lysis buffer tube. Total RNA was extracted from urine specimens by using the silica-

TABLE 4. *PTEROPUS LYLEI* PCR URINE RESULTS FOR NIPAH VIRUS BY MONTH AND YEAR OF COLLECTION FROM TWO COLONIES: WAT LUANG (COLONY 1) AND WAT PHO (COLONY 2)

Locality	Year	PCR urine (no. pool positive/total)											
		January	February	March	April	May	June	July	August	September	October	November	December
Colony 1	2005					6/48	1/31	0/27	0/21	ND	0/26	0/54	0/47
	2006	<u>1/37</u>	0/42	0/26	3/80	4/51 ^a	<u>1/59</u>	0/59	0/44	0/50	0/50	ND	0/37
	2007	<u>0/50</u>	<u>3/49</u>	0/50	0/50	4/99	<u>0/50</u>						
Colony 2	2005						0/13	0/31	0/11	0/35	0/59	0/45	<u>1/25</u>
	2006	0/45	0/36	1/33	0/52	0/43	1/48	0/50	0/49	0/55	1/56	ND	0/20
Total	2007	0/44	0/51	<u>0/45</u>	0/43	2/42	0/50						
		1/176	3/178	1/154	3/225	16/283	3/251	0/167	0/125	0/140	1/191	0/99	1/129
% Positive		0.6	1.7	0.6	1.3	6.7	1.2	0	0	0	0.5	0	0.8

Underlined numbers indicate Malaysian strain, and those without, Bangladesh strain.

^aRepresents two of Bangladesh and two of Malaysian strains.

ND, not done due to flooding or technical problems.

TABLE 5. *PTEROPUS LYLEI* PCR URINE RESULTS FOR NIPAH VIRUS FROM FIVE COLONIES, COLLECTED IN 2006

Colony	Site, province	PCR urine (no. pool positive/total)		
		February	May	October
A	Wat Kao Chang, Singburi	0/33	3/48	0/30
B	Wat Tha Sung, Ayutthay	ND	1/50	0/48
C	Wat Mongkolthiparam, Saraburi	0/45	7/58	0/49
D	Wat Chantaram, Angthong	0/54	1/50	0/30
E	Wat Thawabuttri, Prachinburi	ND	3/53	0/30

ND, not done due to technical problems.

guanidine thiocyanate method according to manufacturer's protocol (Biomerieux). The extracted nucleic acid was stored at -70°C until analysis. An RNA plasmid was introduced as an internal control in the duplex RT-PCR as previously described (Wacharapluesadee and Hemachudha 2007). Five microliters of extracted samples and $2\ \mu\text{L}$ of internal control RNA were added to the One Step RT-PCR reagents (Qiagen, Valencia, CA) for first-round amplification. For nested PCR, $1\ \mu\text{L}$ of the first amplification products were added to a new PCR mixture. The $10\ \mu\text{L}$ of the PCR product was sized by gel electrophoresis in 2% agarose containing $0.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ of ethidium bromide in Tris-borate-EDTA buffer and viewed under UV light. The positive control used in this study was the constructed RNA plasmid with 29 bp insertion. The negative control (water) was included in all runs.

Analysis of the sequences

To identify the strains detected by PCR, heminested amplification was performed from the first-round PCR product as described previously (Wacharapluesadee and Hemachudha 2007). Nucleotide sequences were aligned using

CLUSTAL_X computer software version 1.81 (Thompson et al. 1997). The nucleotide sequences of N-gene at position 1197-1553 (according to GenBank accession no. NC_002728) were analyzed. The viral strain was defined by comparing similarities with other sequences deposited in the GenBank database (GenBank accession nos. NC_002728, AY988601, and AY858110 are the isolates from Malaysia, Bangladesh, and Cambodia, respectively).

Results

Bat population and behavior

During October 2005 and September 2006, bat populations at Wat Luang fluctuated between 8309 and 12,765 individuals (Table 6). With the exception of population numbers in August, during which time some trees were removed and some were cut back by pruning to remove branches, the lowest number was found in March and the highest in May. The breeding season commenced in December. Deliveries began in February, and pup separation from the mother started in May. The population decreased until August, and then increased as the next breeding season.

A 95% confidence interval for a population estimate varied most in May and November. Two sharp declines in the population occurred in the Wat Luang colony. The first incident appeared from February to March and the second in June and July (Table 6).

Temporal dynamics of virus detection

Wat Luang was found to have a higher urine positivity for the presence of Nipah virus RNA than Wat Pho (27/1137 [2.4%] vs. 6/981 [0.6%]). At Wat Luang, between May 2005 and June 2007, a total of 1137 pooled urine samples were collected. Nipah virus RNA could be detected in urine in May and June of 2005 and in January, April, May, and June of 2006 and February and May of 2007 (Table 4). Detection of Nipah virus RNA in urine was constantly found in May (positive rates of 6/48, 4/51, and 4/99 in 2005–2007).

At Wat Pho, during a similar time interval, a total of 981 pooled urine samples were collected. Virus RNA was

TABLE 6. BAT POPULATION NUMBER AT WAT LUANG DURING OCTOBER 2005–SEPTEMBER 2006

Observation date ^a	Population numbers (lower limit–upper limit) ^b	Specific behaviors
October 21, 2005	10,129 (9758–16,807)	More flying bats over roost trees than usual
November 22, 2005	11,344 (10,189–32,134)	Courting, quarreling between males while competing for a mate
December 20, 2005	11,091 (10,572–20,433)	Male grooming female, copulation, gestation
January 15, 2006	11,720 (11,475–16,130)	Copulation, gestation
February 19, 2006	10,780 (10,271–19,942)	Delivery, new born first found
March 18, 2006	9783 (9747–10,431)	Delivery and lactating
April 20, 2006	12,213 (11,801–19,629)	Lactating, pairs infant–mothers number = 2070
May 21, 2006	12,765 (11,609–33,573)	Weaning, young learn to fly
June 19, 2006	10,515 (10,384–12,873)	Young hang by themselves
July 20, 2006	10,094 (9964–12,434)	Nothing specific
August 24, 2006 ^c	8309 (8195–10,361)	Nothing specific
September 23, 2006	10,829 (10,153–22,997)	More flying bats than usual

^aObservation times were during 10 a.m.–2 p.m. in all trips.

^bAt level of significance α ($p = 0.05$).

^cSome roost trees were removed, and some were cut back by pruning to remove branches.

detected in urine in December 2005 (1/25); March (1/33), June (1/48), and October (1/56) of 2006; and in May 2007 (2/42) (Table 4).

At the remaining sites where surveys were done in February, May, and October 2006, virus RNA was detected only in May at all five sites (3/48, 1/50, 7/58, 1/50, and 3/53) (Table 5).

Temporal-spatial relationship and Nipah virus strain identification

At Wat Luang, 16 out of 23 viruses were identical to those from Bangladesh, and 7 out of 23 to the Malaysian strains. Different patterns of virus shedding were found. The Bangladesh strain was found exclusively during a 3-month interval from April to June. May was the month when virus RNA was most detectable in urine (Table 4). A more dispersed pattern (January, February, May, June, and December) was found in the case of the Malaysian strain.

At Wat Pho, four out of six viruses belonged to the Bangladesh strains, and two out of six to the Malaysian strains were found in December and March (Table 4). At the remaining five sites where the surveys were done in February, May, and October, only the Bangladesh strain was identified in May (Table 5).

Forty-four PCR-positive specimens were sequenced to confirm strain identity and true-positive results. Direct sequencing of the 41 heminested PCR-amplified products of the 357-nucleotide coding region of the nucleoprotein and subsequent sequence analyses resulted in a 92–100% homology between isolates and a 93–100%, 92–99%, and 93–98% similarity with isolates from Malaysia (NC_002728), Bangladesh, (AY988601), and Cambodia (AY858110), respectively (GenBank accession nos. EF070185–EF070190, EU603724–EU603751, EU603753–EU603758, and EU620498). A Bangladesh strain like Nipah virus with 98–99% similarity was found in 35 of 41 positive specimens. Malaysian strain-like Nipah virus with 99–100% similarity was found in 6 of 41 positive specimens. From another three samples, only nested PCR amplicons of 181-nucleotide sequences were obtained, and this resulted in 99–100% similarity to the isolate from Malaysia (GenBank accession nos. EU624735–EU624737).

Relationship between bat behavior and time of viral transmission

Courting activity was observed starting in November followed by pregnancy. This continued until January. Delivery started in February, and separation from the mother started in May. Shedding of the Bangladesh strain peaked when

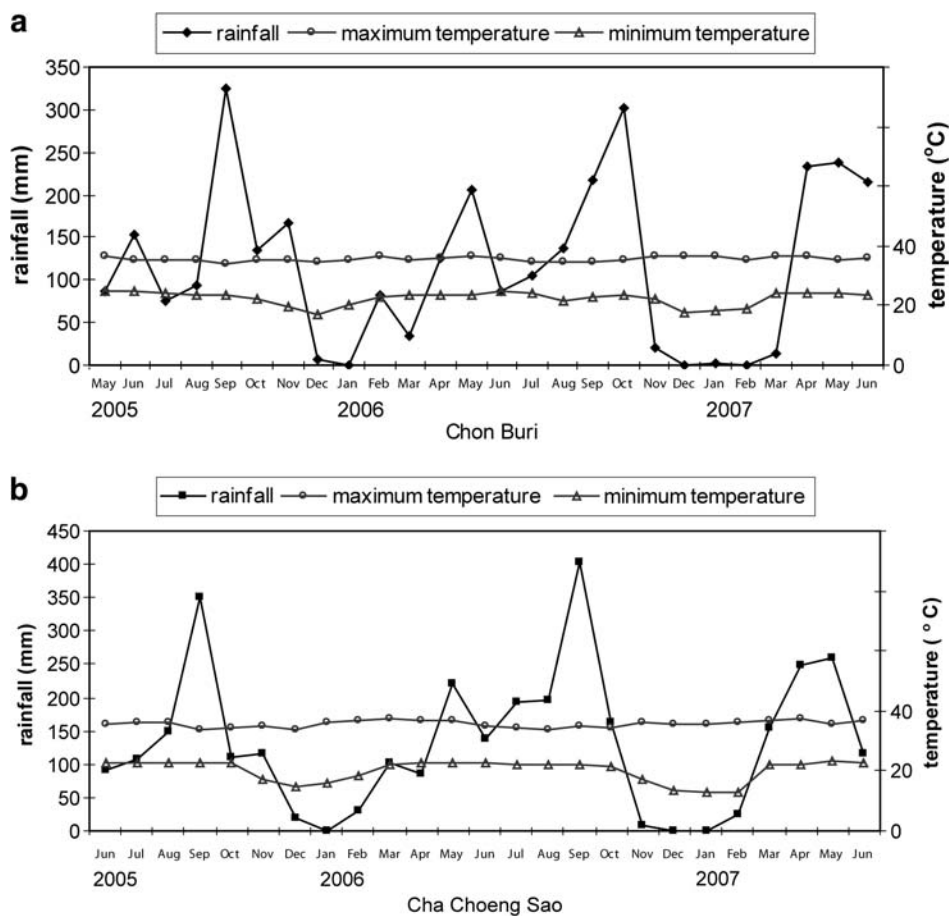


FIG. 2. Diagram showing temperature, amount of rainfall, and months of the year samples were collected in (a) Chonburi province, where Wat Luang is located, and (b) Chachoengsao province, where Wat Pho is located.

offspring separated. Dispersal of all the Malaysian strain was not related to the time of breeding, which was between December and April.

Temperature and amounts of rainfall in Chonburi and Chachoengsao provinces

The temperature and amounts of rainfall for each of the months of the year that samples were collected at two study sites are shown in Figure 2a and b. They were Chonburi and Chachoengsao provinces, where Wat Luang and Wat Pho are located. Both areas showed similar patterns of rainfall and temperature.

Discussion

This study confirms our earlier findings that *P. lylei* bats in Thailand have been infected by Nipah virus (Wacharapluesadee et al. 2005). Previous serosurveys in nine provinces in Central Thailand between March 2002 and February 2004 revealed evidence of Nipah virus infection in *P. hypomelanus* (4/26), *P. lylei* (76/813), and *Pteropus vampyrus* (1/39). Only urine of *P. lylei* was found to be Nipah virus RNA positive. Nevertheless, this does not underestimate the significance of other pteropid species because the nature of virus shedding is intermittent (Chua et al. 2002). *P. hypomelanus* and *P. vampyrus* roost on islands and forests, whereas *P. lylei* live in proximity to human households and temples, where either direct or indirect contact with humans is possible. *P. lylei*, therefore, is the focus of this study. Moreover, the finding of unusually high antibody titers in *P. lylei* suggests that Nipah virus circulates mainly in this bat species (Wacharapluesadee et al. 2005). *P. lylei* was the only bat species that was Nipah virus infected among 14 species tested in Cambodia (Reynes et al. 2005).

Wat Luang and Wat Pho were chosen as sites to determine the seasonal preference of virus transmission. These two temples were visited monthly. Wat Luang had previously been surveyed twice in February of 2003 and 2004 (antibody positive in both occasions and RNA positive only in 2004) (unpublished data). Wat Pho had been visited once in January 2003. Nipah virus antibodies and RNA had been detected (Wacharapluesadee et al. 2005).

Three other sites (Table 5) had been visited: once in 2002 (site A, Singburi, in April and site B, Ayutthaya, in October) and once in 2003 (site E, Prachinburi in April). Nipah virus antibodies by enzyme immunoassay were demonstrated in sites B and E (Wacharapluesadee et al. 2005). Nipah virus RNA was not detected in urine from sites A, B, and E. These sites were surveyed to confirm whether excretion patterns would be similar to those of Wat Luang and Wat Pho.

Low-level viral RNA shedding was detected, suggesting that herd immunity may play a role. This is less plausible, but cannot be totally excluded. Low levels of seroprevalence (9.3% [76/813]) were found in the *P. lylei* population in Thailand (Wacharapluesadee et al. 2005). An increase of seroprevalence from 7.8% in February 2003 to 18% in February 2004 and viral RNA prevalence (as detected in urine) from 0% to only 2.7%, respectively, at Wat Luang (unpublished data) may favor the role of herd immunity. In this study, RNA was taken from pooled samples, and serum antibody was not determined.

The amount of virus and/or number of shedding bats fluctuate with the season. Virus was found more frequently

during the first 5 months, which nearly coincided with the reproductive cycle. Both direct and vertical transmission may play a role. Vertical transmission has been demonstrated by the findings of Hendra virus in placental and fetal tissues (Williamson et al. 2000) and demonstration of Nipah virus in the uterus (Middleton et al. 2007). Direct contact during the reproductive cycle is facilitated by mutual grooming, copulation, and parturition. Pregnant and lactating females of *Pteropus scapulatus* had a significant risk of Hendra virus infection, which may be transmitted via faeces, urine, and saliva (Plowright et al. 2008). Finding of age-specific seroprevalence in Hendra virus-infected bats also suggests horizontal transmission (Plowright et al. 2008). In our study, we found no correlation between viral shedding and the amount of rainfall, temperature, roost sites, parturition period, and amount of food (Fig. 2a, b, and observational data since 2001 of the Department of National Park, Wildlife and Plant Conservation, Ministry of Natural Resources).

Although it was noted that viral shedding was mainly observed during the first 5 months, the peak of viral shedding (particularly of the Bangladesh strain) was detected in May at all sites (Tables 4 and 5). Physical separation from the mother was at a peak in May. This was associated with a fluctuation of population numbers that was observed only in May and correlated with juveniles in practicing flight. It has been observed that transient viral shedding in urine (1 of 6 bats) developed shortly after infection in one experiment, and virus could remain in the kidney and uterus in another experiment (2 of 11 bats) (Middleton et al. 2007). Passive transfer of Nipah virus antibody could be demonstrated from lactating females to pups (Epstein et al. 2008). Whether or not passive maternal immunity can delay viral shedding in the pup remains unclear.

Similar fluctuation of viral shedding with the seasons may be applicable to outbreaks that occurred in more northern areas of the Nipah outbreak range like India and Bangladesh. Most outbreaks were reported during the winter in Bangladesh and India, which covers the reproductive cycle of *P. giganteus* (between November and April) (Dr. Gongal, personal communication).

Viral shedding also appeared in two different patterns depending on viral strains. Some bats escaped shedding during the first 5 months of the reproduction cycle (Table 4). The Bangladesh strain showed a trend of clustering pattern of viral shedding (April, May, and June at Wat Luang; May, June, and October at Wat Pho; and only in May at the remaining five sites). Whereas with the Malaysian strain, shedding was in a dispersed pattern (January, February, May, June, and December at Wat Luang, and December and March at Wat Pho). Why there was this difference as well as why more of the RNA-positive urine samples were found in Wat Luang than in Wat Pho, though they have comparable numbers of *P. lylei* (approximately 10,000) and are only 24 km apart, cannot be answered by presently available data. It has not been known whether bats with preexisting immunity can be repeatedly infected.

Thailand as well as other countries in this region remain free of human outbreaks. This may be explained by the relatively low level of Nipah virus RNA excretion in urine (this study, Chua et al. 2002, Reynes et al. 2005, Middleton et al. 2007). However, understanding the dynamics of pteropid bat populations and of Nipah virus infection is important for risk

management strategies in the countries where a natural bat habitat is found.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund (Grant DGB4880001) and the Thai Red Cross Society. S.W. and T.H. received funding support from the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development, Thailand. We also acknowledge help from the Division of Research Affairs, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in the preparation of this manuscript.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Chadha, MS, Comer, JA, Lowe, L, Rota, PA, et al. Nipah virus-associated encephalitis outbreak, Siliguri, India. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:235–240.
- Choudhary, R. Methodology for population estimates of herbivores: a statistic approach in India conditions. *Tiger Paper* 1987; 14:11–17.
- Chua, KB. A novel approach for collecting samples from fruit bats for isolation of infectious agents. *Microbes Infect* 2003; 5:487–490.
- Chua, KB, Goh, KJ, Wong, KT, Kamarulzaman, A, et al. Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* 1999; 354:1257–1259.
- Chua, KB, Bellini, WJ, Rota, PA, Harcourt, BH, et al. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 2000; 288:1432–1435.
- Chua, KB, Koh, CL, Hooi, PS, Wee, KF, et al. Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. *Microbes Infect* 2002; 4:145–151.
- Epstein, JH, Prakash, V, Smith, CS, Daszak, P, et al. Henipavirus infection in fruit bats (*Pteropus giganteus*), India. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:1309–1311.
- Goh, KJ, Tan, CT, Chew, NK, Tan, PS, et al. Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. *N Engl J Med* 2000; 342:1229–1235.
- Gurley, ES, Montgomery, JM, Hossain, MJ, Bell, M, et al. Person-to-person transmission of Nipah virus in a Bangladeshi community. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:1031–1037.
- Hsu, VP, Hossain, MJ, Parashar, UD, Ali, MM, et al. Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:2082–2087.
- Luby, SP, Rahman, M, Hossain, MJ, Blum, LS, et al. Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:1888–1894.
- Middleton, DJ, Morrissey, CJ, van der Heide, BM, Russell, GM, et al. Experimental Nipah virus infection in pteropid bats (*Pteropus poliocephalus*). *J Comp Pathol* 2007; 136:266–272.
- Mohd Nor, MN, Gan, CH, Ong, BL. Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. *Rev Sci Tech* 2000; 19:160–165.
- Plowright, RK, Field, HE, Smith, C, Divljan, A, et al. Reproduction and nutritional stress are risk factors for Hendra virus infection in little red flying foxes (*Pteropus scapulatus*). *Proc Biol Sci* 2008; 275:861–869.
- Reynes, JM, Counor, D, Ong, S, Faure, C, et al. Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1042–1047.
- Thompson, JD, Gibson, TJ, Plewniak, F, Jeanmougin, F. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 24:4876–4882.
- Wacharapluesadee, S, Hemachudha, T. Duplex nested RT-PCR for detection of Nipah virus RNA from urine specimens of bats. *J Virol Methods* 2007; 141:97–101.
- Wacharapluesadee, S, Lumlerdacha, B, Boongird, K, Wanghongsa, S, et al. Bat Nipah virus, Thailand. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1949–1951.
- Wacharapluesadee, S, Boongird, K, Wanghongsa, S, Phumesin, P, et al. Drinking bat blood may be hazardous to your health. *Clin Infect Dis* 2006; 43:269.
- Wang, L, Harcourt, BH, Yu, M, Tamin, A, et al. Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* 2001; 3:279–287.
- Williamson, MM, Hooper, PT, Selleck, PW, Westbury, HA, et al. Experimental hendra virus infection in pregnant guinea-pigs and fruit Bats (*Pteropus poliocephalus*). *J Comp Pathol* 2000; 122:201–207.
- Yob, JM, Field, H, Rashdi, AM, Morrissey, C, et al. Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:439–441.

Address reprint requests to:

Supaporn Wacharapluesadee
Molecular Biology Laboratory for Neurological Diseases
Department of Medicine
Chulalongkorn University Hospital
Rama 4 Road
Bangkok 10300
Thailand

E-mail: spwa@hotmail.com

PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis* in necrotising non-granulomatous lymphadenitis using formalin-fixed paraffin-embedded tissue: a study in Thai patients

C Nopvichai,¹ A Sanpavat,¹ R Sawatdee,¹ T Assanasen,¹ S Wacharapluesadee,² P S Thorner,^{1,3} S Shuangshoti¹

¹ Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; ² Molecular Biology Laboratory for Neurological Diseases, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; ³ Division of Pathology, Department of Pediatric Laboratory Medicine, Hospital of Sick Children, and University of Toronto, Toronto, Canada

Correspondence to: Professor S Shuangshoti, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama IV Road, Bangkok 10330, Thailand; shanop@gmail.com

Accepted 14 April 2009

ABSTRACT

Background: Necrotising non-granulomatous lymphadenitis can be observed in several conditions, most notably infection (including tuberculosis, yersiniosis and nocardiosis), Kikuchi–Fujimoto disease and systemic lupus erythematosus.

Aims: To evaluate the role of PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in necrotising non-granulomatous lymphadenitis in Thai patients using formalin-fixed paraffin-embedded tissue.

Methods: 35 patient samples showing necrotising non-granulomatous lymphadenitis were subjected to PCR for detection of the IS6110 sequence of *M tuberculosis*. For comparison, sections were visually assessed for acid-fast bacilli using the Ziehl–Neelsen stain.

Results: Among 35 cases of necrotising non-granulomatous lymphadenitis, a conclusive diagnosis could be reached in 23 cases: 15 cases of Kikuchi–Fujimoto disease, 6 of tuberculosis and 2 of systemic lupus erythematosus. Of the 6 cases of tuberculous lymphadenitis, 4 (66.6%) were detected by PCR in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. PCR was positive in 6/12 of the remaining cases (50%) in which a definitive diagnosis could not be reached by other methods.

Conclusion: Using PCR, a significant percentage (28%) of cases of necrotising non-granulomatous lymphadenitis in this study could be attributed to *M tuberculosis*. PCR for identification of the organism can be extremely helpful in confirming a diagnosis of tuberculosis when Ziehl–Neelsen staining is negative.

