



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

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

โดย ศาสตราจารย์ นายแพทย์ธีระวัฒน์ เหมะจุธา
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 วัชรพฤษชาติ	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” กับการเคลื่อนและการกระจายตัวของ 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 และไขสันหลังของสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอาการดุร้ายและแบบอัมพาต.....	23
โครงการที่ 4 การตรวจไวรัสโรคพิษสุนัขบ้าจากสิ่งส่งตรวจนอกสมองในสุนัขที่เสียชีวิตด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา.....	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 ทักษะ ทางคลินิก การสำรวจตัวอย่าง การตั้งสมมุติฐาน และการใช้เทคโนโลยีในการวิเคราะห์สาเหตุความ ผิดปกติทางสมอง (“คลุ้มคลั่ง” ในโรคพิษสุนัขบ้า) และความผิดปกติทางระบบประสาทในรูปชา อ่อน แรงแรง ความผิดปกติทางระบบหัวใจ (จากผลของโลกร้อนสู่ปลาพิษ ciguatoxin)

อาการ “คลุ้มคลั่ง” (โครงการ 1) แม้จะไม่บรรจุเป้าประสงค์เดิมในการอธิบายตำแหน่งของ สมองโดยการติดตามตัวไวรัสที่มี Ferritin gene ติดอยู่ในร่างกายของสุนัขบ้า เนื่องจากไวรัสต้นแบบที่ มีไม่สามารถ “วิ่ง” ได้จากตำแหน่งที่ฉีดที่กล้ามเนื้อเข้าไปในสมอง กระบวนการหาไวรัสต้นแบบกลับ พบปรากฏการณ์พิเศษที่เมื่อนำไวรัสจากสมองสุนัขบ้า ผ่านเข้าไปในเซลล์ที่ไม่ใช่สมอง (Baby Hamster Kidney-BHK) ไวรัสจะมี phenotype และ genotype เปลี่ยนไปคือก่อโรคได้ทั้งการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและเข้า สมอง (โดยที่ไวรัสดั้งเดิมก่อโรคจากการฉีดเข้าสมองอย่างเดียว) และมีความรุนแรงเพิ่มขึ้น (LD50 ลดลง) โดยมี mutation ที่หลายตำแหน่งของ genes แต่ตำแหน่งที่ควรอธิบายลักษณะได้ดีที่สุดน่าจะ เป็นที่ 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) ศึกษาการกระจายตัวของโปรตีนของไวรัส และเซลล์อักเสบในระบบประสาทของสุนัขที่มีและไม่มีอาการคลุ้มคลั่ง และยืนยัน ก้านสมองเป็น เสมือน “ประตู” กันให้ไวรัสวิ่งสู่สมองช้าลง โดยพบการอักเสบเฉพาะที่ก้านสมองในสุนัขไม่คลุ้มคลั่ง ซึ่งตรงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของผู้วิจัยในการทำแผนที่สมองสุนัขบ้า (Adv Viral Res 2011) ที่มี สายใยประสาทผิดปกติที่ก้านสมองและเป็นสาเหตุให้ไวรัสในสมองสุนัขชนิดคลุ้มคลั่งมีจำนวนมากกว่า สุนัขชนิดไม่คลุ้มคลั่ง อย่างไรก็ตามในส่วนส่วนของเซลล์ประสาทยับยั้ง (โครงการ2) ที่ว่าควรจะมีจำนวน ต่างกันใน 2 กลุ่มอาการ พบว่าไม่เป็นไปตามสมมุติฐาน แสดงว่าควรมีกลไกซับซ้อนร่วมกันของระบบ ประสาทมากกว่าเซลล์ยับยั้งเดี่ยวๆ โปรตีนในสมองและไซสตันหลังของสุนัขบ้าอาการต่างๆกันและสุนัข ปกติในระยะเริ่มแรก (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 โดยไม่ใช้สมองซึ่งมีผลกระทบจากอากาศร้อนทำให้สมองอยู่ใน สภาพที่ไม่เหมาะสม (โครงการ 4) พบว่าสามารถใช้ทำลาย หนอง และขนของสุนัขบ้าที่ตายแล้วในการ วิเคราะห์ได้ โดยแม้ไม่ให้ผลความไว 100% (อยู่ระหว่าง 80-85%) การตรวจตัวอย่างดังกล่าว ซึ่ง จัดเก็บได้ง่ายกว่าการตัดหัว เปิดกระโหลก เป็นตัวเลือกที่ดีในการประเมินสถานการณ์ทางระบาด วิทยาได้ และยังพิสูจน์ว่าวิธีการ Nested PCR ต่อ Polymerase Gene มีความไวพอกับ Real-time PCR ต่อ Nucleocapsid gene ซึ่งวิธีการแรกเป็นของคณะวิจัยจากสถาบันปาสเตอร์และวิธีหลังเป็น ของผู้วิจัยเอง