Tuberculosis (TB) is a worldwide infectious disease with considerable morbidity and mortality, particularly in developing countries.¹ Involved lymph nodes typically show caseating granulomatous inflammation, but granulomata can be found in other conditions such as foreign body reaction, fungal infection or cat scratch disease.^{2–3} A histological diagnosis of TB generally relies on identification of acid-fast bacilli by Ziehl–Neelsen stain, but these can be few in number and easily missed. Otherwise, a diagnosis of TB by conventional morphology alone suffers from low sensitivity and specificity. Moreover, granulomata in TB may be poorly-formed or even absent, not only in immunocompromised but also in immunocompetent hosts.^{4–9} In TB with poorly formed or absent granuloma, lymph nodes can show necrosis with a neutrophilic infiltrate. But necrotising non-granulomatous lymphadenitis can be observed in other conditions, such as lymphoma¹⁰

and metastatic carcinoma,¹¹ and benign conditions such as Kikuchi–Fujimoto disease (KFD) and systemic lupus erythematosus (SLE).¹² Arriving at an accurate diagnosis is crucial for appropriate treatment.

Several studies have used PCR to identify *Mycobacterium tuberculosis* in specimens with granulomatous inflammation.^{6 13–19} In our previous study of necrotising non-granulomatous lymphadenitis,⁹ PCR on fresh biopsy material identified *M tuberculosis* in 8/22 (36.7%) cases but fresh tissue was unavailable in the remaining 18 cases. To the best of our knowledge, this study was the first to apply PCR for detection of *M tuberculosis* in necrotising non-granulomatous lymphadenitis. However, fresh tissue is usually more often available for cases that are clinically suspicious of TB. In order to survey a larger number of cases of necrotising non-granulomatous lymphadenitis, including those not suspected to be TB, we decided to adapt our PCR detection system for use on archival paraffin-embedded tissue samples. Thirty-five cases occurring in Thai patients were then studied in order to determine how many were positive for *M tuberculosis*.

MATERIALS AND METHODS

Case selection

Thirty-five cases of necrotising non-granulomatous lymphadenitis were retrieved from the Department of Pathology, King Chulalongkorn Memorial Hospital, between January 2000 and December 2002. H&E-stained sections were reviewed and Ziehl–Neelsen staining for acid-fast bacilli was carried out. The medical records were reviewed with respect to the aetiology of the lymphadenitis. Cases were then designated as “known” or “unknown” aetiology. In the “known” group, TB was diagnosed with positive culture or positive PCR for *M tuberculosis* on fresh tissue. The nested PCR for IS6110 sequence of *M tuberculosis* was performed on fresh tissue using a published protocol.²⁰ Cases of SLE were diagnosed using the American Rheumatology Association criteria,²¹ and KFD by a guideline provided by Bosch *et al.*²² Cases that did not meet the above criteria and in which there was a lack of follow-up were placed in the “unknown” group (recognising that some of these cases might still be TB). This study was approved by the Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

DNA extraction and PCR procedures

Genomic DNA was isolated from archival paraffin-embedded tissue, using magneSil genomic, fixed tissue system kits (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). To test DNA quality, the extract was subjected to PCR amplification of the human β -globin gene (product size = 110 bp). Cases underwent PCR for the IS6110 sequence of *M tuberculosis*.^{23 24} This DNA sequence is present in multiple locations in the *M tuberculosis* genome,²⁰ and has been shown to have the highest sensitivity and specificity for the organism, and does not amplify atypical mycobacteria.^{20 25 26} The original nested protocol²⁰ for IS6110 was modified into a simple PCR using only the inner primer sequences as follows: 5'-CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG-3' (sense) and 5'-CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG-3' (anti-sense).

The PCR mixture consisted of a total volume of 25 μ l, containing 0.2 mM dNTP each, 2.0 mM MgCl₂, 0.625 units of Taq DNA polymerase (Qiagen), 2.5 μ l of 10 $\times$ Taq polymerase buffer (supplied with enzyme), primers (0.1 μ M), and 2 μ l of DNA sample (0.25 μ g). Each PCR cycle included an initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of the following three steps: (1) 94°C for 45 seconds; (2) 63°C for 30 seconds; and (3) 72°C for 1 minute, with a final extension at 72°C for 10 minutes. PCR products were electrophoresed in a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. A positive PCR reaction resulted in a 123 bp product. Control samples included known positive and known negative formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, as well as a "no DNA" control.

Specificity and sensitivity of IS6110 gene detection

To evaluate the specificity of IS6110 gene PCR detection, the PCR products of three different samples were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Direct sequencing was performed by an ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and an ABI PRISM 310 DNA sequencer. The DNA sequence was identical for all samples, and showed 100% identity to the IS6110 sequence of *M tuberculosis* when analysed for homology with the NCBI databases by Blast analysis. GenBank accession numbers obtained in this study are FJ653661–FJ653663. To determine the sensitivity of the PCR assay, serial 10-fold dilutions of *M tuberculosis* DNA of known concentration were amplified. The limit of detection was determined to be 4 $\times$ 10⁻⁶ ng DNA per PCR reaction.

Samples with negative PCR results could be the result of some inhibitor affecting the PCR reaction. In order to rule this possibility out, two DNA specimens that tested negative by PCR were selected from each of the sample groups (TB, including the one sample positive for TB by culture alone; SLE; KFD; and unknown). Samples were spiked with *M tuberculosis* DNA (at a concentration of 4 $\times$ 10⁻⁶ ng DNA) and subjected to PCR. All samples showed an amplifiable product.

Sensitivity and specificity of the PCR reaction for *M tuberculosis* were calculated in cases with known aetiology as defined by the above criteria.

RESULTS

Clinical features and diagnostic categories of patients

Of the 35 patients, 6 were men and 29 were women with a mean age of 28.9 years (range 16–57 years). Six patients were diagnosed as having tuberculous lymphadenitis, including two patients with HIV infection. Ziehl–Neelsen stain was positive in 3/6 cases, including the two HIV-infected patients. PCR for *M*

tuberculosis performed on fresh tissue gave positive result in five cases. Only one of these cases was sent for culture, which was negative. The sixth case was positive by culture but negative by Ziehl–Neelsen stain and negative by PCR for *M tuberculosis* using fresh tissue. Two patients were diagnosed as having SLE by the American Rheumatology Association criteria, based on clinical findings and supportive laboratory testing. Fifteen cases in our series were considered to have Kikuchi–Fujimoto disease (KFD) based on a compatible clinical course, biopsy features (eg, absence of neutrophils), and negative stains for organisms.²² Follow-up data were available in 23 patients; none developed recurrent lymphadenopathy. All patients with tuberculous lymphadenitis showed clinical improvement after anti-TB drug administration, as did the SLE patients after steroid treatment. Patients with KFD were cured by lymph node excision.

The remaining 12 cases had incomplete investigations and lacked follow-up information; they were therefore placed in the "unknown" aetiology group. PCR for *M tuberculosis* on fresh tissue had not been performed in any of these 12 cases.

Results of PCR for *M tuberculosis* on archival tissue

Figure 1 presents the results of PCR for *M tuberculosis* using archival tissue. Table 1 lists the results of PCR for *M tuberculosis* according to diagnosis, and table 2 lists the results of the Ziehl–Neelsen stain. Based on the 23 cases with known aetiology of lymphadenitis, the sensitivity of PCR on formalin-fixed paraffin-embedded specimens for diagnosis of tuberculous lymphadenitis was 66% (4/6 cases), and the specificity was 100%. All cases with negative PCR on fresh tissue were also negative with archival tissue. One of five cases with positive PCR from fresh tissue showed a negative PCR result from archival material. None of the cases with positive PCR from fixed tissue were negative from fresh material. Ziehl–Neelsen stain had 50% sensitivity (3/6 cases) and 100% specificity. In the "unknown" group (12 cases), 6 were positive for *M tuberculosis* by PCR whereas none showed a positive Ziehl–Neelsen stain.

Lymph node biopsies and presence of neutrophils

All biopsies showed a necrotising process with no granuloma formation. The presence of neutrophils in lymph nodes according to diagnosis is presented in table 3. Neutrophils were present in all six known cases of TB, 1/2 SLE cases and none of the 15 cases of KFD. Neutrophils were also noted in 11/12 cases in the "unknown" aetiology category.

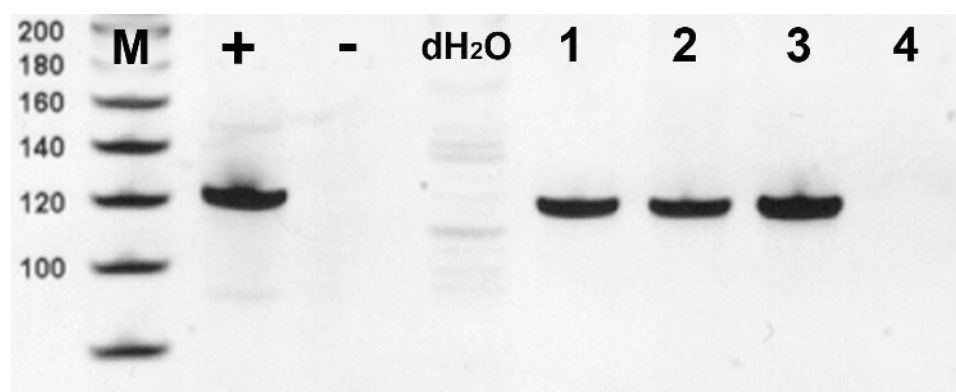
DISCUSSION

The goal of our study was to evaluate the value of PCR for diagnosis of TB in necrotising non-granulomatous lymphadenitis using archival paraffin-embedded tissue in a Thai patient population. While Ziehl–Neelsen staining is rapid and low cost, sensitivity is low unless organisms are sufficiently numerous; slide examination can be time consuming and a positive result does not distinguish *M tuberculosis* from other mycobacteria. Culture is specific but usually takes several weeks for a positive identification of *M tuberculosis* and sensitivity also depends on the number of organisms present. However, many specimens are not submitted for culture and arrive in the laboratory in formalin. Hence, we elected to develop a method to identify TB in formalin-fixed material that would enable us to study any specimen of interest.

At present, the most sensitive test for *M tuberculosis* detection is PCR.^{6 13–19 27} Not all studies have used the same conditions, leading to discrepancies in sensitivity and specificity.

Original article

Figure 1 Results of PCR for tuberculosis. PCR products were electrophoresed on 2% agarose gel containing ethidium bromide. M, standard size marker; +, positive control; -, negative control; dH₂O, distilled water; lanes 1–4, samples. Note positive PCR result in lanes 1–3. Direct sequencing of these positive PCR products yielded IS6110 sequence of *Mycobacterium tuberculosis* (see Materials and methods).



Amplification of sequences from the *mtp40* gene has a high false negative rate,²⁰ whereas sequences from the 65 kDa protein^{6 13 19 20} generate a positive result in any mycobacterial infection since these genes are shared by all species. We elected to amplify the IS6110 sequence since this sequence is specific for *M tuberculosis*,^{20 25 26} thereby increasing the specificity of the PCR reaction in the diagnosis of TB. Several studies have evaluated the use of PCR for the IS6110 sequence to diagnose TB using either fresh^{15 26} or paraffin-embedded tissue samples.^{16–20 25 28} All of these have studied granulomatous inflammation, comparing PCR results to culture and Ziehl–Neelsen staining when available. Sensitivity for confirming TB by PCR was 78–100% and specificity was 88–100%.^{6 13–20 26 28} Granulomatous disease from other causes, including other mycobacteria, was consistently negative.^{18 28}

Our study provides a preliminary evaluation of TB as a cause of necrotising non-granulomatous lymphadenitis in Thai patients. The numbers are small and a significant proportion of specimens lacked sufficient clinical information to allow a more definitive diagnosis of TB in this type of specimen. Nonetheless, to the best of our knowledge, PCR detection of *M tuberculosis* with this type of biopsy appearance has not been specifically studied except in our previous study.⁹ The next most comparable study involved fine needle aspiration specimens.²⁹ Compared to culture, PCR for *M tuberculosis* in that study showed 100% sensitivity and 94% specificity in acute suppurative lesions, and 50% sensitivity and 100% specificity in specimens showing necrosis only. Another study looking at PCR in granulomatous disease noted that 36% of biopsies without granulomata were also positive for *M tuberculosis* by PCR.¹⁶ In our series, the overall positive rate of PCR for *M tuberculosis* was 28.6% (10/35 cases). This included 4/6 known cases of tuberculous lymphadenitis and 6/12 cases of lymphadenitis of unknown aetiology (table 1). Considering cases with proven aetiology, PCR for *M tuberculosis* resulted in 66% sensitivity for detection of TB. PCR on paraffin-embedded tissue was able to determine 4/5 cases to be positive using fresh

tissue. In comparison, Ziehl–Neelsen stain provided a sensitivity of 50% (3/6 cases) (table 2). However, it should be noted that 2/3 patients with a positive Ziehl–Neelsen stain had HIV infection, and acid-fast bacilli are typically easy to identify in immunocompromised hosts.

The level of sensitivity in our study is lower than that published in previous studies in granulomatous lymphadenitis.^{6 13–20 26 28} False negatives can arise from tissue inhibitors of PCR, non-uniform distribution of microorganisms and degraded DNA.^{13 19 20 30 31} The latter is particularly relevant to tropical areas such as Thailand where storage temperatures are comparatively high.²³ The specimens in our study had been stored in paraffin for 4–6 years prior to PCR testing. This would not, however, account for the one case positive for culture but negative for PCR on both fresh and fixed tissue. This is not related to inhibitors of PCR since we tested for that and found no evidence. Another possibility would be that some strains of *M tuberculosis* do not contain the IS6110 sequence,²⁷ which would result in a negative PCR reaction in our assay. Unfortunately, the culture of this one sample is no longer available for testing by PCR to examine this hypothesis.

No false positives were detected in the other known aetiologies of lymph node necrosis (table 1), giving a specificity of 100%. However, for the 12 patients in the unknown aetiology group, 50% of these were positive for *M tuberculosis* by PCR. Similar findings have been noted by others studying granulomatous inflammation,^{13 18 19 25 26} with positive rates ranging from 9% to 67%. One interpretation could be that these positive cases represent undiagnosed TB.^{25 28} We cannot test this hypothesis since the hospital records contained limited clinical data on these patients, which is why they were placed in the “unknown” category for this study. Most authors take that view that a diagnosis of TB cannot be made on PCR alone and requires additional supportive clinical or laboratory data^{18–20 26} or response to anti-TB therapy.¹⁸

The presence of neutrophils in necrotising non-granulomatous lymphadenitis is associated with infectious conditions,

Table 1 Results of PCR for *Mycobacterium tuberculosis* by diagnosis

PCR	Diagnosis			
	Tuberculosis	Systemic lupus erythematosus	Kikuchi–Fujimoto disease	Unknown
Positive	4*	0	0	6
Negative	2	2	15	6
Total	6	2	15	12

*Two of these cases had HIV infection.

Table 2 Results of Ziehl–Neelsen staining by diagnosis

Ziehl–Neelsen stain	Diagnosis			
	Tuberculosis	Systemic lupus erythematosus	Kikuchi–Fujimoto disease	Unknown
Positive	3*	0	0	0
Negative	3	2	15	12
Total	6	2	15	12

*Two of these cases had HIV infection.

Table 3 The presence of neutrophils in different diseases

Neutrophils	Diagnosis			
	Tuberculosis	Systemic lupus erythematosus	Kikuchi–Fujimoto disease	Unknown
Present	6	1	0	11
Absent	0	1	15	1
Total	6	2	15	12

whereas neutrophils are typically absent in Kikuchi–Fujimoto disease.^{9 22 32} In the present study, neutrophils were seen in all known cases of tuberculous lymphadenitis, one of two cases of SLE lymphadenitis, but none of Kikuchi–Fujimoto disease. Moreover, the presence of the neutrophils was commonly associated with a positive PCR for *M tuberculosis*. This was also true in the cases of unknown aetiology, providing supportive evidence that at least some of these cases might be TB. Thus, when neutrophils are found in necrotising non-granulomatous lymphadenitis, it should raise a concern for TB, prompting further investigation including PCR for *M tuberculosis*.

In summary, PCR identified *M tuberculosis* DNA sequences in 28% of necrotising non-granulomatous lymphadenitis in the present study. As TB is increasing worldwide, this finding may also hold true for other regions of the world and deserves further attention. Moreover, since our PCR protocol works on formalin-fixed tissue, archival material can be studied. Surprisingly, we found that 50% of specimens without any known clinical diagnosis, also showed a positive PCR result for TB, suggesting this disease is underdiagnosed in our patient population. Our numbers are small, however, and continued study with additional samples is warranted to examine this hypothesis.

Take-home messages

- Necrotising non-granulomatous lymphadenitis can be attributed to *Mycobacterium tuberculosis*.
- PCR for identification of the organism can be extremely helpful when Ziehl–Neelsen staining is negative.

Acknowledgements: We wish to thank Dr Wanla Kulwichit for reviewing the manuscript, Dr Nibhon Udomsantisuk for providing *M tuberculosis* DNA and Mr Nipon Ratanasetyuth for technical assistance.

Funding: This work was supported by the Thailand Research Fund (DBG5180026) and the Pharmaceutical Research and Manufacturers Association of Thailand. The funding sources were not involved in any parts of this study.

Competing interests: None.

Ethics approval: Ethics approval was obtained.

Provenance and peer review: Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Varma JK, Wiriyakitjar D, Nateniyom S, *et al*. Evaluating the potential impact of the new global plan to stop TB: Thailand, 2004–2005. *Bull World Health Organ* 2007;**85**:586–92.
- Zumla A, James DG. Granulomatous infections: etiology and classification. *Clin Infect Dis* 1996;**23**:146–58.
- El-Zammar OA, Katzenstein AL. Pathological diagnosis of granulomatous lung disease: a review. *Histopathology* 2007;**50**:289–310.
- Ramanathan VD, Jawahar MS, Paramasivan CN, *et al*. A histological spectrum of host responses in tuberculous lymphadenitis. *Indian J Med Res* 1999;**109**:212–20.
- Karunatilake H, Thamilvannan N, Wimalaratna H. Lack of granuloma formation in tuberculous lymphadenitis—clue to the diagnosis of human immunodeficiency virus infection. *Ceylon Med J* 2002;**47**:37.
- Pahwa R, Hedau S, Jain S, *et al*. Assessment of possible tuberculous lymphadenopathy by PCR compared to non-molecular methods. *J Med Microbiol* 2005;**54**(Pt 9):873–8.
- Smith MB, Boyars MC, Veasey S, *et al*. Generalized tuberculosis in the acquired immune deficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 2000;**124**:1267–74.
- Hill AR, Premkumar S, Brustein S, *et al*. Disseminated tuberculosis in the acquired immunodeficiency syndrome era. *Am Rev Respir Dis* 1991;**144**:1164–70.
- Sanpavat A, Wannakrairot P, Assanasen T. Necrotizing non-granulomatous lymphadenitis: a clinicopathologic study of 40 Thai patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006;**37**:563–70.
- Saito A, Takashima S, Takayama F, *et al*. Spontaneous extensive necrosis in non-Hodgkin lymphoma: prevalence and clinical significance. *J Comput Assist Tomogr* 2001;**25**:482–6.
- Strickler JG, Warnke RA, Weiss LM. Necrosis in lymph nodes. *Pathol Annu* 1987;**22**(Pt 2):253–82.
- Grange JM. The rapid diagnosis of paucibacillary tuberculosis. *Tubercle* 1989;**70**:1–4.
- Singh KK, Muralidhar M, Kumar A, *et al*. Comparison of in house polymerase chain reaction with conventional techniques for the detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in granulomatous lymphadenopathy. *J Clin Pathol* 2000;**53**:355–61.
- Selva E, Hofman V, Berto F, *et al*. The value of polymerase chain reaction detection of Mycobacterium tuberculosis in granulomas isolated by laser capture microdissection. *Pathology* 2004;**36**:77–81.
- Rimek D, Tyagi S, Kappe R. Performance of an IS6110-based PCR assay and the COBAS AMPLICOR MTB PCR system for detection of Mycobacterium tuberculosis complex DNA in human lymph node samples. *J Clin Microbiol* 2002;**40**:3089–92.
- Park DY, Kim JY, Choi KU, *et al*. Comparison of polymerase chain reaction with histopathologic features for diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded histologic specimens. *Arch Pathol Lab Med* 2003;**127**:326–30.
- Vago L, Barberis M, Gori A, *et al*. Nested polymerase chain reaction for Mycobacterium tuberculosis IS6110 sequence on formalin-fixed paraffin-embedded tissues with granulomatous diseases for rapid diagnosis of tuberculosis. *Am J Clin Pathol* 1998;**109**:411–5.
- Salian NV, Rish JA, Eisenach KD, *et al*. Polymerase chain reaction to detect Mycobacterium tuberculosis in histologic specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;**158**:1150–5.
- Frevel T, Schafer KL, Totsch M, *et al*. PCR based detection of mycobacteria in paraffin wax embedded material routinely processed for morphological examination. *Mol Pathol* 1999;**52**:283–8.
- Marchetti G, Gori A, Catozzi L, *et al*. Evaluation of PCR in detection of Mycobacterium tuberculosis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: comparison of four amplification assays. *J Clin Microbiol* 1998;**36**:1512–7.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, *et al*. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;**25**:1271–7.
- Bosch X, Guilbert A, Miquel R, *et al*. Enigmatic Kikuchi–Fujimoto disease: a comprehensive review. *Am J Clin Pathol* 2004;**122**:141–52.
- Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl* 1991;**1**:46–50.
- Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, *et al*. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 1991;**95**:117–24.
- Li JY, Lo ST, Ng CS. Molecular detection of Mycobacterium tuberculosis in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. *Diagn Mol Pathol* 2000;**9**(2):67–74.
- Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, *et al*. Characterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1990;**28**:2668–73.
- Sajduda A, Dziadek J, Dela A, *et al*. DNA fingerprinting as an indicator of active transmission of multidrug-resistant tuberculosis in Poland. *Int J Infect Dis* 1998;**3**:12–7.
- Hsiao PF, Tzen CY, Chen HC, *et al*. Polymerase chain reaction based detection of Mycobacterium tuberculosis in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. *Int J Dermatol* 2003;**42**:281–6.
- Chantranuwat C, Assanasen T, Shuangshoti S, *et al*. Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in papanicolaou-stained fine needle aspirated smears for diagnosis of cervical tuberculous lymphadenitis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006;**37**:940–7.
- Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere M, *et al*. Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab Invest* 1994;**71**:604–11.
- Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, *et al*. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 1991;**39**:351–4.
- Onciu M, Medeiros LJ. Kikuchi–Fujimoto lymphadenitis. *Adv Anat Pathol* 2003;**10**:204–11.



PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis* in necrotising non-granulomatous lymphadenitis using formalin-fixed paraffin-embedded tissue: a study in Thai patients

C Nopvichai, A Sanpavat, R Sawatdee, et al.

J Clin Pathol 2009 62: 812-815

doi: 10.1136/jcp.2008.062828

Updated information and services can be found at:

<http://jcp.bmj.com/content/62/9/812.full.html>

These include:

References

This article cites 31 articles, 9 of which can be accessed free at:

<http://jcp.bmj.com/content/62/9/812.full.html#ref-list-1>

Article cited in:

<http://jcp.bmj.com/content/62/9/812.full.html#related-urls>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Topic Collections

Articles on similar topics can be found in the following collections

[Immunology \(including allergy\)](#) (45834 articles)

[Connective tissue disease](#) (7719 articles)

[Systemic lupus erythematosus](#) (733 articles)

Notes

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>

Failure of Rabies Postexposure Prophylaxis In Patients Presenting with Unusual Manifestations

Prapimporn Shantavasinkul,¹ Terapong Tantawichien,^{1,4}
Supaporn Wacharapluesadee,² Anuruck Jeamanukoolkit,⁵
Piyada Udomchaisakul,¹ Pairoj Chattranukulchai,⁴
Patarapha Wongsaroj,¹ Pakamat Khawplod,¹ Henry Wilde,^{2,3}
and Thiravat Hemachudha^{2,4}

¹Queen Saovabha Memorial Institute, The Thai Red Cross Society (World Health Organization Collaborating Center for Research on Rabies Pathogenesis and Prevention), Bangkok, Thailand. ²World Health Organization Collaborating Center for Research and Training in Viral Zoonoses, ³Division of Research Affairs, ⁴Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and ⁵Cardiovascular Unit, Department of Medicine, Police General Hospital, Bangkok, Thailand

(See the article by Shantavasinkul et al, on pages 56–60.)

We report an atypical case of paralytic rabies presenting with trismus followed by limb weakness, areflexia, ophthalmoparesis, and bilateral ptosis. Atypical presentations and history of rabies postexposure prophylaxis led to delayed diagnosis. Nucleocapsid and glycoprotein genes of rabies viruses from the patient's and biting dog's brains were of identical sequences.

Almost all rabies-related deaths, despite administration of post-exposure prophylaxis (PEP), are related to deviations from World Health Organization (WHO) guidelines [1]. Nevertheless, true failures without recognized defects in management have been reported [2, 3]. We recently encountered another treatment failure case with atypical tetanus-like presentation.

Case report. A 33-year-old Thai man presented with a 2-day history of high-grade fever, sore throat, headache, and watery diarrhea. At the first hospital encounter, he had rigidity of the masseter muscles (lockjaw) and slurred speech. He had difficulty eating and drinking and was noted to have excessive

salivation. Several diagnoses, including tetanus, were considered. He was subsequently transferred to a tertiary care hospital.

He experienced dog bites on his hands and right knee on 8 January 2009, 25 days earlier. Wounds included a 1-cm laceration on his right thumb that penetrated deep into the nail bed. He also had 2 puncture wounds (width, 0.2 cm) on his left hand and bleeding scratch wounds on his right knee. The dog was owned but never vaccinated. It was seen biting other dogs. The patient was attacked while catching the dog for veterinary observation. The dog died 3 days later and was proven to be rabid by fluorescent antibody test of brain specimens at the Queen Saovabha Memorial Institute (Bangkok, Thailand).

He underwent prompt local wound care at a nearby public health center. Rabies PEP was rendered within 6 h using the WHO-approved Thai Red Cross intradermal (ID) rabies vaccination schedule (modified TRC-ID regimen; 2-site ID injections on days 0, 3, 7, and 28). The vaccine used was purified chick embryo cell vaccine (Chiron Behring; batch 1630; potency, 8.94 IU/dose; expiration date, June 2012). The entire calculated dose of human rabies immunoglobulin (HRIG; 1300 IU per 8.7 mL; Berirab P; CSL; potency, 150–300 IU/mL; expiration date, September 2010) was infiltrated into and around all wounds at the same time as the first vaccination. In spite of much pain, this was also done to the wound at the nail bed by an experienced staff. Tetanus immunization was completed 1 year previously, so booster injection was not indicated. Purified chick embryo cell vaccination was continued on days 3 and 7 as scheduled. The patient also received another dose of HRIG (1300 IU) injected into the wounds on 12 January after positive results of the fluorescent antibody test of dog brain specimens became known. He became symptomatic 24 days after being bitten.

At admission, on 3 February, the patient was fully conscious and had a temperature of 39.6°C. He did not report any prodromal symptoms as often seen in rabies [4]. He refused to drink water and avoided exposure to light and draft. No phobic spasms were observed. Brief episodes of agitation alternating with lucid calm were noted. Trismus and hypersalivation were evident. Laboratory studies were unremarkable except for leukocytosis (white blood cell count, 12,200 cells/ μ L, with 85% neutrophils).

Lumbar puncture revealed a pleocytosis level of 1120 cells/ mm^3 (82% monocytes, 18% neutrophils), a protein level of 95 mg/dL, and a sugar level of 70 mg/dL. Examination of cerebrospinal fluid (CSF), saliva, and urine specimens and hair follicles using a previously described method [5] for the detection of rabies viral RNA yielded negative results.

Received 28 July 2009; accepted 2 October 2009; electronically published 8 December 2009.

Reprints or correspondence: Dr Prapimporn Shantavasinkul, Queen Saovabha Memorial Institute, The Thai Red Cross Society, 1871 Rama 4 Rd, Pathumwan Bangkok 10330, Thailand (sprapimporn@gmail.com).

Clinical Infectious Diseases 2010;50:77–9

© 2009 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

1058-4838/2010/5001-0013\$15.00

DOI: 10.1086/649873

The patient remained febrile and was restless, with profuse sweating during the second day. Trismus became more severe, and he was unable to open his mouth and speak. Intermittent spasms of the neck and back muscles were noted, but without rigidity of the axial musculature. He remained fully alert and oriented. Left facial weakness of the upper motor neuron type with bilateral incomplete ptosis was detected. Pupils were 5 mm, equally reactive to light. External squint of the right eye was shown on primary gaze. Limited adduction of the left eye was noted but without accompanying abducting nystagmus of the right eye on performing right lateral gaze. Convergence was impaired. Corneal reflexes and other cranial nerve functions were normal. There was no demonstrable weakness. Sensation was normal in all modalities. Deep tendon reflexes were 4+. Plantar responses were flexor, and clonus was absent.

Conditions deteriorated rapidly 3 h later. Proximal muscle weakness of both arms, of Medical Research Council muscle strength grading system grade 3/5, was demonstrated while it was preserved in the lower limbs. Deep tendon reflexes became all absent. He remained rational and arousable until developing sudden cardiac arrest (4 February). Brain tissue necropsy via a transorbital needle biopsy approach confirmed rabies by fluorescent antibody test and detected rabies viral RNA. The incubation period was 24 days, and survival time after onset was 4 days.

Discussion. The patient had rabies despite receiving appropriate treatment. PEP failure cases due to omissions and flaws in PEP have not been rare [6–10]. Nevertheless, there are reports of human rabies deaths that appeared to be due to true treatment failures [2, 3].

Our patient received proper wound care, vaccination, and HRIG within 6 h after being attacked. Although there were difficulties in infiltrating the wound at the nail bed of the right thumb, a great effort was made by experienced staff to infiltrate this wound with HRIG as recommended [11]. The only deviation from current WHO guidelines was the additional HRIG infiltration of the wounds 4 days after the first treatment. Nevertheless, he was able to mount a good antibody response above the level of 0.5 IU/mL [1], which is considered adequate for protection from rabies, because his neutralizing antibody level on day 27 was 1.39 IU/mL, as determined using the rapid fluorescent focus inhibition test. The HRIG potency was reassessed and found to be comparable with that of the manufacturer's export certificate (280 vs 150–300 IU/mL, respectively). Although some studies suggested that RIG may suppress the antibody production when using the Zagreb (2–1–1 IM) regimen (2 injections on day 0 and 1 each on days 7 and 21) [12, 13], the TRC-ID regimen has been shown not to have any significant suppression of antibody when RIG is administered [14, 15]. The only potential hazard of repeating HRIG infiltration, especially to the wound at the nail bed, may have been trauma to the nerves at the bite site [2]. Although it was possible that the patient might have had exposures other than the one

we encountered, our repeated careful detailed history and physical examination did not confirm such a possibility.

There have been reports of patients with rabies associated with dog bites who had unusual presentations in Thailand [16, 17]. Some resembled what has been reported in bat-associated cases [18, 19]. The patient described herein presented as paralytic rabies, because classic signs of rabies, such as autonomic dysfunction and phobic spasm, were not obvious [20]; he also had relatively spare consciousness (ie, lesser degree of aggression and agitation). However, initial manifestations were unusual consisting of lockjaw and abnormal eye movements. Lockjaw or trismus is a hallmark of tetanus [21]. Intermittent spasms of the back and neck muscles in this case might be misinterpreted as reflex spasms in tetanus. However, the most important sign of tetanus—sustained muscular rigidity, especially of the axial musculatures—was missing. Presence of trismus and paralysis of ≥ 1 cranial nerve can be a presentation of cephalic tetanus. Abnormal ocular movements, including bilateral trochlear nerve palsy (ophthalmoplegic tetanus) and downbeat nystagmus, have been reported [22]. Nonetheless, oculomotor abnormalities and facial paresis in this case appear to be manifestations of brainstem dysfunction and were unlikely due to tetanus. Our previous neuroimaging studies involving patients with rabies and rabid dogs showed the brainstem as a predilectively involved site [23, 24]. Subsequent development of weakness of limb muscles, starting at both arms where bites were incurred, followed by leg weakness accompanied by loss of deep tendon reflexes excluded tetanus and was the pattern of progression in paralytic rabies. Ascending or descending weakness can be found in paralytic rabies [25].

Miller Fisher syndrome (MFS) and Bickerstaff brainstem encephalitis (BBE), both of which are considered variants of Guillain-Barré syndrome, might complicate the diagnosis in this case [26, 27]. Ophthalmoparesis, as described in MFS and BBE, was also found in our case. Weakness of the extremities and areflexia can be found in MFS and BBE [28]. Although profound worsening of consciousness can differentiate rabies from MFS and BBE, this patient died suddenly before any clouding of sensorium developed. This might have been due to autonomic dysfunction (cardiac arrhythmia) [16]. Fever after clinical onset plus excessive salivation favored the diagnosis of paralytic rabies [20]. The myoedema sign, previously reported in paralytic rabies [29], was not present, but this was examined before weakness developed. Anti-ganglioside antibodies, as found in Guillain-Barré syndrome, MFS, and BBE, are not present in patients with paralytic rabies [25].

Marked CSF pleocytosis was also unusual [16]. It was not known whether the repeated dose of HRIG might elicit this exaggerated response. Antemortem diagnosis using molecular methods, although sensitive, is not conclusive if the results are negative [5, 30]. Viral shedding is intermittent, and it is essential to repeat the test on as many samples of CSF, saliva, urine, and hair follicles as possible. To date, a total of 50 patients with

rabies were tested at our institutions for rabies viral RNA in CSE, saliva, urine, and hair follicles; 3 had tested negative. All 3, including this patient, were cases of paralytic rabies.

This case raised the possibility of an unusual strain of rabies or other lyssavirus as cause of the disease. It has been shown that Thai bats also harbored unidentified lyssavirus(es) on the basis of the presence of cross-neutralizing antibodies against Arawan, Khujand, and Irkut [31]. Spillage of bat viruses might occur to terrestrial animals. Molecular epidemiology surveys of rabies virus from infected animals and humans in Bangkok and from the whole country did not show evidence of other than dog strains [32, 33].

Nucleocapsid (GenBank accession numbers GQ303555 and GQ303556) and glycoprotein genes (GenBank accession numbers GQ303557 and GQ303558) of rabies viruses from the patient's and biting dog's brains were of identical sequences.

Conclusions. In canine rabies–endemic countries, physicians have to be aware of atypical presentations of human rabies. Negative results of postmortem tests using molecular method must be interpreted with caution due to the intermittency of viral shedding. Although rabies PEP is virtually always effective if properly administered, it is not a complete guarantee of survival [2, 3].

Acknowledgments

We thank Dr Veera Tepsumethanon for fluorescent antibody testing and Thanphet Tantawichien and the nursing staff at Queen Saovabha Memorial Institute for their generous support.

Financial support. The Thai Red Cross Society and the Thailand Research Fund (DBG5180026).

Potential conflicts of interest. H.W. had accepted funding for travel as speaker to scientific conferences from Sanofi Pasteur and the Swiss Serum and Vaccine Institute. All other authors: no conflicts.

References

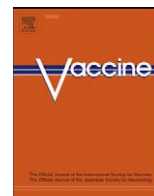
- WHO Expert Consultation on rabies. World Health Organ Tech Rep Ser **2005**;931:1–88, back cover.
- Hemachudha T, Mitrabhakdi E, Wilde H, Vejabhuti A, Siripataravanit S, Kingnate D. Additional reports of failure to respond to treatment after rabies exposure in Thailand. Clin Infect Dis **1999**;28:143–4.
- Wilde H. Failures of post-exposure rabies prophylaxis. Vaccine **2007**;25:7605–9.
- Hemachudha T, Wacharapluesadee S, Laothamatas J, Wilde H. Rabies. Curr Neurol Neurosci Rep **2006**;6:460–8.
- Hemachudha T, Wacharapluesadee S. Antemortem diagnosis of human rabies. Clin Infect Dis **2004**;39:1085–6.
- Centers for Disease Control and Prevention. Human rabies despite treatment with rabies immune globulin and human diploid cell rabies vaccine—Thailand. MMWR Morb Mortal Wkly Rep **1987**;36:759–60, 65.
- Gacouin A, Bourhy H, Renaud JC, Camus C, Suprin E, Thomas R. Human rabies despite postexposure vaccination. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **1999**;18:233–5.
- Shill M, Baynes RD, Miller SD. Fatal rabies encephalitis despite appropriate post-exposure prophylaxis: a case report. N Engl J Med **1987**;316:1257–8.
- Wilde H, Choomkasien P, Hemachudha T, Supich C, Chutivongse S. Failure of rabies postexposure treatment in Thailand. Vaccine **1989**;7:49–52.
- Wilde H, Sirikawin S, Sabcharoen A, et al. Failure of postexposure treatment of rabies in children. Clin Infect Dis **1996**;22:228–32.
- Suwansrinon K, Jaiaroensup W, Wilde H, Sitprija V. Is injecting a finger with rabies immunoglobulin dangerous? Am J Trop Med Hyg **2006**;75:363–4.
- Chutivongse S, Wilde H, Fishbein DB, Baer GM, Hemachudha T. One-year study of the 2-1-1 intramuscular postexposure rabies vaccine regimen in 100 severely exposed Thai patients using rabies immune globulin and Vero cell rabies vaccine. Vaccine **1991**;9:573–6.
- Vodopija I, Sureau P, Smerdel S, et al. Interaction of rabies vaccine with human rabies immunoglobulin and reliability of a 2–1–1 schedule application for postexposure treatment. Vaccine **1988**;6:283–6.
- Chutivongse S, Wilde H, Supich C, Baer GM, Fishbein DB. Postexposure prophylaxis for rabies with antiserum and intradermal vaccination. Lancet **1990**;335:896–8.
- Khawplod P, Wilde H, Chomchey P, et al. What is an acceptable delay in rabies immune globulin administration when vaccine alone had been given previously? Vaccine **1996**;14:389–91.
- Hemachudha T, Laothamatas J, Rupprecht CE. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. Lancet Neurol **2002**;1:101–9.
- Kietdumrongwong P, Hemachudha T. Pneumomediastinum as initial presentation of paralytic rabies: a case report. BMC Infect Dis **2005**;5:92.
- Hemachudha T, Phuapradit P. Rabies. Curr Opin Neurol **1997**;10:260–7.
- Noah DL, Drenzek CL, Smith JS, et al. Epidemiology of human rabies in the United States, 1980 to 1996. Ann Intern Med **1998**;128:922–30.
- Hemachudha T, Wacharapluesadee S, Mitrabhakdi E, Wilde H, Morimoto K, Lewis RA. Pathophysiology of human paralytic rabies. J Neurovirol **2005**;11:93–100.
- Srikiatkachorn A, Hemachudha T. Tetanus. MedLink Neurology. 7 April 2009. Available at <http://www.medlink.com/medlinkcontent.asp>. Accessed 7 April 2009.
- Orwitz JJ, Galetta SL, Teener JW. Bilateral trochlear nerve palsy and downbeat nystagmus in a patient with cephalic tetanus. Neurology **1997**;49:894–5.
- Laothamatas J, Hemachudha T, Mitrabhakdi E, Wannakrairot P, Tulayadaechanont S. MR imaging in human rabies. AJNR Am J Neuroradiol **2003**;24:1102–9.
- Laothamatas J, Wacharapluesadee S, Lumlertdacha B, et al. Furious and paralytic rabies of canine origin: neuroimaging with virological and cytokine studies. J Neurovirol **2008**;14:119–29.
- Mitrabhakdi E, Shuangshoti S, Wannakrairot P, et al. Difference in neuropathogenetic mechanisms in human furious and paralytic rabies. J Neurol Sci **2005**;238:3–10.
- Mori M, Koga M, Yuki N, Hattori T, Kuwabara S. Bickerstaff's brainstem encephalitis after an outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis. J Neuroimmunol **2008**;196:143–6.
- Tatsumoto M, Koga M, Gilbert M, et al. Spectrum of neurological diseases associated with antibodies to minor gangliosides GM1b and GalNAc-GD1a. J Neuroimmunol **2006**;177:201–8.
- Yuki N, Wakabayashi K, Yamada M, Seki K. Overlap of Guillain-Barre syndrome and Bickerstaff's brainstem encephalitis. J Neurol Sci **1997**;145:119–21.
- Hemachudha T, Phanthumchinda K, Phanuphak P, Manutsathit S. Myoedema as a clinical sign in paralytic rabies. Lancet **1987**;1:1210.
- Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies. Lancet **2001**;358:892–3.
- Lumlertdacha B, Boongird K, Wanghongsa S, et al. Survey for bat lyssaviruses, Thailand. Emerg Infect Dis **2005**;11:232–6.
- Denduagboripant J, Wacharapluesadee S, Lumlertdacha B, et al. Transmission dynamics of rabies virus in Thailand: Implications for disease control. BMC Infect Dis **2005**;5:52.
- Lumlertdacha B, Wacharapluesadee S, Denduagboripant J, et al. Complex genetic structure of the rabies virus in Bangkok and its surrounding provinces, Thailand: implications for canine rabies control. Trans R Soc Trop Med Hyg **2006**;100:276–81.



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine



Short communication

A preliminary study of chemo- and cytokine responses in rabies vaccine recipients of intradermal and intramuscular regimens

Abhinbhen Saraya^a, Supaporn Wacharapluesadee^a, Pakamat Khawplod^b,
Saowaluck Tepsumethanon^b, Deborah Briggs^c, Thanin Asawavichienjinda^a, Thiravat Hemachudha^{a,*}

^a Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and WHO Collaborating Centre for Research and Training on Viral Zoonoses, Rama 4 Road, Bangkok 10330, Thailand

^b Queen Saovabha Memorial Institute, Bangkok 10300, Thailand

^c College of Veterinary Medicine, Kansas State University, KS, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 January 2010

Received in revised form 22 April 2010

Accepted 27 April 2010

Available online xxx

Keywords:

Rabies vaccine

Cytokines

Intradermal

Intramuscular

ABSTRACT

Plasma from 10 patients who had received rabies vaccine either intradermally (ID) or intramuscularly (IM) was examined for 20 chemo- and cytokines. Plasma samples were withdrawn on days 0, 3 and 7 after vaccination. These chemo- and cytokines and sampling days were chosen based on data collected from a protein array analysis of 122 cytokines conducted on one recipient of vaccine administered IM and one recipient of vaccine administered ID. Although eotaxin, interleukin (IL)-5 in the ID and IL-1 beta in the IM group were the only chemo- and cytokines that reached statistical significance ($p < 0.05$), the overall trends may suggest bias on Th1 or Th2 according to vaccination routes. IL-1 alpha, -2, and -6, hemofiltrate cysteine–cysteine chemokine (HCC-4), glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor (GITR), tumor necrosis factor (TNF) related apoptosis inducing ligand-receptor (TRAIL-R3) had some degree of elevation in the ID group. TNF-alpha, gamma-interferon, granulocytes/macrophages – colony stimulating factor (GM-CSF), transforming growth factor (TGF)-beta, lymphotactin and pulmonary and activation-regulated chemokine (PARC) were elevated, although not to a significant level, in the IM group. IL-12, interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC) and sertoli cell factor (SCF) were not significantly elevated in both groups whereas IL-4 and -10 were unchanged. Further studies are required to determine whether the presence of specific chemokines, such as eotaxin, is responsible for the production of high levels of rabies virus neutralizing antibody after administration of the dose-sparing ID regimen.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The intradermal (ID) route for rabies post-exposure prophylaxis (PEP) was introduced in 1985 in Thailand [1]. By 1988, ID regimens for PEP completely replaced the use of 14–21 subcutaneous injections of the nervous tissue derived vaccine produced in sheep (Semple) and suckling mouse brain (Fuenzalida) vaccines in Thailand. These nervous tissue derived rabies vaccines induced an unacceptable rate of neurological complications and were of unreliable immunogenicity [2–4]. The World Health Organization (WHO) subsequently endorsed and approved the use of ID for PEP in 1992 [5]. Since the introduction of the economical ID PEP strategy, rabies deaths in Thailand have declined from 185 (in 1990) to 68 (in 1999) and 19 (in 2004) [6]. In 2009, 24 deaths were reported (data of ministry of public health, Thailand, unpublished).

The most widely used ID regimen for rabies PEP is the Thai Red Cross (TRC) regimen. The TRC regimen consists of injecting 0.1 ml of WHO approved tissue culture rabies vaccine intradermally at two different lymphatic drainage sites on the left and right upper arm on days 0, 3, 7 and 28 [7]. The amount of vaccine required for PEP can be significantly reduced when the TRC ID regimen is used. For example, the Essen IM PEP regimen requires 5 vials (one vial is administered on each of days 0, 3, 7, 14, 28) whereas the TRC ID regimen requires only 1 or 2 vials, depending upon the volume of the IM dose of rabies vaccine [0.5 and 1.0 ml preparation of purified Vero cell and purified chick embryo vaccine (PCECV) respectively]. The immunogenicity and efficacy of the TRC ID regimen have been proven in several clinical trials [8–10]. The long term antibody persistence and confirmation of an anamnestic response after vaccination with a tissue culture rabies vaccine have also been confirmed for both IM and ID vaccination. In one study, conducted in Vietnam, patients vaccinated 5 years previously responded with an anamnestic response to one booster dose of vaccine [11]. Long lasting immunity was also confirmed in a clinical trial conducted in 118 Thai patients that received pre-exposure vaccination (PreP)

* Corresponding author. Tel.: +66 2 6523122; fax: +66 2 6523122.
E-mail addresses: fmedthm@gmail.com, th-cu@usa.net (T. Hemachudha).

or PEP with a tissue culture vaccine administered by either the ID or IM route 5–21 years previously and subsequently were boosted with 2 ID doses of vaccine [12].