โครงการสุดท้าย (5) เกี่ยวกับพิษจากปลา Ciguatoxin ซึ่งส่งผลร้ายต่อระบบประสาท กล้ามเนื้อ และระบบอัตโนมัติ ผู้วิจัยได้พบและทำการรักษาผู้ป่วย 2 รายที่ รพ.จุฬาลงกรณ์ และ พบ ผู้ป่วยอีก 4 รายจากการสืบค้นโดยมีประวัติครบถ้วนที่ รพ.ภูเก็ต ทั้ง 6 รายมีลักษณะเฉพาะที่ควร

นำมาใช้แยกจากพิษชนิดอื่นๆทั้งจากปลาปักเป้า และหน่อไม้พิษ (botulism) และผู้วิจัยสำรวจปลาและเนื้อปลาแล่ จากตลาดพบ 2 จาก 227 ตัวอย่างให้ผลกำกวม (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 และไม่ต้องแฉะกระโหลกเพื่อเอาสมองมาตรวจ 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 วิโรจนากิริมย์

นักศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาชีวเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาและอธิบายกลไกในการเกิดอาการ “คลุ้มคลั่ง” ในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า โดยใช้ ferritin-modified rabies virus

การดำเนินงาน

โครงการนี้เป็นการศึกษาการเกิดอาการของโรคพิษสุนัขบ้าโดยใช้ ferritin-modified virus ในการติดตามตัวว่าเชื้อไวรัสได้ไปอยู่ที่ส่วนไหนของระบบประสาทในขณะที่เกิดอาการ จากแผนการดำเนินงานเดิมที่จะใช้ full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า HEP-Flury strain เป็น recombinant virus(rHEP-GFP) ในการศึกษาการเกิดอาการคลุ้มคลั่งในสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าเนื่องจากเรามี 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 ในการดำเนินงานวิจัยนี้

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

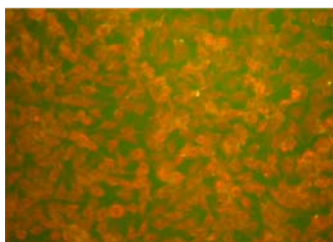
อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อนำเชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้ไปตรวจสอบคุณสมบัติในสัตว์ทดลอง พบว่าเชื้อไวรัสสายพันธุ์นี้แสดง neuropathogenesis ได้ดีเมื่อนำเชื้อไวรัสทาง intracerebral แต่แสดง neuroinvasiveness ไม่ดีนักเมื่อนำเชื้อไวรัสทาง intramuscular ซึ่งยังอาจไม่เหมาะสมในการมาทำ recombinant ไวรัสที่จะมาทำการศึกษา

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

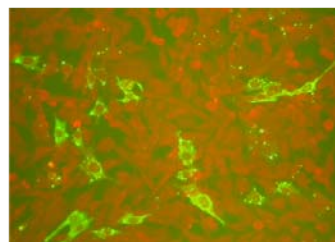
จากประสบการณ์การทำไวรัส isolation และ propagation ในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยเฉพาะ Baby Hamster Kidney Cells (BHK-21 cells) ซึ่งเป็น non-neuronal cells พบว่า street virus จะมี infectivity ต่ำและมี growth rate ที่ช้ามากเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพิ่มจำนวนในสัตว์ทดลองโดยการฉีดเข้าทาง intracerebral เช่น การนำ 20% 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% เมื่อนำเชื้อไวรัสทาง 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