ID vaccination is a method of delivering antigen into the dermis via syringe and needle [13]. ID administration of vaccine has several advantages including the fact that less antigen is required, thus sparing vaccine, and it also allows antigen to be delivered directly to the skin where it can come into immediate contact with resident hematopoietic-derived cells [including mast cells, antigen presenting dermal dendritic cells (DC), macrophages], thus initiating an excellent immune response. Epidermal Langerhans' cells are also present in the papillary dermis. Additionally, extravasation of leucocytes and DC precursors from the blood are produced in the dermis. The humoral immune response to rabies vaccination administered either ID or IM, are comparable [13]. Published data indicate that an anamnestic response occurs in patients previously vaccinated by either the IM or ID regimen and subsequently boosted by either the ID or IM route [14].

Despite sizable reports on immunogenicity, efficacy and safety of the ID route of rabies vaccination, many physicians in rabies endemic countries remain doubtful and question how ID works by using only a small proportion of the IM dose. This led to under-utilization of ID rabies vaccination in many Asian countries where WHO approved tissue culture rabies vaccines are not affordable and there are still high rabies deaths. Earlier studies focused on rabies antibody response but in this enclosed study, we examined the effect that the route of administration of rabies vaccination (IM or ID) had on the production of chemo- and cytokines in patients that received PEP. The results of our study suggest that there may be differences in Th responses between patients that are vaccinated by the ID route vs. those vaccinated by the IM route and that certain chemokine may play a role after vaccination using the ID regimen.

2. Materials and methods

2.1. Subjects and informed consent

The protocol of the study was reviewed and approved by the Ethics committee, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society. The design was cross-sectional. The subjects were consecutively selected according to the inclusion/exclusion criteria and were randomly allocated to the IM or ID group. The inclusion criteria were healthy individuals whose ages were between 18 and 25 years. There was no past history of or feature suggesting diseases which might affect the immunological systems. They had category II rabies exposure according to WHO criteria which required vaccination without rabies immune globulin. All of them were thoroughly explained before they signed an informed consent. The informed consent was collected from each subject enrolled in the study. Any individual with age below 20 years old also had his/her parent co-signed the informed consent. Exclusion criteria included those who were not healthy or had underlying medical diseases and who received rabies vaccination in the past.

2.2. Study design and setting

Initially, a screening group consisting of two subjects was immunized with either an ID or IM regimen of rabies PEP using PCECV (Chiron Behring; Lot no. L1032; potency, 10.23 IU/dose). Serum was collected on days 0, 3, 4 and 7 after primary immunization was initiated. Following an analysis of the data collected from the 2 initial subjects selected for the screening group, 20 subjects, 10 in each group, were immunized with either ID or IM rabies PEP regimen using PCECV. Blood samples were collected from all subjects on days 0, 3 and 7.

Table 1

List of cytokines and chemokines and their functions that were examined in this study.

	Functions
IL-1 alpha,beta	Upregulated adhesion molecule expression, neutrophil and macrophage emigration.
IL-2	T cell activation and proliferation, B cell growth, NK cell proliferation and activation, enhance monocyte/macrophage cytolytic activity.
IL-4	Stimulates Th2 helper T cell differentiation and proliferation. Stimulates B cell Ig class switch to IgG1 and IgE anti-inflammatory action on T cells, monocytes.
IL-5	Regulates eosinophil migration and activation.
IL-6	Induction of T and B cell differentiation and growth.
IL-10	Inhibits macrophage pro-inflammatory cytokine production, down-regulates cytokine class II antigen and B7-1 and B7-2 expression, inhibits differentiation of Th1 helper T cells, inhibits NK cell function, stimulates mast cell proliferation and function, B cell activation and differentiation.
IL-12	Induces Th1 T helper cell formation and lymphokine-activated killer cell formation. Increases CD8 + CTL cytolytic activity; decreases IL-17, increases IFN-gamma.
IFN-gamma	Regulates macrophage and NK cell activations. Stimulates immunoglobulin secretion by B cells. Induction of class II histocompatibility antigens. Th1 T cell differentiation.
TGF-beta	Down-regulates T cell, macrophage and granulocyte responses. Stimulates synthesis of matrix proteins. Stimulates angiogenesis.
TNF-alpha	Fever, enhanced leukocyte cytotoxicity and enhanced NK cell function, pro-inflammatory cytokine induction.
Eotaxin	Chemoattractant for eosinophils and basophils. Acts in concert with IL-5 to activate eosinophils.
Lymphotactin	XCCL1, member of the XC chemokine family affecting T cell and natural killer cell.
PARC	Belongs to CC-chemokine. PARC is chemotactic for both activated CD3 T cells and non-activated CD14 lymphocytes but not for monocytes and granulocytes.
SCF	Stimulates hematopoietic progenitor cell growth, mast cell growth.
GITR	GITR is involved in the regulation of T cell receptor mediated cell death (resistance to apoptosis).
GM-CSF	Mediator of dendritic cell maturation and function. Regulates myelopoiesis.
HCC-4	Ligand of CCR5 chemokine family affecting T cells and monocytes.
I-TAC	CXCL11 chemokine ligand of CXCR3. A chemokine receptor on type 1 helper cells, mast cells and mesangial cells.
TRAIL-R3	TRAIL receptor-3 is not capable of inducing apoptosis. TRAIL receptor-3 can compete for TRAIL. It is capable of inhibiting apoptosis mediated by TRAIL and serves as a decoy.

IL, interleukin; IFN, interferon; NK, natural killer; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor; PARC, pulmonary and activation-regulated chemokine; SCF, sertoli cell factor; GITR, glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor; GITR, glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor; GM-CSF, granulocytes/macrophage – colony stimulating factor; HCC, hemofiltrate cysteine–cysteine chemokine; I-TAC, interferon-inducible-Tcell alpha chemoattractant; TRAIL-R3, TNF related apoptosis inducing ligand-receptor.

2.3. Evaluation of serum samples

Serum was separated from blood samples collected from all subjects and was analyzed for the presence of rabies virus neutralizing antibody (RVNA) by the Rapid Fluorescence Focus Inhibition Test

Table 2Median of fold changes at three different time points (days 3 and 0; 7 and 0; 7 and 3) of ID or IM group ($n = 10$ in each).

Cytokines	Day 3/0		Day 7/0		Day 7/3	
	IM	ID	IM	ID	IM	ID
Eotaxin	1.09 (–1.62,2.02)	1.365 (–2.28,2.37)	–0.02 (–1.67,2.16)	1.7 (–1.37,3.83)	–1.11 (–1.83,1.6)	1.22 (–1.88,2.73)
GITR	0 (–2.17,2.37)	1.18 (–2.32,1.49)	0.57 (–1.74,3.75)	–0.54 (–2.53,2.36)	0.99 (–2.09,2.44)	1.33 (–2.48,2.16)
GM-CSF	–0.5 (–2.71,2.4)	0 (–2.57,1.61)	1.49 (–1.2,2.8)	0.65 (–2.33,2.77)	1.35 (–2.33,2.55)	0.6 (–3.7,2.29)
HCC	–1.24 (–4.51,2.2)	–1.14 (–2.24,1.58)	–1.25 (–3.28,1.98)	1.15 (–2.36,1.57)	–1.09 (–1.76,2.17)	1.14 (–1.95,2.53)
IFN-gamma	0.08 (–3.1,3)	–1.21 (–2.39,2.5)	–0.07 (–2.55,2.38)	1.19 (–1.73,2.48)	1.35 (–3.64,2.17)	0.33 (–1.52,2.4)
IL-10	0 (0,0)	0 (–1.41,2.24)	0 (0,0)	0 (–1.2,3.55)	0 (0,0)	0 (–1.82,1.59)
IL-12	0 (–1.83,1.61)	0.61 (0.2,48)	0.9 (0.2,09)	0.69 (–1.44,2.8)	0 (–4.39,3.82)	0 (–1.76,2)
IL-1 alpha	0.2 (–5.38,2.6)	–0.54 (–4.41,3.8)	0.57 (–1.24,3.5)	1.43 (–2.11,1.69)	0 (–2.14,4.33)	–0.61 (–1.49,1.68)
IL-1 beta	0.69 (–1.7,1.6)	0 (–2.75,3.71)	2.01 (–3.43,4.76)	0 (–1.3,1.64)	1.33 (–4.8,1)	0 (–2.52,4.25)
IL-2	0 (–3.08,1.33)	1.23 (–2.2,1.64)	0.51 (–3.2,33)	0 (–2.57,1.71)	0.55 (–1.8,1.75)	0 (–2.56,2.55)
IL-4	0 (0,0)	0 (–4.51,1.11)	0 (0,0)	0 (–4.26,1.34)	0 (0,0)	0 (0,1.55)
IL-5	0 (–5.08,3.2)	0 (–1.38,3.7)	0 (–4.09,1.15)	1.2 (–1.88,2.01)	0 (–2.13,5.7)	1.02 (–1.8,2.59)
IL-6	0 (–5.08,3.2)	0.75 (–4.2,1)	0 (–7,3)	1.15 (–1.31,3.7)	0.05 (0.2,2)	0.2 (–5.4,48)
I-TAC	1.61 (–3.62,6.86)	1.8 (–3.46,3.29)	2.28 (–1.58,4)	5.42 (–2.18,8.69)	1.42 (–3.07,3.03)	1.22 (–4.15,3.95)
Lymphotactin	1.42 (–3.11,6.6)	0 (–1.73,1.33)	1.16 (–3.71,2.56)	0.56 (–1.36,1.7)	1.67 (–3.61,2.35)	0 (–1.6,2.95)
PARC	1.05 (–1.09,1.13)	–1.01 (–1.3,1.19)	–1.08 (–1.19,1.18)	–0.02 (–1.69,1.27)	–1.12 (–1.33,1.11)	–0.02 (–1.37,1.09)
SCF	1.6 (–2.12,2.81)	1.23 (–5.44,4.24)	1.15 (–2.01,4.27)	0.58 (–2.31,3.41)	–0.09 (–3.88,2.02)	–0.62 (–3.33,2.92)
TGF-beta	1.13 (–4.58,2.72)	–0.51 (–2.16,1.96)	0.01 (–3.4,44)	1.23 (–1.57,2.72)	–1.12 (–2.93,4.2)	1.33 (–1.74,1.84)
TNF-alpha	0.73 (–1.6,2.24)	–0.51 (–3.1,31)	1.25 (–1.07,2.31)	–1.37 (–3.53,2)	1.64 (–2.4,4.5)	–1.42 (–4.3,03)
TRAIL R3	–1.1 (–1.37,2.33)	1.07 (–1.29,1.62)	1.04 (–1.78,2.42)	1.14 (–2.38,1.51)	1.04 (–1.71,1.3)	0.03 (–2.97,1.48)

Numbers in parentheses are the minimum and maximum values of fold-changes in each group respectively. The numbers in bold and italic represent values that reach statistical significance ($p < 0.05$) according to Mann–Whitney U -test. The number zero appears as the result of 0 value on day 3 or 7.

(RFFIT) [15]. Serum samples were also analyzed to quantify the level of chemo- and cytokines using the RayBio® Cytokine Antibody Arrays (RayBiotech, Inc., Norcross, GA, USA).

2.4. Screening of initial serum samples

Serum samples initially collected from the two subjects included in the screening survey were evaluated for the presence of RVNA and for 122 chemo- and cytokines. The levels of chemo- and cytokines were evaluated using the RayBio® Cytokine Antibody Arrays-Human Antibody Array System VII & 7.1 according to the manufacturer's instruction (RayBiotech, Inc., Norcross, GA, USA). Semi-quantitative values for the two subjects vaccinated ID or IM were expressed as fold-changes on days 3, 4 and 7 after initiation of the first dose of vaccine. The fold-changes were calculated by dividing the normalized values of the test samples on days 3, 4 and 7 by that on day 0. If the fold difference was lower than 1, the fold-change was calculated as $[-1/\text{fold differences}]$. For example, if fold difference was 2.35; fold-change = 2.35. If fold difference was 0.42; fold-change = $-1/0.42 = -2.38$.

Those with twofold positive or negative changes were considered as up or down regulation, respectively and were chosen as candidates for further study. Method of calculations on fold difference and fold-change was similar to the PCR array data analysis (www.superarray.com, downloaded on 11 December 2006).

2.5. Selection of candidate cytokines

Twenty relevant candidates of the initial 122 cyto- and chemokines chosen for analyses were selected based on criteria described above. These included eotaxin, glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor (GITR), granulocytes/macrophages – colony stimulating factor (GM-CSF), hemofiltrate cysteine–cysteine chemokine (HCC)-4, interferon (IFN)-gamma, interleukin (IL)-1 alpha, -1 beta, -2, -4, -5, 6, -10, -12, interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), lymphotactin, pulmonary and activation-regulated chemokine (PARC), sertoli cell factor (SCF), transforming growth factor (TGF)-beta, tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF related apoptosis inducing ligand-receptor (TRAIL-R3). Their functions are briefly described in Table 1 [16,17].

Following the initial selection of cytokines from the two subjects included in the screening group, sera collected on days 0, 3 and 7 from the 10 subjects vaccinated IM and the 10 subjects vaccinated ID were evaluated for the levels of the selected cytokines. The levels of each chemo- and cytokine were expressed as fold-changes between 3 different time points (days 3 and 0; 7 and 0; 7 and 3) of the same group (ID or IM) as previously described in the screening group.

Median values in the fold-change of each cytokine from ID and IM group were then determined (Table 2).

3. Results

The demographic characteristics of the subjects were similar across the ID and IM groups (data not shown). They received the same batch of vaccine on the same day. All of the samples were assayed on the same run.

By day 14 after initiation of the vaccination series, all subjects in both the IM and the ID groups had titers above the WHO recognized adequate level of 0.5 IU/ml. RVNA in subjects from the IM group ranged from 1.24 to 21.02 (1.24, 2.08, 21.02, 14.23, 6.82, 9.64, 2.4, 10.03, 10.39, 8.73); and in the ID group ranged from 2.49 to 13.47 (8.36, 7.03, 12.9, 13.47, 11.83, 13.47, 12.35, 11.33, 10.39, 2.49). None of the subjects reported any adverse reactions or exhibited lymphadenopathy at axillary sites. Lower titers (below 2.5) were evident in three subjects that received PEP by the IM route and in one subject that received PEP by the ID route (1.24, 2.08 and 2.4 in IM and 2.49 IU/ml in ID group).

The levels of chemo- and cytokines in each group that were elevated or diminished at different time points are summarized in Table 2. Due to the skew deviation of the values of these chemo- and cytokines, median value was chosen for the central tendency. In order to determine whether they were statistically different or not, Mann–Whitney U -test was applied. The level was chosen at <0.05 . It appeared that 3 of 20 chemo- and cytokines reached statistical significance. They were eotaxin (day 7–0) and IL-5 (day 7–0) in the ID group and IL-1 beta (day 7–0) in the IM group (Table 2 in bold and italic). The chemo- and cytokines that were also elevated earlier and/or persisted, but not to a significant level, in the subjects that received ID PEP included: GITR, HCC, IL-1 alpha, IL-2, IL-6 and TRAIL R3. The chemo- and cytokines that were elevated earlier and/or per-

sisted, but not to a significant level, in the subjects that received IM PEP included: GM-CSF, IFN-gamma, lymphotactin, PARC, TGF-beta, and TNF-alpha. The chemo- and cytokines similarly elevated, but not to a significant level, in both the ID and IM groups included: IL-12, I-TAC and SCF. Those with levels unchanged in both ID and IM groups were IL-4 and IL-10.

Sub-analysis of chemo- and cytokine levels among the 4 subjects with lower titers did not identify any specific chemo- or cytokine(s) that might be related to a lower humoral immune response (data not shown).

4. Discussion

Our study suggests that there may be a different immunological pathway involved between subjects that receive the IM vs. ID route of rabies vaccine. Th2 and Th1 responses might dominate in subjects that received the ID and IM regimens respectively. Although only eotaxin, IL-1 beta and IL-5 were shown to be significantly elevated, this might not exclude the roles of other chemo- and cytokines, since timing of response may be earlier than the day of sampling and our sample sizes were also limited.

Although IL -4 could not be demonstrated in our study, this might be explained by the fact that IL-4 is the first of the Th2 cascade and because the first blood draw was taken on day 3, the timing may have been too late to identify this particular cytokine. IL-5, with level significantly elevated, and -6 were identified beginning with the first sample taken on day 3. Chemokines, such as eotaxin (with level significantly elevated) and HCC-4, which attract eosinophils and monocytes, may also play a role in enhancing the antibody response in subjects that received the ID regimen. Although Th2 lymphocytes that contribute to IgE antibody responses (via eotaxin and IL-5) can favor immediate or late hypersensitivity reactions (of type 1 of the Gell and Coombs classification), such side effects were not observed excessively in any of the subjects that received the ID route of administration in our study and have not been reported elsewhere. Intriguingly, the level of IL-2 (Th1 response) was also elevated (although not to a significant level) in subjects that received the ID route of administration, and not in the subjects that received rabies vaccine via the IM route. The level of interferon-gamma (Th1 response) showed some degree of depression on day 3 and elevation on day 7 in the ID group and remained unchanged in the IM group. The resistance to depression of the interferon-gamma may enhance the production of Th1 in subjects that received vaccine via the IM route.

The level of GTR in the ID group was elevated, but not to a significant level, beginning with the first sample taken on day 3. GTR is expressed in normal T-lymphocytes from thymus, spleen, and lymph nodes and does not appear to be expressed in other non-lymphoid tissues (Table 1). The expression of GTR is induced in T-lymphocytes upon activation. GTR may modulate the survival of T-lymphocytes in peripheral tissues by inhibiting cell death by apoptosis (data in www.copewithcytokines.de). Such a mechanism may also be the case with TRAIL R 3 which was noted to be elevated but not to a significant level in the ID group beginning with the first sample taken on day 3.

The hallmark of the Th1 response in the IM group in this study was expected to be the level of TNF-alpha. However, the changes in TNF-alpha levels were not significant but some degree of elevation in the IM group of subjects and depression in the ID subjects were evident. This was similar in the case of PARC with some degree of depression in the ID group and elevation in the IM group beginning with the first sample taken on day 3. Expression of PARC mRNA is observed in follicular dendritic cells in the germinal centers of regional lymph nodes (data in www.copewithcytokines.de). This may suggest that the ID route of vaccination may not be the only

immunization route which enables dendritic cells, after capturing antigen at the site of vaccination, to migrate to draining lymph nodes. GM-CSF was elevated (but not significantly) on day 7 in both IM and ID groups with a higher level being noted in the IM group. The synthesis of GM-CSF is inducible by TNF-alpha and its mode of action is to promote the local inflammatory reaction commonly associated with a type 4 hypersensitivity reaction [13]. Nevertheless, none of the subjects in the IM or in the ID group experienced any side effects 30 days after the initiation of vaccination. The lymphotactin level was elevated exclusively in the IM group on day 3 and day 7 whereas the TGF-beta level was elevated earlier in the IM as compared to the ID group. Nevertheless, these changes were not statistically significant. It is not known whether the early expression of lymphotactin and TGF-beta retards the immune activation process in the IM group.

In summary, both IM and ID routes of rabies immunization have been proven to be comparable in terms of elicitation of antibody response and in providing the long term memory cells. However, ID requires only a small proportion of the IM dose (one-fifth to one-tenth of the IM dose depending on the size of vaccine ampoule) and provides a means by which countries with limited budgets can supply life saving rabies vaccine for patients without the financial means to do so. The Th1/Th2 balance as well as certain chemo-/cytokines cascades may offer a plausible reason as to why the more economical ID route of rabies vaccination for PEP is as efficacious as the IM route. The ID regimen should be encouraged to be used as standard regimen for post-exposure rabies prophylaxis in rabies endemic country.

Acknowledgments

We thank National Science and Technology Development Agency and the Thailand Research Fund (DBG 5180026) for grant support.

References

- [1] Hemachudha T. Rabies. In: Vinken P, Bruyn G, Klawans H, editors. Handbook of clinical neurology viral disease. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1989. p. 383–404.
- [2] Hemachudha T, Phanuphak P, Johnson RT, Griffin DE, Ratanavongsiri J, Siriprasomsup W. Neurologic complications of Semple-type rabies vaccine: clinical and immunologic studies. *Neurology* 1987;37(April (4)):550–6.
- [3] Hemachudha T, Griffin DE, Johnson RT, Giffels JJ. Immunologic studies of patients with chronic encephalitis induced by post-exposure Semple rabies vaccine. *Neurology* 1988;38(January (1)):42–4.
- [4] Hemachudha T, Griffin DE, Chen WW, Johnson RT. Immunologic studies of rabies vaccination-induced Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 1988;38(March (3)):375–8.
- [5] World Health Organ Tech Rep Ser 1992;824:1–84.
- [6] Puanghat A, Hunsoowan W. Rabies situation in Thailand. *J Med Assoc Thai* 2005;88(September (9)):1319–22.
- [7] WHO Expert Consultation on rabies. World Health Organ Tech Rep Ser 2005;931:1–88, back cover.
- [8] Chutivongse S, Wilde H, Supich C, Baer GM, Fishbein DB. Postexposure prophylaxis for rabies with antiserum and intradermal vaccination. *Lancet* 1990;335(8694):896–8.
- [9] Briggs DJ, Banzhoff A, Nicolay U, Sirikwin S, Dumavibhat B, Tongswas S, et al. Antibody response of patients after postexposure rabies vaccination with small intradermal doses of purified chick embryo cell vaccine or purified Vero cell rabies vaccine. *Bull World Health Organ* 2000;78(5):693–8.
- [10] Warrell MJ, Riddell A, Yu LM, Phipps J, Diggle L, Bourhy H, et al. A simplified 4-site economical intradermal post-exposure rabies vaccine regimen: a randomised controlled comparison with standard methods. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2(4):e224.
- [11] Vien NC, Feroldi E, Lang J. Long-term anti-rabies antibody persistence following intramuscular or low-dose intradermal vaccination of young Vietnamese children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102(March (3)):294–6.
- [12] Suwansrinon K, Wilde H, Benjavongkulchai M, Banjongkasaena U, Lertjarutorn S, Boonchang S, et al. Survival of neutralizing antibody in previously rabies vaccinated subjects: a prospective study showing long lasting immunity. *Vaccine* 2006;24(May (18)):3878–80.
- [13] Nicolas JF, Guy B. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert Rev Vaccines* 2008;7(October (8)):1201–14.

- [14] Sudarshan MK, Madhusudana SN, Mahendra BJ, Narayana DH, Giri MS, Muhamuda K, et al. Boosting effect of purified chick embryo cell rabies vaccine using the intradermal route in persons previously immunized by the intramuscular route or vice versa. *Natl Med J India* 2006;19(July–August (4)):192–4.
- [15] Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus neutralizing antibody. In: Meslin FX, Kaplan MM, Kaprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva, Switzerland: WHO; 1996. p. 181–93.
- [16] Haynes BF, Soderberg KA, Fauci AS. Disorders of the immune system, connective tissue and joints. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al., editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th ed. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2008. p. 2019–45.
- [17] Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006;354(February (6)):610–21.

**Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction, distribution or commercial use.**

This chapter was originally published in the book *Advances in Virus Research*, Vol. 79, published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues who know you, and providing a copy to your institution's administrator.



All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

From Nipan Israsena, Aekkapol Mahaviahakanont, and Thiravat Hemachudha. Rabies Virus Infection and MicroRNAs. In Alan Jackson, editor: *Advances in Virus Research*, Vol. 79, Burlington: Academic Press, 2011, pp. 329-344.

ISBN: 978-0-12-387040-7

© Copyright 2011 Elsevier Inc.

Academic Press.

CHAPTER 15

Rabies Virus Infection and MicroRNAs

Nipan Israsena,^{*} Aeekapol Mahaviahakanont,[†] and Thiravat Hemachudha[†]

Contents	I. Introduction	330
	II. MicroRNAs	330
	A. miRNA biogenesis	330
	B. Functions	331
	III. miRNAs and Viruses	333
	A. Roles of cellular and virally encoded miRNAs in viral diseases	333
	B. Potential roles of cellular miRNAs in rabies virus infection	334
	C. Viral-encoded RNA: Does it exist in RABV infection?	337
	IV. Inhibition of Rabies Viral Replication by siRNA/amiRNA	338
	V. Conclusions	340
	References	340

Abstract Endogenous RNA-silencing mechanisms have been shown to play a role in regulating viral and host processes during the course of infection. Such interactive processes may involve host cellular and/or viral-encoded microRNAs (miRNAs). Rabies is unique not only in terms of its invariably fatal course once disease signs develop, but it also has a variable incubation period (eclipse phase). It has been recently shown that cells or tissues of different

^{*} Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[†] Department of Medicine (Neurology) and WHO Collaborating Center in Research and Training on Viral Zoonoses, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

origin have their own specific miRNAs that, in theory, may impact on viral transcription and replication. This may possibly explain, in part, why rabies virus remains dormant at the inoculation site in rabies patients for long periods. Owing to the RNA interference (RNAi) technology, it has been possible to introduce exogenously designed artificial short interfering RNAs (siRNAs) and miRNAs into virus-infected cells for therapeutic purposes. Successful attempts in using RNAi for prevention and treatment of DNA and RNA virus infections both *in vitro* and *in vivo* experiments have been reported. The fact that rabies remains incurable has stimulated the development of the therapeutic RNAi strategy. We describe herein preliminary evidence that cellular miRNA may play a role in suppressing viral replication, explaining the eclipse phase, and that artificially designed multitargeting miRNA can successfully inhibit rabies virus transcription and replication *in vitro*.

I. INTRODUCTION

Short interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs) are two relatively well-defined classes of small RNAs involved in RNA silencing, a mechanism for sequence-specific gene silencing regulated by RNAs of 19–30 nucleotides (nt) in length (Carthew and Sontheimer, 2009). siRNAs are usually derived from long double-stranded RNA (dsRNA) of exogenous origin. In contrast, miRNAs are endogenously encoded small RNAs generated from the dsRNA region of hairpin-shaped precursors. Evidence suggests that both classes of small RNAs play important roles in viral pathogenesis (Lu and Liston, 2009; Skalsky and Cullen, 2010). In this chapter, we discuss the potential role of noncoding RNA, especially miRNAs, in rabies pathogenesis as well as progress and roadblocks in developing a therapeutic strategy against rabies using an artificial miRNA (amiRNA) approach.

II. MICRORNAS

A. miRNA biogenesis

miRNAs are small, single-stranded RNA, 18–25 nt long encoded in the genome of diverse organisms, including plants (Jones-Rhoades *et al.*, 2006), worms (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000), flies (Brennecke *et al.*, 2003), and humans (Bartel, 2004; Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2003), that regulate gene expression by binding to the 3'-untranslated region (UTR) of specific mRNAs. These miRNAs are derived from long RNA transcripts containing single or multiple stem-loop structures called

primary transcripts of the miRNA genes (pri-miRNAs). Pri-miRNA transcripts can be found as independent transcripts or within the intron of protein-encoding genes. They are generated by RNA polymerase II and contain a 5'-cap and polyA tail (Lee *et al.*, 2004). The first step of mature (18- to 25-nt) miRNA biogenesis involves the recognition and nuclear cleavage of the RNA stem-loop structure of the pri-miRNA by the cellular RNase III enzyme Drosha and its copartner dsRNA-binding protein, DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) to form the 60- to 70-nt pre-miRNA (Lee *et al.*, 2003). The cleavage leaves a 2-nt overhang at the 3'-end of pre-miRNA which is recognized and transported out of the nucleus by Ran-GTP and a receptor, Exportin 5 (Lund *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2003). Upon reaching the cytoplasm, GTP hydrolysis results in release of the pre-miRNA, 3' 2-nt overhang is then bound by a second cellular RNase III enzyme called Dicer. Dicer removes the terminal loop from pre-miRNA and generates miRNA duplex intermediate. Usually, only one strand of the duplex (miRNA strand) is stabilized and incorporated into a multiple protein nuclease complex, the RNA-induced silencing complex (RISC), whereas the other strand (passenger strand) is released and degraded. The miRNA acts as a guide to direct RISC to complementary targets and regulates protein expression by promoting translational repression, mRNA degradation, and mRNA cleavage (Cullen, 2004; Khvorova *et al.*, 2003; Kim, 2005; Kim *et al.*, 2009) (Fig. 1). Although it was generally believed that perfect or near perfect complementary pairing between miRNA and mRNA is required for mRNA cleavage and degradation, whereas imperfect complementary pairing leads to translation block, miRNAs can target mRNAs containing only partially complementary sequences to degradation pathway (Bagga *et al.*, 2005). New evidence suggests that mRNA degradation, not translational block, may be the main pathway used by mammalian miRNAs that leads to a reduction in target proteins level (Guo and Lu, 2010). In plants, most known targets of miRNAs are silenced by perfectly complementary miRNA. In contrast, most known miRNA targets in animals are only partially complementary to their cognate miRNAs (Sontheimer and Carthew, 2005). The pairing of nucleotide 2–8 of miRNA (seed region) is crucial for target recognition.

B. Functions

The latest version (16th) of the largest miRNA database MiRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk>) contains 17,341 mature miRNAs, from 142 species, including over 700 human miRNAs. As each miRNA has the potential to target over 200 different transcripts, it is possible that miRNAs regulate up to 30% of all human protein-coding genes (Lewis *et al.*, 2005). While siRNAs function mainly as natural defenses against viruses, miRNAs are found to be involved in regulating a wide variety of important

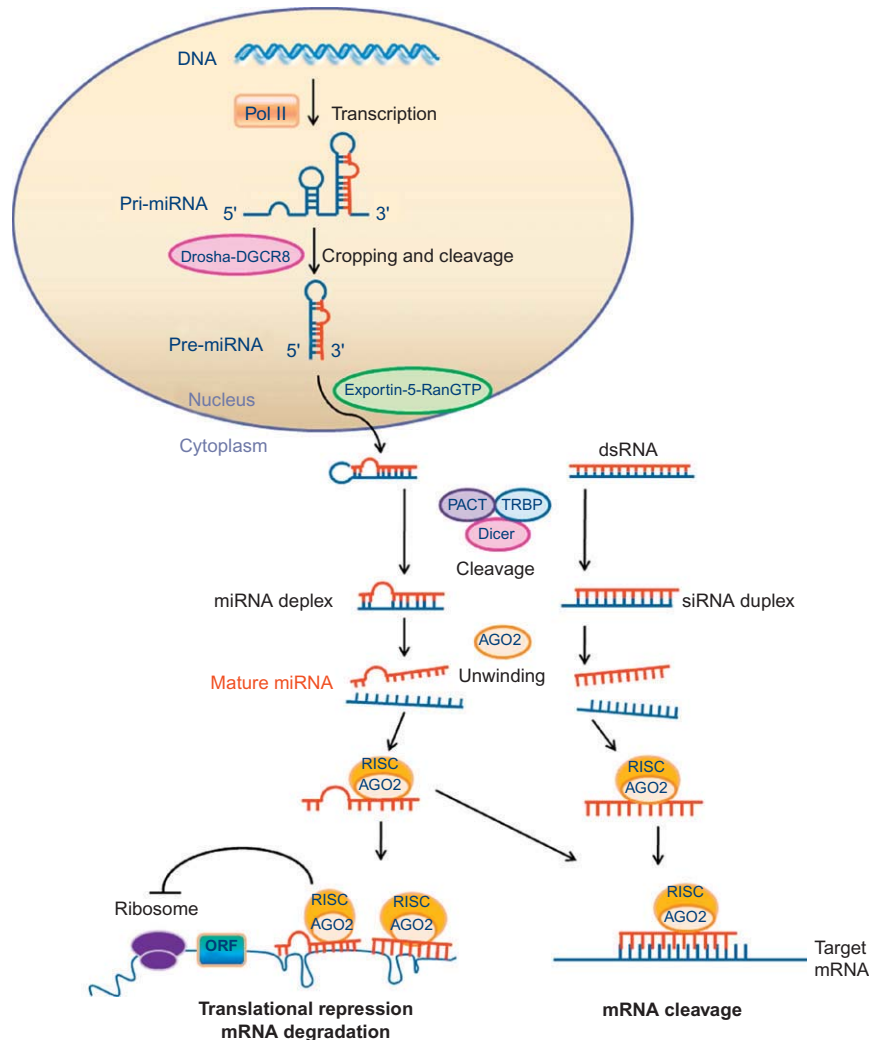


FIGURE 1 The microRNA (miRNA) biogenesis. The miRNA biogenesis pathway requires two RNase III type enzymes, Drosha and Dicer, generating pri-miRNA, pre-miRNA, and mature miRNA. Mature miRNA combines with multiple protein nuclease complexes resulting in the formation of the RISC, which is able to regulate the mRNA downstream.

cellular processes, ranging from development (Carrington and Ambros, 2003; Stefani and Slack, 2008), cellular differentiation (Kim *et al.*, 2006), proliferation (Brennecke *et al.*, 2003), and apoptosis (Jovanovic and Hengartner, 2006; Xu *et al.*, 2003) to cancer transformation (Dalmay and Edwards, 2006). Many miRNAs are ubiquitously expressed, whereas others are expressed in a cell-type-specific manner. Certain viruses can

produce viral-encoded miRNAs that regulate both viral and host cell gene expression suitable for each stage of the viral life cycle (Cullen, 2009; Dykxhoorn, 2007; Schutz and Sarnow, 2006).

III. miRNAS AND VIRUSES

A. Roles of cellular and virally encoded miRNAs in viral diseases

Viral survival and replication are highly dependent on host cellular machinery. There has been growing evidence that host cellular miRNAs can moderate the viral life cycle and cell-type-specific miRNAs may contribute to the tissue tropisms of viruses (Perez *et al.*, 2009; Umbach and Cullen, 2009). In most cases, it has been shown that endogenous miRNAs can, at least partially, reduce viral replication. For example, human miR-32 has been reported to restrict the replication of primate foamy virus type 1 (PFV-1) (Lecellier *et al.*, 2005), whereas miR24 and miR93 interfere with the function of vesicular stomatitis virus (VSV) P and L genes (Otsuka *et al.*, 2007). When miRNA processing is inhibited, the replication rate of viruses, such as influenza A virus (Song *et al.*, 2010), VSV (Otsuka *et al.*, 2007), herpes simplex virus 1 (HSV-1) (Gupta *et al.*, 2006), and human immunodeficiency virus (HIV-1) (Triboulet *et al.*, 2007; Yeung *et al.*, 2005), is increased. Recent studies have showed that interferon beta can mediate antiviral effects through upregulation of endogenous miRNAs (Pedersen *et al.*, 2007; Witwer *et al.*, 2010). Many viruses globally repress Pol II transcription in infected cells and, therefore, repress miRNA biogenesis. In contrast, some viruses use host cellular miRNA to facilitate viral replication. It has been shown that liver-specific human miR-122 targets the 5'-UTR of hepatitis C virus (HCV) RNA and promotes HCV replication (Jopling *et al.*, 2005). However, inhibition of miR-122 reduces the viral load in chimpanzees chronically infected with HCV (Roberts and Jopling, 2010). In Epstein-Barr virus (EBV) infection, the switch from latency stage to lytic replication involves miR200b and miR429 (Ellis-Connell *et al.*, 2010). Specific cellular miRNAs can be induced by specific viral infections (Triboulet *et al.*, 2007). EBV induces the expression of several cellular miRNAs, including miR155 that plays an important role in promoting transformation of B cells (Cameron *et al.*, 2008; Linnstaedt *et al.*, 2010).

To date, more than 200 virally encoded miRNAs have been reported. Virally encoded miRNAs have been found mainly with DNA viruses. Viruses within the Herpesviridae family, such as cytomegalovirus (CMV) (Grey *et al.*, 2005; Pfeffer *et al.*, 2005), EBV, and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) (Cai and Cullen, 2006), encode several miRNA

(9–23 miRNA) within the viral genome. Adenovirus (Aparicio *et al.*, 2006) and SV40 virus (Sullivan *et al.*, 2005), also nuclear DNA viruses, contain a single miRNA. As cleavage of the pri-miRNA by Drosha occurs in the nucleus, it has been speculated that cytoplasmic viruses may not be able to generate miRNA (Cullen, 2010).

Current evidence suggests that viruses use their miRNAs to manipulate the cellular environment and viral gene expression to favor their long-term survival (Skalsky and Cullen, 2010). Most known cellular targets of viral-encoded miRNAs are involved in either modulating cellular immune responses or apoptosis (Choy *et al.*, 2008; Umbach and Cullen, 2009). Regulation of viral protein production at different stages of the life cycle helps promote immune evasion. For example, SV40 miRNAs inhibit viral T-antigen RNA in the late stage of infection, thus, reducing infected cell susceptibility to killing by cytotoxic T-cells (Sullivan *et al.*, 2005). HSV-1 miRNAs, which are expressed at high level during latency, but not during productive viral replication, downregulate the immediate-early transactivators ICP0 and ICP4, both of which play a key role in the induction of lytic replication, therefore, maintaining latency stage (Umbach *et al.*, 2008).

B. Potential roles of cellular miRNAs in rabies virus infection

It would be intriguing to know whether cellular miRNAs play any role in rabies pathogenesis. Recent studies in VSV, a negative sense single-stranded RNA virus, closely related to rabies virus (RABV), showed that miR24 and miR93 could contribute to viral susceptibility by binding to viral *L* and *P* genes (Otsuka *et al.*, 2007). It was also shown that VSV infection induced expression of miR706 which inhibits apoptosis pathway and therefore may be involved in strategy for survival of VSV (Lian *et al.*, 2010). Computational predictions using a ViTa bioinformatics program (Hsu *et al.*, 2007) identify several candidate miRNAs that may bind to either RABV transcripts or RABV genome. Moreover, we found that when Drosha was knocked down, RABV can replicate at a faster rate (Israsena, unpublished data) (Fig. 2A and B).

Of a few endogenous miRNA candidates identified, we focused on miR-133, which is specifically expressed in skeletal muscle (Chen *et al.*, 2006) in which RABV may enter and remain latent for variable periods of time, from days to year(s) (Jackson, 2008). miR-133 has been predicted to bind to both N and G transcripts (Fig. 3A and B). To address whether hsa-mir-133 influenced RABV replication, we transfected Neuro-2a with an miRNA-133 mimic before challenge with attenuated RABV (HEP-Flury). On comparison between Neuro-2a cells transfected with control miRNA and muscle-specific miR133 mimic, the results showed that there was marked reduction of expression of viral protein

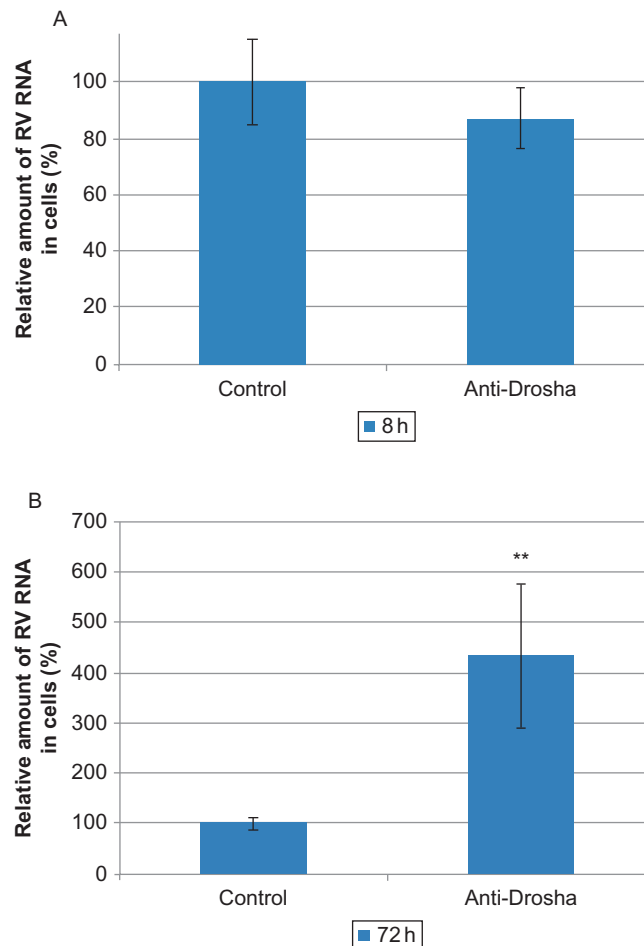


FIGURE 2 SiRNA against Drosha promotes rabies virus propagation. Neuro2A cells were transfected with anti-Drosha siRNA. Twelve hours after transfection, the cells were infected with RABV. Eight hours (A) and 72 h (B) after infection, the levels of viral genome were determined by real-time PCR. **, the results were significantly different ($P < 0.05$).

(as shown by immunofluorescence staining) only in the case of miR133 (Fig. 3C).

Wild-type RABVs may have differences in mutations, either at coding (either as nonsynonymous or synonymous pattern) or noncoding regions or both. Therefore, it is possible that miRNAs, which recognize target genes through nucleotide pairings in different host cells/tissues in the body of infected hosts, can affect the properties of RABV and even have effects on the clinical manifestations or outcomes of patients. In addition,

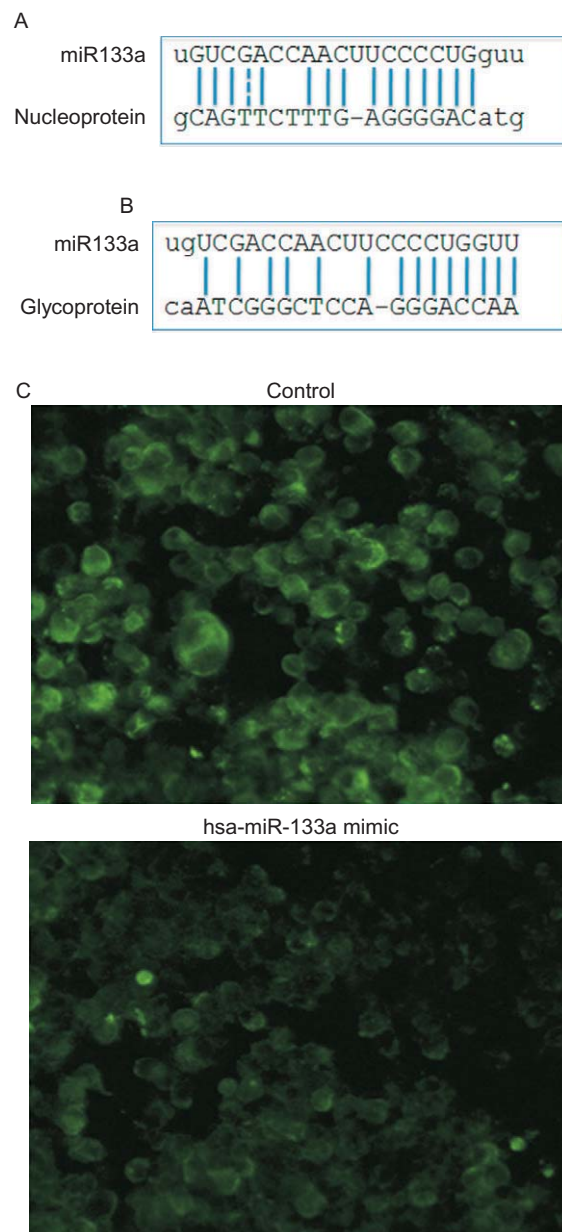


FIGURE 3 Effect of miR133 on rabies virus. (A) A schematic diagram depicting the location of the hsa-miR-133a in association with CVS N mRNA. (B) A diagram showing the location of potential binding of hsa-miR-133a to CVS G mRNA. (C) Neuro2a cells transfected with miRNA mimic hsa-miR-133 or control miRNA were challenged with RABV (HEP-Flury). Forty-eight hours after infection, cells were fixed and subjected to direct-immunofluorescent staining with FITC-conjugated anti-N antibody (C). Note the reduction in FITC staining in hsa-miR-133a treated group.

the pressure constraints by cell-type-specific miRNA suppression may promote mutations in that specific corresponding region of the RABV genome (Fig. 4).
It remains to be determined to what extent that tissue-specific endogenous miRNA(s) play roles in tissue tropism and in the variable incubation periods in patients with rabies.

C. Viral-encoded RNA: Does it exist in RABV infection?

It is still debatable whether RNA viruses can generate miRNA. This is due to the fact that most RNA viruses replicate in the cytoplasm and excision of genomically encoded miRNA in stem-loop structure, theoretically, would induce the cleavage and degradation of the RNA viral genome. Large-scale small RNA cloning studies failed to identify viral-encoded miRNAs from various viruses with RNA genomes (Pfeffer *et al.*, 2005)
Recently, it has been shown that RNA viruses can be engineered to produce functional miRNA (Rouha *et al.*, 2010; Varble *et al.*, 2010). Cytoplasmic viral miRNA can be processed by noncanonical mechanisms, which is a Dicer-dependent, DGCR8-independent pathway (Shapiro *et al.*, 2010). In RABV infection, bioinformatics analysis using the Vir-mir

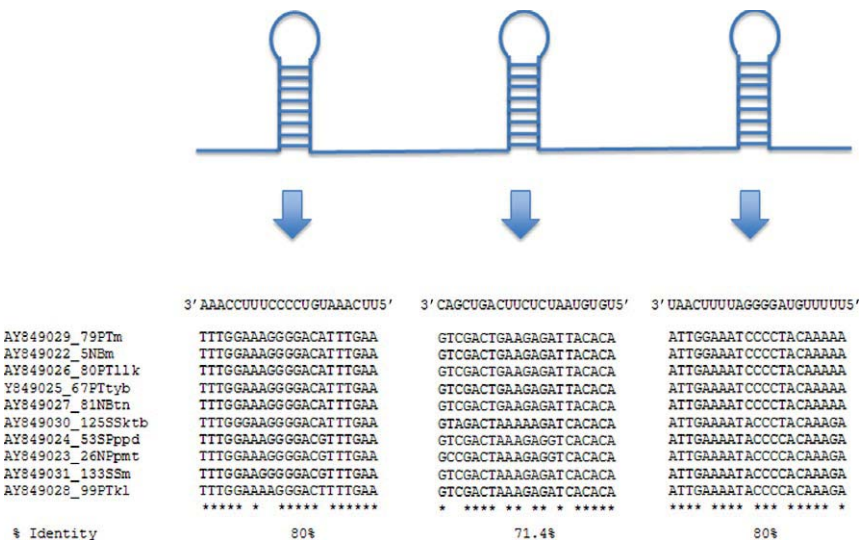


FIGURE 4 Diagram showing genetic variability of wild-type RABV in Thailand and its effect on miRNA target selection. Based on sequences of RABV N gene from 237 samples of rabies infected dogs in Thailand during 1998–2002 (Denduagboripant *et al.*, 2005), any prechosen 22-nt target sequences for amiR inhibition will have a small but significant chance for not forming a perfect base-pairing with unknown wild-type RABV NmRNA.

database (Li *et al.*, 2008) identifies two potential stem-loop structures within the *L* gene transcript and also in the intergenic region of some RABV strains. We also found that incorporation of an miRNA precursor within HEP-Flury genome can produce functional miRNA and does not interfere with viral replication (Israsena *et al.*, unpublished data). It is still unclear whether wild-type RABV can produce miRNA or a distinct form of noncoding RNA other than leader RNA and whether this may play a role in rabies pathogenesis.

IV. INHIBITION OF RABIES VIRAL REPLICATION BY siRNA/amiRNA

Rabies is a fatal human disease that remains a serious public health problem in many countries. More than 50,000 persons die of rabies each year (World Health Organization, 2005). Once the symptoms develop, there is no effective treatment (Hemachudha *et al.*, 2006). RNAi technology has rapidly evolved to become one of the promising approaches for the treatment of viral infections. RNAi can be initiated in target cells by either applying exogenous synthetic dsRNA molecules or using plasmid/viral vector constructs containing short-hairpin RNA (shRNA) or a pre-miRNA backbone that can be processed into amiRNAs. It has been demonstrated that expression of amiRNAs is more effective and less toxic than the regular shRNA vectors (Boden *et al.*, 2004; Li and Ding, 2006; McBride *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2007). Results from many *in vivo* studies (McCaffrey *et al.*, 2003) and a phase I clinical trial (DeVincenzo *et al.*, 2010) provide the proof-of-concept for the use of an RNAi as a therapeutic agent in humans. We will discuss the progress that has been made and roadblocks needed to overcome to develop siRNA/miRNA into new therapeutic modalities for RABV infection.

There have been many approaches to inhibit viral infections such as inhibiting viral RNA replication, silencing viral accessories, inhibiting the assembly of viral particles, and blocking virus–host interactions. The proteins of the RNP complex, nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), and polymerase (L), are important for both viral transcription and replication. Therefore, they are considered as candidates for siRNA/miRNA inhibition. Pioneering studies in searching for genetic suppressor elements that inhibit RABV replication also identified rabies N and P as effective targets (Wunner *et al.*, 2004). It has been shown in VSV infection that siRNA against PmRNA can reduce viral replication (Barik, 2004).

In RABV infection, it has been reported that siRNA designed against NmRNA can partially protect BHK-21 cells from rabies viral infection as shown by a reduction of fluorescent intensity with the direct fluorescent antibody test (Brandao *et al.*, 2007). Further, the application of amiRNA

designed against NmRNA prior to or after infection of neural cells with RABV significantly reduced rabies viral mRNA and its replication (Israsena *et al.*, 2009). These results suggest that N may be a viable target for inhibition. It is possible that siRNA/miRNA designed against P and L mRNA could also be strong inhibitors of RABV replication. Recent studies have demonstrated the important role of P protein in suppressing the IFN pathway (Ito *et al.*, 2010) and, therefore, promotion of innate immune responses to RABV may be possible by inhibiting P mRNA.

Similar to what has been previously shown in the case of other negative dsRNA viruses, such as VSV and respiratory syncytial virus (RSV), the RABV genome is protected from the RNAi pathway (Israsena *et al.*, unpublished data). Yet, it is still unclear whether targeting viral genome can alter its pathogenicity. Recombinant VSVs, which incorporate miRNA target sequences in the viral genome, showed significant reduction in neurotoxicity in the presence of amiRNA as compared to wild-type virus, and these recombinant viruses showed distinct tissue tropism (Kelly and Russell, 2009; Kelly *et al.*, 2010).

One of the major concerns in using siRNA against RNA viruses is the high rate of viral mutations that can lead to the loss of siRNA efficacy. As RNAi relies upon a nearly perfect sequence complementary between a siRNA molecule and the viral RNA target, the accumulation of mutations can render that virus to become resistant to RNAi suppression. This phenomenon has been observed in chronic HIV infection (Das *et al.*, 2004). Although cellular miRNA can inhibit mRNA translation when there is (are) mismatch(s) in base pairing outside the seeding region of the miRNA, a near perfect base pairing is still required for mRNA cleavage. Analysis of data from sequences of amiRNA against those of RABV demonstrated that amiRNA construct activity can be reduced when mismatching with target sequences occurs at critical sites (Israsena *et al.*, 2009). This issue is of particular concern if amiRNA is to be developed as a therapeutic option. In the clinical setting, the patient must receive treatment as early as possible. Data from country-wide survey of wild-type rabies sequences suggested that even within the conserved region of rabies N gene (Denduangboripant *et al.*, 2005), one-third of nucleotides studied showed significant degree of genetic variability (5–49%). Because these variable nucleotides are present in every 10–15 nt of the gene, it is not possible to predesign amiRNA that can perfectly match the wild-type virus even within the same country. This potential limitation may be solved by using vectors containing multiple RNAi molecules such as amiRNA, long-hairpin RNAs (lhRNA), and modified hairpin RNA (mRNAs; Haasnoot *et al.*, 2007) to enable simultaneous targeting of different sites. Efficient inhibition by lhRNAs has been reported for viruses, such as HIV-1 and HBV (Konstantinova *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Weinberg *et al.*, 2007).

MRI studies suggest that, unlike other causes of viral encephalitis, the blood–brain barrier (BBB) remains intact until a late stage of RABV infection (Laothamatas *et al.*, 2003). Intactness of the BBB precludes entry of therapeutic agents from blood to brain. Safe and effective methods for delivery of siRNA/miRNA to the CNS remain an important unsolved issue. One possible approach for siRNA delivery is by intravenous treatment with modified RABV G incorporated with antiviral siRNA. It has been shown that this strategy can protect mice against fatal West Nile viral encephalitis (Kumar *et al.*, 2007). Another potential strategy is by using viral vectors. Recently, it has been shown that combined systemic injection of SV40 virus with mannitol, which temporarily breaks down the BBB, can effectively deliver transgenes to adult neurons in several regions of the CNS (Louboutin *et al.*, 2010). An appropriate delivery system needs to be developed and tested further in an *in vivo* model.

V. CONCLUSIONS

After decades of studies, several aspects of rabies pathogenesis, such as mechanisms explaining the variable incubation period, virulence, and diversity of clinical manifestations, are still unclear and there is no effective treatment available. Further research on the relationship between noncoding RNA and RABV infection may shed some light on these unanswered questions. Strategies using siRNA/amiRNA to inhibit RABV replication have begun to show promise in an *in vitro* study (Brandao *et al.*, 2007; Israsena *et al.*, 2009). It remains to be seen whether these strategies can be developed into viable therapeutic options. Much work is needed to be done to solve the problem of the delivery issue and long-term efficacy. Due to the limitation of cellular gene silencing machinery, it is very likely that this RNAi approach has to be applied in conjunction with other measures in the real clinical setting.

REFERENCES

- Aparicio, O., Razquin, N., Zaratiegui, M., Narvaiza, I., and Fortes, P. (2006). Adenovirus virus-associated RNA is processed to functional interfering RNAs involved in virus production. *J. Virol.* **80**:1376–1384.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A. E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* **122**:553–563.
- Barik, S. (2004). Control of nonsegmented negative-strand RNA virus replication by siRNA. *Virus Res.* **102**:27–35.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**:281–297.

- Boden, D., Pusch, O., Silbermann, R., Lee, F., Tucker, L., and Ramratnam, B. (2004). Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res.* **32**:1154–1158.
- Brandao, P. E., Castilho, J. G., Fahl, W., Carnieli, P., Jr., Oliveira Rde, N., Macedo, C. I., Carrieri, M. L., and Kotait, I. (2007). Short-interfering RNAs as antivirals against rabies. *Braz. J. Infect. Dis.* **11**:224–225.
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B., and Cohen, S. M. (2003). Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell* **113**:25–36.
- Cai, X., and Cullen, B. R. (2006). Transcriptional origin of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs. *J. Virol.* **80**:2234–2242.
- Cameron, J. E., Fewell, C., Yin, Q., McBride, J., Wang, X., Lin, Z., and Flemington, E. K. (2008). Epstein-Barr virus growth/latency III program alters cellular microRNA expression. *Virology* **382**:257–266.
- Carrington, J. C., and Ambros, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**:336–338.
- Carthew, R. W., and Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**:642–655.
- Chen, J. F., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu, Q., Callis, T. E., Hammond, S. M., Conlon, F. L., and Wang, D. Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* **38**:228–233.
- Choy, E. Y., Siu, K. L., Kok, K. H., Lung, R. W., Tsang, C. M., To, K. F., Kwong, D. L., Tsao, S. W., and Jin, D. Y. (2008). An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J. Exp. Med.* **205**:2551–2560.
- Cullen, B. R. (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol. Cell* **16**:861–865.
- Cullen, B. R. (2009). Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs. *Nature* **457**:421–425.
- Cullen, B. R. (2010). Five questions about viruses and microRNAs. *PLoS Pathog.* **6**:e1000787.
- Dalmay, T., and Edwards, D. R. (2006). MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene* **25**:6170–6175.
- Das, A. T., Brummelkamp, T. R., Westerhout, E. M., Vink, M., Madiredjo, M., Bernards, R., and Berkhout, B. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J. Virol.* **78**:2601–2605.
- Denduagboripant, J., Wacharapluesadee, S., Lumlertdacha, B., Ruankaew, N., Hoonswan, W., Puanghat, A., and Hemachudha, T. (2005). Transmission dynamics of rabies virus in Thailand: Implications for disease control. *BMC Infect. Dis.* **5**:52.
- DeVincenzo, J., Lambkin-Williams, R., Wilkinson, T., Cehelsky, J., Nochur, S., Walsh, E., Meyers, R., Gollob, J., and Vaishnav, A. (2010). A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:8800–8805.
- Dykxhoorn, D. M. (2007). MicroRNAs in viral replication and pathogenesis. *DNA Cell Biol.* **26**:239–249.
- Ellis-Connell, A. L., Iempridee, T., Xu, I., and Mertz, J. E. (2010). Cellular microRNAs 200b and 429 regulate the Epstein-Barr virus switch between latency and lytic replication. *J. Virol.* **84**:10329–10343.
- Grey, F., Antoniewicz, A., Allen, E., Saugstad, J., McShea, A., Carrington, J. C., and Nelson, J. (2005). Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs. *J. Virol.* **79**:12095–12099.
- Guo, L., and Lu, Z. (2010). The fate of miRNA* strand through evolutionary analysis: Implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PLoS ONE* **5**:e11387.

- Gupta, A., Gartner, J. J., Sethupathy, P., Hatzigeorgiou, A. G., and Fraser, N. W. (2006). Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature* **442**:82–85.
- Haasnoot, J., Westerhout, E. M., and Berkhout, B. (2007). RNA interference against viruses: Strike and counterstrike. *Nat. Biotechnol.* **25**:1435–1443.
- Hemachudha, T., Sunsaneewitayakul, B., Desudchit, T., Suankratay, C., Sittipunt, C., Wacharapluesadee, S., Khawplod, P., Wilde, H., and Jackson, A. C. (2006). Failure of therapeutic coma and ketamine for therapy of human rabies. *J. Neurovirol.* **12**:407–409.
- Hsu, P. W., Lin, L. Z., Hsu, S. D., Hsu, J. B., and Huang, H. D. (2007). ViTa: Prediction of host microRNAs targets on viruses. *Nucleic Acids Res.* **35**:D381–D385.
- Israsena, N., Supavonwong, P., Ratanasetyuth, N., Khawplod, P., and Hemachudha, T. (2009). Inhibition of rabies virus replication by multiple artificial microRNAs. *Antiviral Res.* **84**:76–83.
- Ito, N., Moseley, G. W., Blondel, D., Shimizu, K., Rowe, C. L., Ito, Y., Masatani, T., Nakagawa, K., Jans, D. A., and Sugiyama, M. (2010). Role of interferon antagonist activity of rabies virus phosphoprotein in viral pathogenicity. *J. Virol.* **84**:6699–6710.
- Jackson, A. C. (2008). Rabies. *Neurol. Clin.* **26**:717–726, ix.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., and Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**:19–53.
- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* **309**:1577–1581.
- Jovanovic, M., and Hengartner, M. O. (2006). miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene* **25**:6176–6187.
- Kelly, E. J., and Russell, S. J. (2009). MicroRNAs and the regulation of vector tropism. *Mol. Ther.* **17**:409–416.
- Kelly, E. J., Nace, R., Barber, G. N., and Russell, S. J. (2010). Attenuation of vesicular stomatitis virus encephalitis through microRNA targeting. *J. Virol.* **84**:1550–1562.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**:209–216.
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**:376–385.
- Kim, H. K., Lee, Y. S., Sivaprasad, U., Malhotra, A., and Dutta, A. (2006). Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J. Cell Biol.* **174**:677–687.
- Kim, W., Benhamed, M., Servet, C., Latrasse, D., Zhang, W., Delarue, M., and Zhou, D. X. (2009). Histone acetyltransferase GCN5 interferes with the miRNA pathway in Arabidopsis. *Cell Res.* **19**:899–909.
- Konstantinova, P., de Vries, W., Haasnoot, J., ter Brake, O., de Haan, P., and Berkhout, B. (2006). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by RNA interference using long-hairpin RNA. *Gene Ther.* **13**:1403–1413.
- Kumar, P., Wu, H., McBride, J. L., Jung, K. E., Kim, M. H., Davidson, B. L., Lee, S. K., Shankar, P., and Manjunath, N. (2007). Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* **448**:39–43.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**:853–858.
- Laothamatas, J., Hemachudha, T., Mitrabhakdi, E., Wannakrairot, P., and Tulayadaechanont, S. (2003). MR imaging in human rabies. *AJNR Am J. Neuroradiol.* **24**:1102–1109.
- Lecellier, C. H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saib, A., and Voinnet, O. (2005). A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* **308**:557–560.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**:843–854.

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**:415–419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**:4051–4060.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**:15–20.
- Li, F., and Ding, S. W. (2006). Virus counterdefense: Diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**:503–531.
- Li, S. C., Shiau, C. K., and Lin, W. C. (2008). Vir-Mir db: Prediction of viral microRNA candidate hairpins. *Nucleic Acids Res.* **36**:D184–D189.
- Lian, H., Liu, W., Liu, Q., Jin, H., Sun, Y., Li, J., Xia, Z., and Gao, H. (2010). A laboratory-attenuated vesicular stomatitis virus induces apoptosis and alters the cellular microRNA expression profile in BHK cells. *Arch. Virol.* **155**:1643–1653.
- Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2003). Vertebrate microRNA genes. *Science* **299**:1540.
- Linnstaedt, S. D., Gottwein, E., Skalsky, R. L., Luftig, M. A., and Cullen, B. R. (2010). Virally induced cellular microRNA miR-155 plays a key role in B-cell immortalization by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* **84**:11670–11678.
- Liu, Y. P., Haasnoot, J., ter Brake, O., Berkhout, B., and Konstantinova, P. (2008). Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron. *Nucleic Acids Res.* **36**:2811–2824.
- Louboutin, J. P., Chekmasova, A. A., Marusich, E., Chowdhury, J. R., and Strayer, D. S. (2010). Efficient CNS gene delivery by intravenous injection. *Nat. Methods* **7**:905–907.
- Lu, L. F., and Liston, A. (2009). MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology* **127**:291–298.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**:95–98.
- McBride, J. L., Boudreau, R. L., Harper, S. Q., Staber, P. D., Monteys, A. M., Martins, I., Gilmore, B. L., Burstein, H., Peluso, R. W., Polisky, B., Carter, B. J., and Davidson, B. L. (2008). Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: Implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:5868–5873.
- McCaffrey, A. P., Nakai, H., Pandey, K., Huang, Z., Salazar, F. H., Xu, H., Wieland, S. F., Marion, P. L., and Kay, M. A. (2003). Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **21**:639–644.
- Otsuka, M., Jing, Q., Georgel, P., New, L., Chen, J., Mols, J., Kang, Y. J., Jiang, Z., Du, X., Cook, R., Das, S. C., Pattnaik, A. K., Beutler, B., and Han, J. (2007). Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity* **27**:123–134.
- Pedersen, I. M., Cheng, G., Wieland, S., Volinia, S., Croce, C. M., Chisari, F. V., and David, M. (2007). Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* **449**:919–922.
- Perez, J. T., Pham, A. M., Lorini, M. H., Chua, M. A., Steel, J., and tenOever, B. R. (2009). MicroRNA-mediated species-specific attenuation of influenza A virus. *Nat. Biotechnol.* **27**:572–576.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F. A., van Dyk, L. F., Ho, C. K., Shuman, S., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Randall, G., Lindenbach, B. D., Rice, C. M., Simon, V., Ho, D. D., Zavolan, M., and Tuschl, T. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* **2**:269–276.
- Qu, J., Ye, J., and Fang, R. (2007). Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *J. Virol.* **81**:6690–6699.

- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**:901–906.
- Roberts, A. P., and Jopling, C. L. (2010). Targeting viral infection by microRNA inhibition. *Genome Biol.* **11**:201.
- Rouha, H., Thurner, C., and Mandl, C. W. (2010). Functional microRNA generated from a cytoplasmic RNA virus. *Nucleic Acids Res* **38**:8328–8337.
- Schutz, S., and Sarnow, P. (2006). Interaction of viruses with the mammalian RNA interference pathway. *Virology* **344**:151–157.
- Shapiro, J. S., Varble, A., Pham, A. M., and Tenoever, B. R. (2010). Noncanonical cytoplasmic processing of viral microRNAs. *RNA* **16**:2068–2074.
- Skalsky, R. L., and Cullen, B. R. (2010). Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**:123–141.
- Song, L., Liu, H., Gao, S., Jiang, W., and Huang, W. (2010). Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells. *J. Virol.* **84**:8849–8860.
- Sontheimer, E. J., and Carthew, R. W. (2005). Silence from within: Endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell* **122**:9–12.
- Stefani, G., and Slack, F. J. (2008). Small non-coding RNAs in animal development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:219–230.
- Sullivan, C. S., Grundhoff, A. T., Tevethia, S., Pipas, J. M., and Ganem, D. (2005). SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* **435**:682–686.
- Triboulet, R., Mari, B., Lin, Y. L., Chable-Bessia, C., Bennasser, Y., Lebrigand, K., Cardinaud, B., Maurin, T., Barbry, P., Baillat, V., Reynes, J., Corbeau, P., Jeang, K. T., and Benkirane, M. (2007). Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* **315**:1579–1582.
- Umbach, J. L., and Cullen, B. R. (2009). The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes Dev.* **23**:1151–1164.
- Umbach, J. L., Kramer, M. F., Jurak, I., Karnowski, H. W., Coen, D. M., and Cullen, B. R. (2008). MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* **454**:780–783.
- Varble, A., Chua, M. A., Perez, J. T., Manicassamy, B., Garcia-Sastre, A., and tenOever, B. R. (2010). Engineered RNA viral synthesis of microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:11519–11524.
- Weinberg, M. S., Ely, A., Barichievy, S., Crowther, C., Mufamadi, S., Carmona, S., and Arbuthnot, P. (2007). Specific inhibition of HBV replication in vitro and in vivo with expressed long hairpin RNA. *Mol. Ther.* **15**:534–541.
- Witwer, K. W., Sisk, J. M., Gama, L., and Clements, J. E. (2010). MicroRNA regulation of IFN-beta protein expression: Rapid and sensitive modulation of the innate immune response. *J. Immunol.* **184**:2369–2376.
- World Health Organization(2005). WHO Expert Consultation on Rabies: First Report . World Health Organization, Geneva.
- Wunner, W. H., Pallatroni, C., and Curtis, P. J. (2004). Selection of genetic inhibitors of rabies virus. *Arch. Virol.* **149**:1653–1662.
- Xu, P., Vernoooy, S. Y., Guo, M., and Hay, B. A. (2003). The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr. Biol.* **13**:790–795.
- Yeung, M. L., Bennasser, Y., Le, S. Y., and Jeang, K. T. (2005). siRNA, miRNA and HIV: Promises and challenges. *Cell Res.* **15**:935–946.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**:3011–3016.

**Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction, distribution or commercial use.**

This chapter was originally published in the book *Advances in Virus Research*, Vol. 79, published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues who know you, and providing a copy to your institution's administrator.



All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

From Jiraporn Laothamatas, Witaya Sungkarat, and Thiravat Hemachudha, Neuroimaging in Rabies. In Alan Jackson, editor: *Advances in Virus Research*, Vol. 79, Burlington: Academic Press, 2011, pp. 309-327.

ISBN: 978-0-12-387040-7

© Copyright 2011 Elsevier Inc.

Academic Press.

CHAPTER 14

Neuroimaging in Rabies

**Jiraporn Laothamatas,^{*} Witaya Sungkarat,^{*} and
Thiravat Hemachudha[†]**

Contents		
	I. Introduction	310
	II. Neuroimaging Techniques	311
	A. CT images	311
	B. MR techniques	312
	III. Neuroimaging in Rabies	314
	A. MRI in human rabies during different stages	316
	B. Dog rabies as a model in studying furious and paralytic presentations	320
	IV. Newer Neuroimaging Techniques in Rabies	320
	V. Conclusions	324
	Acknowledgments	325
	References	325

Abstract Rabies remains a virtually incurable disease once symptoms develop. Neuroimaging studies demonstrate lesions in the different parts of the neuroaxis, even before brain symptoms are evident. These abnormalities have been detailed in both rabies virus-infected humans and dogs with magnetic resonance imaging (MRI). MRI disturbances were similar in both forms (furious or paralytic) in human rabies; however, they were more pronounced in paralytic than in furious rabies virus-infected dogs in which examination was done early in the disease course. Abnormalities were not confined only to neuronal structures of hippocampus, hypothalamus, basal ganglia, and brain stem but also extended to

^{*} Advanced Diagnostic Imaging and Image-Guided Minimal Invasive Therapy Center (AIMC) and Department of Radiology, Ramathibodi Hospital, Faculty of Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand
[†] Department of Medicine (Neurology) and WHO Collaborating Center in Research and Training on Viral Zoonoses, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

white matter. The blood–brain barrier (BBB) has been clearly shown to be intact during the time rabies virus-infected patients and dogs remained conscious, whereas leakage was demonstrated as soon as they became comatose. Although the location of MRI abnormalities can help diagnosing rabies, the intensities of signals are usually not very distinct and sometimes not recognizable. Newer techniques and protocols have been developed and utilized, such as diffusion-weighted imaging and diffusion tensor imaging, and the latter provides both qualitative and quantitative data. These techniques have been applied to normal and rabies virus-infected dogs to construct fractional anisotropy and mean diffusivity maps. Results showed clear-cut evidence of BBB intactness with absence of vasogenic brain edema and preservation of most neuronal structures and tracts except at the level of brainstem in paralytic rabies-infected dogs. Neuroimaging is one of the most useful tools for the *in vivo* study of central nervous system infections.

I. INTRODUCTION

Rabies is acute and invariably fatal encephalitis in humans. Dog variant of genotype 1 in the genus *Lyssavirus* is responsible for the vast majority of human rabies deaths worldwide, whereas bat variant (from hematophagous and nonhematophagous bats) has been associated with sporadic cases and outbreaks in the Americas. After successful introduction of virus into the wound, the virus gains entry to the central nervous system (CNS) by fast axonal transport along the nerves (Dirk *et al.*, 2001; Hemachudha and Phuapradit, 1997; Hemachudha *et al.*, 2002, 2005). Various degrees of inflammation of the peripheral nerves, dorsal root ganglia, and spinal cord, especially at the level of bite site, have been observed at postmortem examination. They are in accord with the findings of electrophysiological and neuroimaging studies (Laothamatas *et al.*, 2003; Mitrabhakdi *et al.*, 2005). Myelinopathy or axonopathy underlies motor weakness in the case of human paralytic rabies (Mitrabhakdi *et al.*, 2005; Sheikh *et al.*, 2005). CNS innate immunity, inversely correlated with viral load in the brain, may be responsible for variable results in magnetic resonance imaging (MRI) of the brains in furious and paralytic dogs (Laothamatas *et al.*, 2008). Despite differences in MR signal intensities in the rabies virus-infected dog brains with furious and paralysis, the abnormalities are localized in similar brain regions in both clinical forms. Presence of abnormal, albeit trivial, brain MR signals during the presymptomatic phase and the lack of correlation between clinical limbic involvement and MR localization suggest functional and/or

microstructural damage at vulnerable sites. This requires alternative strategies that can focus on the integrity of neurons and tracts interconnecting different brain regions. The status of the blood–brain barrier (BBB) and nature of edematous processes (cytotoxic and vasogenic types) should also be monitored in parallel.

II. NEUROIMAGING TECHNIQUES

Neuroimaging techniques are composed of structural imaging, including computerized tomography (CT) and MRI as well as advanced imaging that can demonstrate functions and molecular and chemical metabolites in the CNS. Upon viewing the images of the CNS in encephalitis, it must be noted that they result from the process of infection itself and the host reaction, which can be variable from necrosis to apoptosis or other type of neuronal cell death process. This may be further complicated by insult(s) from accompanied systemic (such as prolonged hypoxia, shock, bleeding disorder) or metabolic (e.g., electrolyte imbalance or renal insufficiency) derangements. Preferential sites of involvement as shown by neuroimaging can be used as signatures for encephalitis caused by particular pathogens. This is particularly useful when combined with information about the clinical stage of disease (e.g., level of consciousness, cardiopulmonary status), presence of comorbidity of other organ systems, presence of single or multiple sites of involvement along the neuroaxis (brain alone vs. combination of brain, brainstem, spinal cord, and nerve roots), symmetrical or asymmetrical involvement, and status of the BBB. Iodinated contrast enhancement in CT or gadolinium enhancement in MRI depends on the breakdown of the BBB caused by the pathology. In early rabies encephalitis, BBB permeability remains preserved ([Hemachudha et al., 2003](#)), and therefore, no parenchymal enhancement is detected. However, in the late or comatose phase of the disease, there is BBB breakdown along the midline structures of the brain and spinal cord associated with gadolinium-enhancing lesions ([Laothamatas et al., 2003](#)).

A. CT images

CT scan is one of the structural image techniques based on density information technology ([Goldman, 2007](#)). The gray scale levels of the images indicate density of the structures, such as air and bone shown as dark and white, respectively. The gray matter has a higher gray level than the white matter. Water and fluid have levels of gray according to

their contents. In edematous brain, a slightly decreased CT density is shown as compared to the normal brain parenchyma. In the diffuse or localized brain infections, such as caused by neurotropic viruses, mild mass effect causing effacement of the sulci and gyri and slightly decreased density of adjacent structures are expected findings. In certain circumstances, there may be associated focal or multiple foci of hemorrhages demonstrated as high-density signals with mass effect such as in the case of Japanese encephalitis and herpes simplex encephalitis (Kalita *et al.*, 2003). CT scan of the brain is not useful in diagnosing human rabies, which is due to very subtle changes in brain structure. Very late cases may suffer from hypoxia and show mild diffuse brain swelling, hyperdensity of bilateral basal ganglia, or cerebral hemorrhage (Awasthi *et al.*, 2001). Cerebral blood flow or perfusion studies have no clinical value in the diagnosis of human rabies. Claims of the clinical significance of cerebral arterial vasospasm as the result of deficiency of neural metabolites in human rabies have led to potentially harmful administration of vasodilators (Willoughby *et al.*, 2008). There has been no clinical or radiological evidence of vascular territory ischemia or infarction in any case of rabies patients during life. This is also true in postmortem examination (Hemachudha and Wilde, 2009).

B. MR techniques

MR is the imaging technique of choice when confronted with patients with encephalopathy/encephalitis because of its high sensitivity in detecting brain parenchymal abnormalities (Jacobs *et al.*, 2007; Kastrup *et al.*, 2005, 2008). Differentiation between fat, blood products, and pathological tissue with high-proteinaceous content is also accurate. In addition, there are several advanced MR techniques to demonstrate functional and molecular and metabolites in the CNS (Chavhan *et al.*, 2009; Poustchi-Amin *et al.*, 2001). These are functional MRI, perfusion MRI, diffusion MRI, diffusion tensor imaging (DTI), tractography (Lee *et al.*, 2005), and MR spectroscopy.

1. MR pulse sequences

There are multiple MR pulse sequences to demonstrate the structures and changes in CNS structures. These include T1-weighted images for anatomy evaluation, T2-weighted images for tissue abnormality detection, and T2-fluid attenuation inversion recovery (FLAIR) images (Simonson *et al.*, 1996), which are T2-weighted images with subtraction of the high water signal intensity enabling better detection of the abnormality along the sulci and periventricular areas. Gradient pulse sequence and susceptibility images are sensitive for paramagnetic effects such as blood products and calcification (Haacke *et al.*, 2009; Mittal *et al.*, 2009; Rauscher

et al., 2005; Tong *et al.*, 2008), which are particularly helpful in detecting minute hemorrhages.

2. Diffusion-weighted images and DTI

Diffusion-weighted images (DWI) demonstrate the degree of Brownian movement of the water (H₂O) molecules in tissues (Hagmann *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2006). In biologic tissues, the interaction between the cellular structures and water molecules determines the degree of diffusion of H₂O molecules, representing the tissue structure at the microscopic level, so-called molecular imaging. When there is neuronal cell swelling or cytotoxic edema, causing narrowing of the interstitial spaces, H₂O molecules then move slower or become trapped causing bright signal on DWI and decreased or hyposignal on apparent diffusion coefficient (ADC) images, indicating restriction in diffusion of the H₂O molecules. In the case of vasogenic edema or gliosis, which results in wider interstitial spaces, the H₂O molecules are likely to move freely. Therefore, this results in increased water diffusion demonstrated as hyposignal in DWI and increased or hypersignal on ADC images. In the early encephalitis phase, with only mild neuronal swelling and no apparent breakdown of cell membranes or leakage of the BBB, no or only subtle changes are evident on T2-weighted or FLAIR images. DWI has been reported to be a sensitive technique at this stage of the disease (Kiroğlu *et al.*, 2006; Prakash *et al.*, 2004).

DTI measures both the direction and magnitude of the H₂O molecules movement designated as fractional anisotropy (FA). Quantification units of diffusion are mean diffusivity (MD) measured in mm²/s. In CNS tissues, due to the presence of white matter tracts, the diffusion of the H₂O molecules is not equal in all directions but preferentially moves along white matter tracts. Such movement is limited across the white matter tracts, which is the so-called anisotropic phenomenon. This phenomenon can be used to assess the integrity of the white matter tract, such as in demyelinating processes, in which there are decreased FA values. Quantification of FA values between the diseased brain and normal brain can aid the early detection of demyelination (Assaf and Pasternak, 2008).

3. Proton MR spectroscopy

Proton MR spectroscopy is an advanced MR technique using chemical shift phenomenon of hydrogen atoms in different tissues shown as spectra of different metabolites in the brain with definite locations of each metabolite in part per million (ppm) regardless of magnet field strength (Barker, 2009; Barker and Lin, 2006; Dirk *et al.*, 2001; Jansen *et al.*, 2006; Mark, 2006; Yael and Robert, 2007). Examples are *N*-acetyl aspartate (NAA) peak, a neuronal marker, at 2.0 ppm; choline (Cho) peak, a cell membrane metabolite, at 3.2 ppm; creatine (Cr) peak, a mitochondrial energy metabolism

marker, at 3.0 ppm; myo-inositol (mI) peak, a glial/astrocyte-specific marker, at 3.5 ppm; Lactate (Lac) peak, anaerobic respiratory marker, at 1.3–1.5 ppm; Glutamine/Glutamate (Glx) peak, neuronal transmitter marker, at 2.1–2.4 and 3.6–3.8 ppm; and the lipid peak, tissue necrosis marker, at 0.9–1.2 ppm. In the case of encephalitis with neuronal cell damage and inflammatory change/gliosis, proton MR spectroscopy demonstrates decreased NAA peak indicating neuronal cell damage, increased Cho peak due to cell membrane breakdown, and mildly increased mI peak due to glial cell damage (Gillard, 2009). Proton MR spectroscopy has been applied in the study of rabies in dogs (Laothamatas, unpublished data) (Fig. 1).

III. NEUROIMAGING IN RABIES

There have been several reported neuroimaging studies of human rabies associated with dog- and bat variants and organ transplantation (Burton *et al.*, 2005; Desai *et al.*, 2002; Hemachudha *et al.*, 2002; Laothamatas *et al.*, 2003; Pleasure and Fischbein, 2000). The imaging findings of these cases were similar although some aspects varied, such as the extent of involvement and degree of signal intensity and presence of contrast enhanced lesions. These findings might be dependent on the time after clinical onset when the examination was done, the status of immune responses in the brain, and the nature of virus variants. An intense reaction and widespread brain involvement were noted in the cases of rabies associated with organ transplantation in which immunosuppressive agents were withdrawn. This might reflect an immune reconstitution inflammatory-like syndrome (Johnson and Nath, 2009). Preferential sites in human rabies, as demonstrated in MR images, are spinal cord, brain stem, thalami, limbic structures, and white matter with hypersignal T2 changes, but with a very mild degree of mass effect. Some degree of progression involving basal ganglia and cortical gray matter can subsequently develop during the disease course, probably due to virus-induced neuronal injury as well as superimposed hypoxic insult (Awasthi *et al.*, 2001; Burton *et al.*, 2005; Desai *et al.*, 2002; Laothamatas *et al.*, 2003). Owing to the lack of specific patterns in differentiating between furious and paralytic rabies in humans, which might be due to the delay in the timing of examinations, MR studies in early stages of dog rabies were performed (Fig. 2; Laothamatas *et al.*, 2008).

In theory, all main imaging techniques, both basic and advanced MR, should be employed due to its high sensitivity in detecting tissue abnormalities at all levels of peripheral nerves, brachial plexus, spinal cord, and the brain, especially the brain stem and thalami. Quantitative imaging techniques such as MD and FA maps can be used for early detection, prior

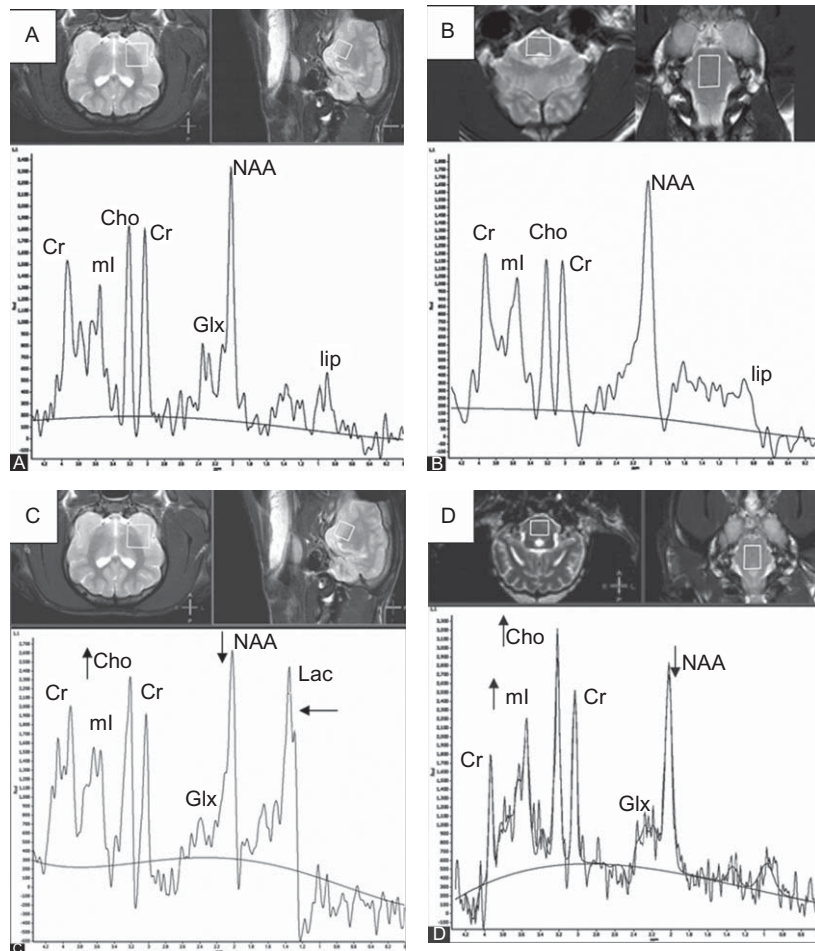


FIGURE 1 Single voxel proton MR spectroscopy with short TE. (A and B) MR spectroscopy of the normal dog brain at the temporal lobe (A) and brain stem (B). (C and D) MR spectroscopy of a dog with furious rabies at the temporal lobe (C) and the brain stem (D) demonstrating decreased NAA peak at 2.0 ppm, indicating neuronal loss, mild increased Cho peak at 3.2 ppm, indicating cell membrane destruction either from neuronal damage or a demyelinating process. Also seen is increased ml peak at 3.56 ppm, indicating glial cells/astrocyte damage, and the presence of a Lac peak is observed at 1.3 ppm, indicating anaerobic respiratory cycle of the rabid dog compared to the normal dog spectra.

to stages of disease with obvious structural damage. Nevertheless, MD or FA map is neither presently available nor reliable without the normative values of healthy controls. Brain metabolite abnormalities can assist in diagnosis and follow-up for the progression of the disease.

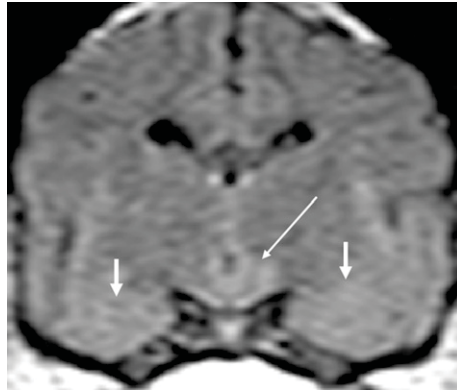


FIGURE 2 Coronal fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) T2-weighted MR image of the early paralytic rabies-infected dog demonstrating ill-defined moderate hyper-signal T2 changes involving the bilateral temporal lobes (short white arrows) and hypothalamus (long thin white arrow) that spares the bilateral frontal cortices.

A. MRI in human rabies during different stages

1. Prodromal phase

It is difficult to diagnose rabies at this stage based on clinical grounds alone unless local neuropathic pain involving the bitten limb is experienced. Although there is no clinical evidence of brain or spinal cord involvement, there has been a report (Laothamatas *et al.*, 2003) of MR abnormalities in a furious rabies patient demonstrated as enhancing hypersignal T2 changes along the brachial plexus and associated spinal nerve roots at the corresponding levels of the bitten extremity (Fig. 3). Also demonstrated are nonenhancing ill-defined mild hypersignal T2 intensity changes of the spinal cord and temporal lobe cortices and the hippocampal gyri as well as the cerebral white matter (Fig. 4) (Laothamatas *et al.*, 2003). Electrophysiologic studies of the nerves and muscles, done at the same time, showed sensory neuronopathy and evidence of subclinical anterior horn cell dysfunction (Mitrabhakdi *et al.*, 2005).

2. Acute neurological phase

MRI in both clinical forms is indistinguishable regardless of virus variants (dog or bat). A similar pattern, as previously described, in the prodromal phase, is still seen but with slight progression in space and in degree of signal intensity along the spinal cord, thalami, hypothalami, white matter, and temporal lobes. BBB remains intact as long as the patient remains rousable (Fig. 5). Prominent diffuse hypersignal T2 changes of the cerebral white matter were noted in a furious rabies patient who had received

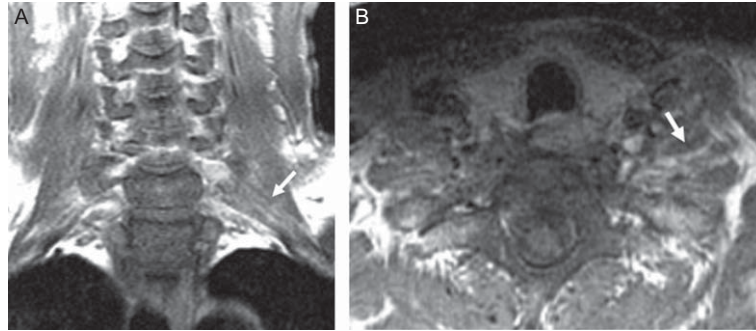


FIGURE 3 MR images of the brachial plexus of a 50-year-old male with furious rabies encephalitis during the prodromal phase. Coronal (A) and axial (B) postgadolinium T1-weighted MR images with fat suppression demonstrating enhancing left brachial plexus located between the anterior scalene and middle/posterior scalene muscles (white arrows in A and B). A is reproduced with permission from [Laothamatas *et al.* \(2003\)](#).

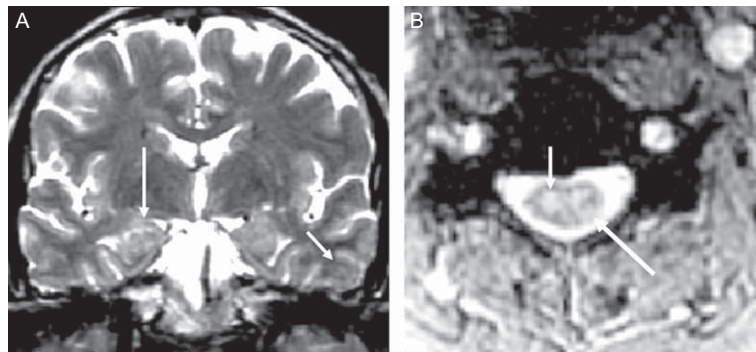


FIGURE 4 MR images of a 50-year-old male with furious rabies during the prodromal phase. (A) coronal fast spin echo T2-weighted images of the brain demonstrating ill-defined nonenhancing mild to moderate hypersignal T2 change at the amygdala and hippocampi (long white arrow) and adjacent temporal cortical gray matter (short white arrow). (B) axial gradient T2-weighted image of the cervical cord at the C4 level demonstrating ill-defined moderate hypersignal T2 changes of the cervical cord involving both central gray and left posterolateral white matter column (short and long white arrows).

very high dose of intravenous human rabies immune globulin (HRIG; [Hemachudha *et al.*, 2003](#)). An immune-mediated process may have also contributed to such white matter changes in this case. Prominent cerebral white matter changes can also be seen in patients with acute disseminated encephalomyelitis following rabies postexposure prophylaxis with brain tissue-derived vaccine ([Desai *et al.*, 2002](#)).

3. Comatose phase

Superimposed insults, such as hypoxia and ischemia, complicate the imaging findings (Burton *et al.*, 2005; Desai *et al.*, 2002). However, the striking change is BBB leakage that is noted as moderate enhancement along the hypothalamus, mammillary bodies, thalami, substantia nigra, tectal plates, brain stem, spinal cord, deep gray nuclei, cranial nerve nuclei, and optic tracts, and mild enhancement of the cisternal fifth and sixth cranial nerves (Figs. 6 and 7). Vivid enhancement of the intrathecal

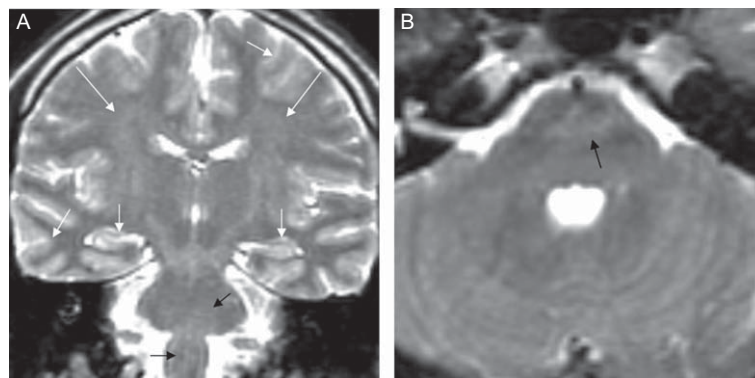


FIGURE 5 MR images of a patient with furious rabies in an acute neurological phase receiving high-dose intravenous human rabies immune globulin. Coronal (A) and axial (B) fast spin echo T2-weighted MR images of the frontal and temporal lobes and brain stem demonstrating extensive moderate ill-defined nonenhancing hypersignal T2 change involving bilateral hippocampi, temporal lobes, and frontal cortices (short white arrows in A); frontal subcortical and deep white matter (long thin white arrows in A); and the brainstem (small black arrows in A and B).

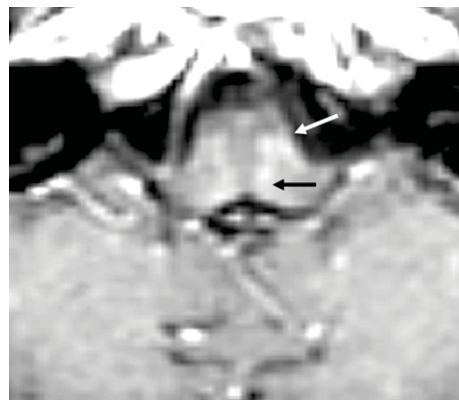


FIGURE 6 MR images of a 72-year-old comatose patient with paralytic rabies. Post-gadolinium axial T1-weighted image of the medulla demonstrating moderate enhancing olivary nuclei (white arrow) and hypoglossal nerve nuclei (black arrow).

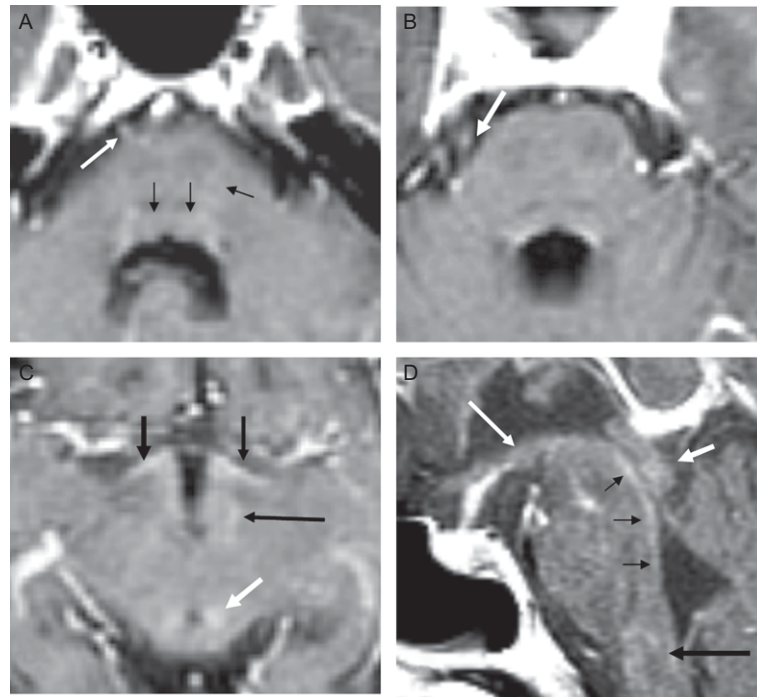


FIGURE 7 Postgadolinium axial T1-weighted images of a comatose patient with paralytic rabies at the brain stem (A, B), midbrain and hypothalamus (C), and mid sagittal view (D) demonstrating mild enhancement of the right sixth and fifth cranial nerves (white arrows in A and B) and the optic tracts (small black arrows in C). Moderate enhancement of the facial colliculi and nuclei of the sixth and seventh, cranial nerves and their tracts (small black arrows in A), the tectal plates and third cranial nerve nuclei (white arrows in C and D) and enhancement along the floor of the aqueduct of Sylvius and fourth ventricle (small black arrows in D) and the medulla (long black arrow in D). Moderate enhancement of the hypothalamus including the mamillary bodies (long white arrows in C and D). D is reproduced with permission from [Laothamatas et al. \(2003\)](#).

ventral and dorsal nerve roots could also be demonstrated ([Fig. 8](#); [Burton et al., 2005](#); [Hemachudha et al., 2002](#); [Laothamatas et al., 2003](#); [Pleasure and Fischbein, 2000](#)).

It should be emphasized that MR images were similar in rabies patients associated with dog or bat variants in terms of location and pattern of abnormal signal intensity ([Pleasure and Fischbein, 2000](#); [van Thiel, 2009](#)). Features of MR images in rabies are summarized in [Table I](#).

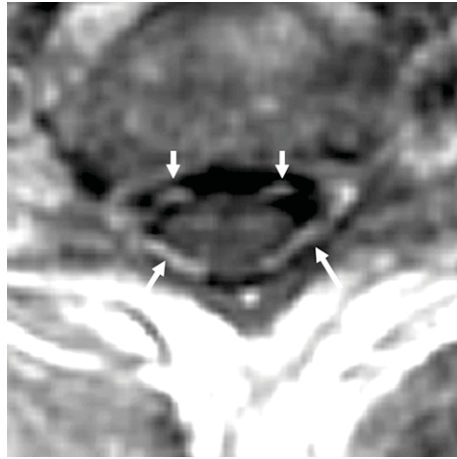


FIGURE 8 Axial T1-weighted postgadolinium MR images at the C7 level of a 70-year-old comatose patient with paralytic rabies demonstrating vivid enhancement of bilateral intrathecal dorsal and ventral nerve roots (white arrows).

B. Dog rabies as a model in studying furious and paralytic presentations

Sites of lesions in dog rabies at early stages remain similar in furious and paralytic clinical forms and are not different to those found in humans. However, diffuse ill-defined hyperintense T2 abnormalities are seen more frequently in furious dogs than in dogs with paralytic disease. More pronounced hyperintense T2 signals are noted more frequently in paralytic rabies (Laothamatas *et al.*, 2008). These are in accord with the findings of viral load in the brain and degree of CNS innate immune response as determined by cytokine mRNA transcripts. A greater viral load and less CNS immunity are demonstrated in furious rabies (Laothamatas *et al.*, 2008). There is correlation between the degree of hypersignal T2 abnormality and that of CNS immunity as seen in dogs with paralytic rabies (Fig. 2).

IV. NEWER NEUROIMAGING TECHNIQUES IN RABIES

Advanced MRI technology for early detection of abnormalities at the molecular level, DWI and DTI, has greater sensitivity than basic MR in demonstrating micro- and macrostructural damages (Nucifora *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2006). They can be quantifiable and constructed as MD and FA maps of the brain. When compared with the normal map, these maps can demonstrate areas of abnormality at the level of statistical significance

TABLE I Summary of magnetic resonance imaging findings in human rabies^a

Area of examination	Furious rabies				Paralytic rabies		
	Prodromal to early acute neurological phase ^b ++ ^d	Acute neurological to lethargic phase ^c	Comatose phase	Prodromal to early acute neurological phase	Acute neurological to lethargic phase	Comatose phase	
Brachial plexus at bitten limb		N/A ^e	N/A	N/A	N/A	N/A	
Spinal cord	++	N/A	++	++	N/A	++	
Spinal nerve	+	N/A	N/A	N/A	N/A	+++	
Brain stem	++	++	+++	+++	N/A	+++	
Hypothalamus	+	++	+++	++	N/A	++	
Basal ganglia	+	++	+++	+	N/A	+++	
Thalamus	+	++	+++	+	N/A	++	
Temporal lobe and hippocampus	+	++	+++	++	N/A	++	
Frontal lobe	+	++	++	-	N/A	++	
Parietal lobe	+	++	++	-	N/A	++	

(continued)

TABLE I (continued)

		Furious rabies			Paralytic rabies		
Cerebral WM ^f	+	++		++	+	N/A	++
Cranial nerves	N/A	N/A		+	N/A	N/A	+
BBB ^g breakdown	No	No		Yes	No	N/A	Yes

^a See details in text and figures for the MR studies. Data summarized from reports elsewhere (Awasthi *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 2002; Hemachudha *et al.*, 2002; Laothamatas *et al.*, 2003, 2008; Mittrabhakdi *et al.*, 2005).

^b Prodromal to early acute neurological phase: at this stage, the patients do not exhibit an altered sensorium and they are fully alert and rational. The patients studied with magnetic resonance imaging included one with brain-free symptoms who presented with only local neuropathic pain at the bitten limb and patients who had phobic spasms but remained fully conscious.

^c Acute neurological to lethargic phase: the patients exhibit alteration of consciousness between lucid calm and restlessness, which progresses to severe agitation and depressed sensorium, and they remain rousable.

^d + = degree of abnormalities in terms of signal intensity and/or enhancement.

^e N/A = not applicable.

^f WM (white matter) represents subcortical and deep white matter.

^g BBB = Blood-brain barrier, gadolinium-enhanced lesion represents area with BBB breakdown.

(Fig. 9). The status of BBB can also be assessed by DWI and DTI. BBB is intact with no evidence of gadolinium enhancement and this is also confirmed by a finding of decreased MD, indicating neuronal cells

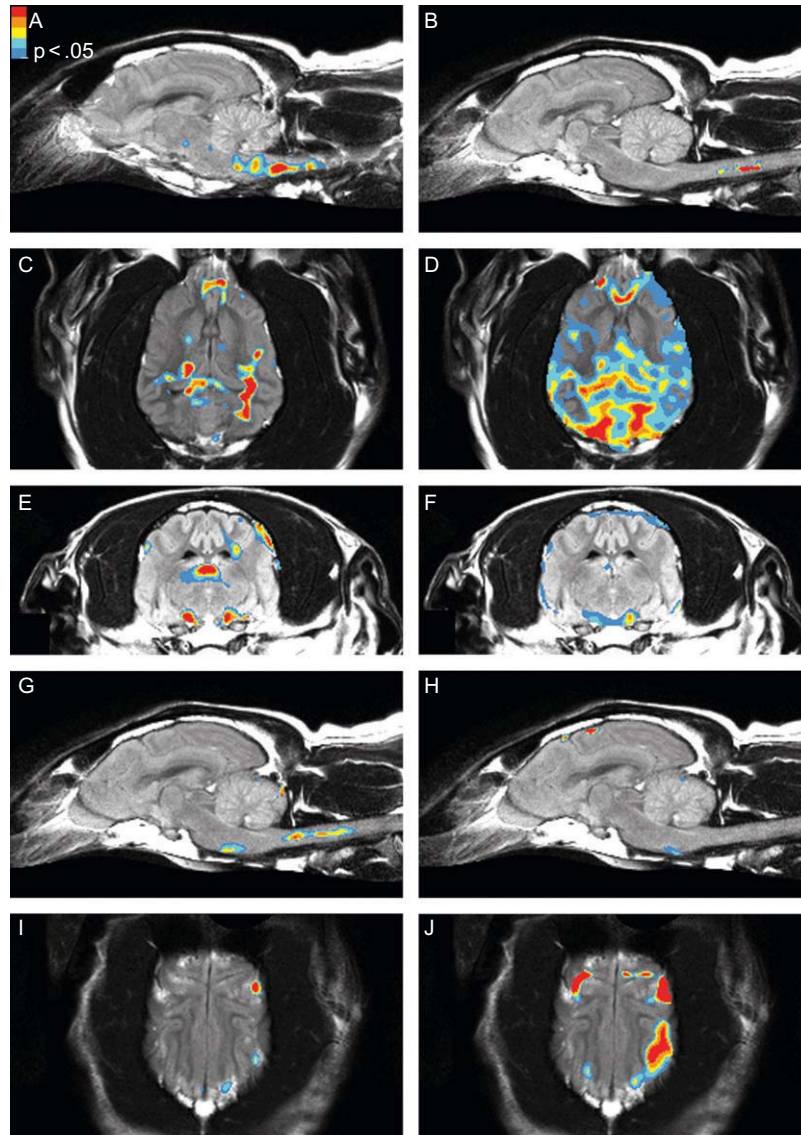


FIGURE 9 *In vivo* MR imaging of the rabies-infected dogs using quantified voxel-based group analyses of normal ($n = 8$) and paralytic ($n = 4$) and furious ($n = 2$) dogs at $p < 0.05$ (scale from blue to red: blue = lower passing threshold, red = highest passing

swelling and limited interstitial spaces. MR spectroscopy also demonstrates the spectra of neuronal damage, glial cell injury, and cell membrane breakdown (Mark, 2006) as shown in a dog with furious rabies compared to a normal dog (Fig. 1). They can also be used to follow up the disease condition and progression by comparing between the quantified MD and FA values and MR spectral ratio.

In the future, molecular imaging of the brain with tissue- or pathogen-specific labeling such as “rabies virus antibody tagged MR contrast” or “iron tagged rabies viruses” may help in the study of viral pathogenesis at an early phase and during the course of the disease and also help in the design of therapeutic strategies (de Backer *et al.*, 2010; Hoehn *et al.*, 2008; Long and Bulte, 2009).

V. CONCLUSIONS

Neuroimaging using both basic and advanced MR techniques has been described in rabies virus-infected humans and dogs and presently should be considered as important tools not only in rabies but also in other encephalitides. Preferential sites of CNS involvement are similar in both clinical forms of human and dog victims. Virus variants, dog or bat, may not have impact upon the pattern of MR abnormalities. Advanced MR techniques may offer opportunities to monitor the sites and degree of micro- and macrostructural changes in the CNS as well as to *in vivo* tracking of viral spread and of host immune cells from the circulation into the CNS parenchyma.

threshold). (A and C) FA voxel-based group analysis map of the paralytic dogs; (B and D) FA voxel-based group analysis map of the furious dogs; (E) Mean diffusivity (MD) voxel-based group analysis map of the paralytic dogs; (F) Mean diffusivity (MD) voxel-based group analysis map of the furious dogs; (G and I) FLAIR signal voxel-based group analysis map of the paralytic dogs; (H and J) FLAIR signal voxel-based group analysis map of the furious dogs. Macrostructural or cellular damage (represented by increased FLAIR signals in G–J) was relatively minimal in rabies virus-infected dog brains. These areas were mostly confined to the brain stem in dogs with paralytic rabies (G) and to the cerebral hemispheres in dogs with furious rabies (J). Impaired neural tract integrity with microstructural damage (represented by diminished FA) was evident more frequently in the case of paralytic rabies at the brain stem (A) in comparison to dogs with furious rabies (B) and more frequently at cerebral hemispheres in furious rabies (J) compared to paralytic rabies (I). Decreased MD (indicative of cytotoxic edema) was noted more frequently in dogs with paralytic (E) than with furious (F) rabies. There was no evidence of BBB damage (or increased MD, not shown). Increased FA, representing faster than normal diffusion of water along the tracts, was found in the cerebral hemispheres more in dogs with furious (D) than with paralytic (C) rabies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ramathibodi Hospital and Ramathibodi Foundation (Advanced Diagnostic Imaging and Image-Guided Minimal Invasive Therapy Center) and Chulalongkorn Hospital (Department of Medicine) and Thai Red Cross Society for support of the imaging studies and of patient and animal care. This chapter was supported from grants by Thailand Research Fund and National Science and Technology Development Agency and Thai Red Cross Society. The work on advanced MRI and whole brain DTI probabilistic tractography mapping has been supported by Thai Government Fund (Development of Brain Mapping Project).

REFERENCES

- Assaf, Y., and Pasternak, O. (2008). Diffusion tensor imaging (DTI)-based white matter mapping in brain research: A review. *J. Mol. Neurosci.* **34**:51–61.
- Awasthi, M., Parmar, H., Patankar, T., and Castillo, M. (2001). Imaging findings in rabies encephalitis. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **22**:677–680.
- Barker, P. (2009). *Clinical MR Spectroscopy*. Cambridge University Press, New York.
- Barker, P., and Lin, D. (2006). In vivo proton MR spectroscopy of the human brain. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **49**:99–128.
- Burton, E. C., Burns, D. K., Opatowsky, M. J., El-Feky, W. H., Fischbach, B., Melton, L., Sanchez, E., Randall, H., Watkins, D. L., Chang, J., and Klintmalm, G. (2005). Rabies encephalomyelitis: Clinical, neuroradiological, and pathological findings in 4 transplant recipients. *Arch. Neurol.* **62**:873–882.
- Chavhan, G. B., Babyn, P. S., Thomas, B., Shroff, M. M., and Haacke, E. M. (2009). Principles, techniques, and applications of T2-based MR imaging and its special applications. *Radiographics* **29**:1433–1449.
- de Backer, M. E., Nabuurs, R. J. A., van Buchem, M. A., and van der Weerd, L. (2010). MR-based molecular imaging of the brain: The next frontier. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **31**:1577–1583.
- Desai, R. V., Jain, V., Singh, P., Singhi, S., and Radotra, B. D. (2002). Radiculomyelitic rabies: Can MR imaging help? *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **23**:632–634.
- Dirk, W., Norbert, S., Gerald, B. M., Brian, J. S., Antao, T. D., Andrew, A. M., and Michael, W. W. (2001). Short echo time multislice proton magnetic resonance spectroscopic imaging in human brain: Metabolite distributions and reliability. *Magn. Reson. Imaging* **19**:1073–1080.
- Gillard, J. W. A. B. P. (2009). *Clinical MR Neuroimaging*. Cambridge University Press, New York.
- Goldman, L. W. (2007). Principles of CT and CT technology. *J. Nucl. Med. Technol.* **35**:115–128.
- Haacke, E. M., Mittal, S., Wu, Z., Neelavalli, J., and Cheng, Y.-C. N. (2009). Susceptibility-weighted imaging: Technical aspects and clinical applications. Part 1. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **30**:19–30.
- Hagmann, P., Jonasson, L., Maeder, P., Thiran, J.-P., Wedeen, V. J., and Meuli, R. (2006). Understanding diffusion MR imaging techniques: From scalar diffusion-weighted imaging to diffusion tensor imaging and beyond. *Radiographics* **26**(Suppl. 1):S205–S223.
- Hemachudha, T., and Phuapradit, P. (1997). Rabies. *Curr. Opin. Neurol.* **10**:260–267.
- Hemachudha, T., and Wilde, H. (2009). Rabies. In *Physicians' Information and Educational Resource (PIER) Online*. (D. R., Goldmann, ed.), American College of Physicians, USA.
- Hemachudha, T., Laothamatas, J., and Rupprecht, C. E. (2002). Human rabies: A disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Neurol.* **1**:101–109.

- Hemachudha, T., Sunsaneewitayakul, B., Mitrabhakdi, E., Suankratay, C., Laothamatas, J., Wacharapluesadee, S., Khawplod, P., and Wilde, H. (2003). Paralytic complications following intravenous rabies immune globulin treatment in a patient with furious rabies. *Int. J. Infect. Dis.* **7**:76–77.
- Hemachudha, T., Wacharapluesadee, S., Mitrabhakdi, E., Wilde, H., Morimoto, K., and Lewis, R. (2005). Pathophysiology of human paralytic rabies. *J. Neurovirol.* **11**:93–100.
- Hoehn, M., Himmelreich, U., Kruttwig, K., and Wiedermann, D. (2008). Molecular and cellular MR imaging: Potentials and challenges for neurological applications. *J. Magn. Reson. Imaging* **27**:941–954.
- Jacobs, M. A., Ibrahim, T. S., and Ouwerkerk, R. (2007). MR imaging: Brief overview and emerging applications. *Radiographics* **27**:1213–1229.
- Jansen, J. F. A., Backes, W. H., Nicolay, K., and Kooi, M. E. (2006). ¹H MR spectroscopy of the brain: Absolute quantification of metabolites. *Radiology* **240**:318–332.
- Johnson, T., and Nath, A. (2009). Neurological complications of immune reconstitution in HIV-infected populations. In “Neurology in the Year 2010” (R. T. Johnson, ed.), Vol. 1184, pp. 106–120.
- Kalita, J., Misra, U. K., Pandey, S., and Dhole, T. N. (2003). A comparison of clinical and radiological findings in adults and children with Japanese encephalitis. *Arch. Neurol.* **60**:1760–1764.
- Kastrup, O., Wanke, I., and Maschke, M. (2005). Neuroimaging of infections. *NeuroRX* **2**:324–332.
- Kastrup, O., Wanke, I., and Maschke, M. (2008). Neuroimaging of infections of the central nervous system. *Semin. Neurol.* **28**(511):522.
- Kiroğlu, Y., Calli, C., Yuntun, N., Kitis, O., Kocaman, A., Karabulut, N., Isaev, H., and Yagci, B. (2006). Diffusion-weighted MR imaging of viral encephalitis. *Neuroradiology* **48**:875–880.
- Laothamatas, J., Hemachudha, T., Mitrabhakdi, E., Wannakrairot, P., and Tulayadaechanont, S. (2003). MR imaging in human rabies. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **24**:1102–1109.
- Laothamatas, J., Wacharapluesadee, S., Lumlertdacha, B., Ampawong, S., Tepsumethanon, V., Shuangshoti, S., Phumesin, P., Asavaphatiboon, S., Worapruerkjaru, L., Avihingsanon, Y., Israsena, N., Lafon, M., *et al.* (2008). Furious and paralytic rabies of canine origin: Neuroimaging with virological and cytokine studies. *J. Neurovirol.* **14**:119–129.
- Lee, S.-K., Kim, D. I., Kim, J., Kim, D. J., Kim, H. D., Kim, D. S., and Mori, S. (2005). Diffusion-tensor MR imaging and fiber tractography: A new method of describing aberrant fiber connections in developmental CNS anomalies. *Radiographics* **25**:53–65.
- Long, C. M., and Bulte, J. W. (2009). In vivo tracking of cellular therapeutics using magnetic resonance imaging. *Expert Opin. Biol. Ther.* **9**:293–306.
- Mark, E. M. (2006). MR spectroscopy: Truly molecular imaging; past, present and future. *Neuroimaging Clin. N. Am.* **16**:605–618.
- Mitrabhakdi, E., Shuangshoti, S., Wannakrairot, P., Lewis, R., Susuki, K., Laothamatas, J., and Hemachudha, T. (2005). Difference in neuropathogenetic mechanisms in human furious and paralytic rabies. *J. Neurol. Sci.* **238**:3–10.
- Mittal, S., Wu, Z., Neelavalli, J., and Haacke, E. M. (2009). Susceptibility-weighted imaging: Technical aspects and clinical applications, part 2. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **30**:232–252.
- Nucifora, P. G. P., Verma, R., Lee, S.-K., and Melhem, E. R. (2007). Diffusion-tensor MR imaging and tractography: Exploring brain microstructure and connectivity. *Radiology* **245**:367–384.
- Pleasure, S. J., and Fischbein, N. J. (2000). Correlation of clinical and neuroimaging findings in a case of rabies encephalitis. *Arch. Neurol.* **57**:1765–1769.

- Poustchi-Amin, M., Mirowitz, S. A., Brown, J. J., McKinstry, R. C., and Li, T. (2001). Principles and applications of echo-planar imaging: A review for the general radiologist. *Radiographics* **21**:767–779.
- Prakash, M., Kumar, S., and Gupta, R. K. (2004). Diffusion-weighted MR imaging in Japanese encephalitis. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **28**:756–761.
- Rauscher, A., Sedlacik, J., Barth, M., Mentzel, H.-J., and Reichenbach, J. R. (2005). Magnetic susceptibility-weighted MR phase imaging of the human brain. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **26**:736–742.
- Sheikh, K. A., Ramos-Alvarez, M., Jackson, A. C., Li, C. Y., Asbury, A. K., and Griffin, J. W. (2005). Overlap of pathology in paralytic rabies and axonal Guillain-Barré syndrome. *Ann. Neurol.* **57**:768–772.
- Simonson, T. M., Magnotta, V. A., Ehrhardt, J. C., Crosby, D. L., Fisher, D. J., and Yuh, W. T. (1996). Echo-planar FLAIR imaging in evaluation of intracranial lesions. *Radiographics* **16**:575–584.
- Thomas, L. C., Pia, C. S., and Brian, D. R. (2006). Diffusion imaging: Insight to cell status and cytoarchitecture. *Neuroimaging Clin. N. Am.* **16**:619–632.
- Tong, K. A., Ashwal, S., Obenaus, A., Nickerson, J. P., Kido, D., and Haacke, E. M. (2008). Susceptibility-weighted MR imaging: A review of clinical applications in children. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **29**:9–17.
- van Thiel, P. (2009). Fatal human rabies due to Duvenhage virus from a bat in Kenya: Failure of treatment with coma-induction, ketamine, and antiviral drugs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**: e428.
- Willoughby, R. E., Roy-Burman, A., Martin, K. W., Christensen, J. C., Westenkirschner, D. F., Fleck, J. D., Glaser, C., Hyland, K., and Rupprecht, C. E. (2008). Generalised cranial artery spasm in human rabies. *Dev. Biol. (Basel)* **131**:367–375.
- Yael, R., and Robert, E. L. (2007). Recent advances in magnetic resonance neurospectroscopy. *Neurotherapeutics* **4**:330–345.