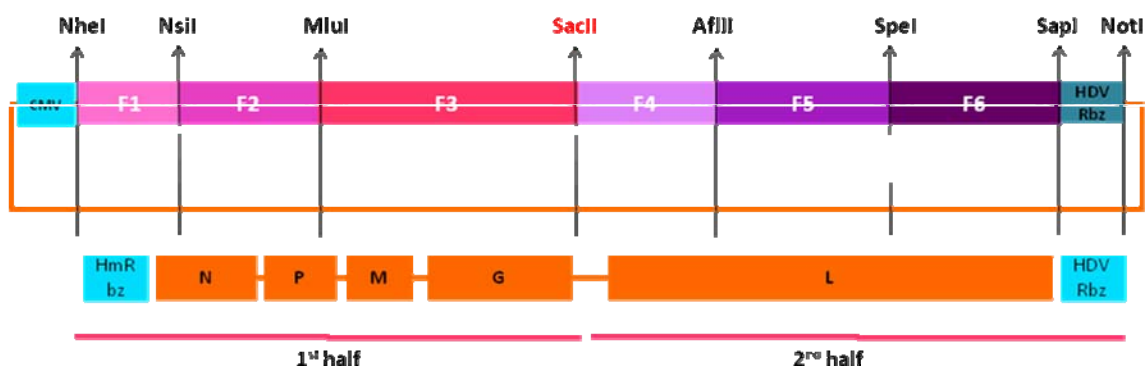
1. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05 strain ที่มีและไม่มี ferritin heavy chain แทนที่ pseudogene region
2. ทำการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า QS-05-BHK-P7 strain ที่มีและไม่มี ferritin heavy chain แทนที่ pseudogene region

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 วิโรจนภิรมย์เดินทางไปทำการทดลองเป็นระยะเวลา 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

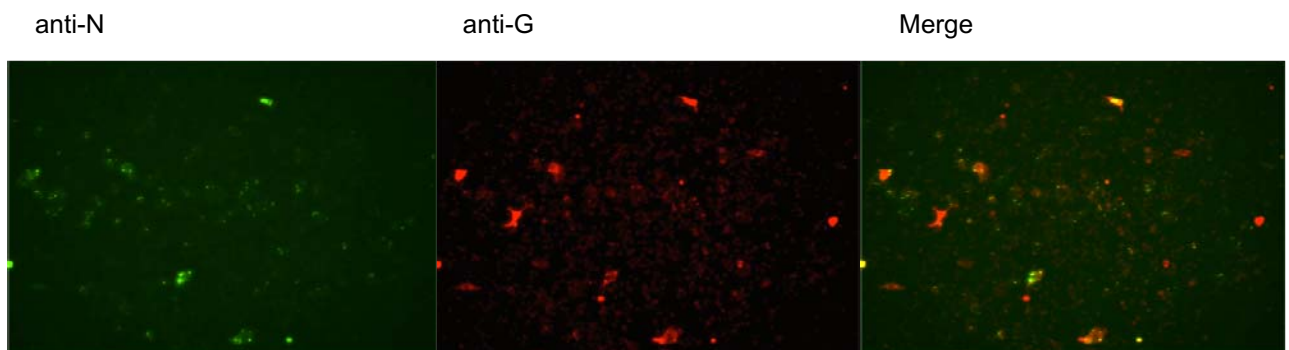
2. ทำการ recovery recombinant virus ใน baby hamster kidney (BHK-21) cells ที่ stably expressing T7 RNA polymerase
 - a. ทำการ recovery recombinant QS05 จาก pCI-QS05 plasmid โดยใช้ helper plasmids 3 genes ภายใต้ T7 promoter คือ Nucleoprotein, Phosphoprotein และ RNA-dependent RNA polymerase (สร้างมาจากเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า 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

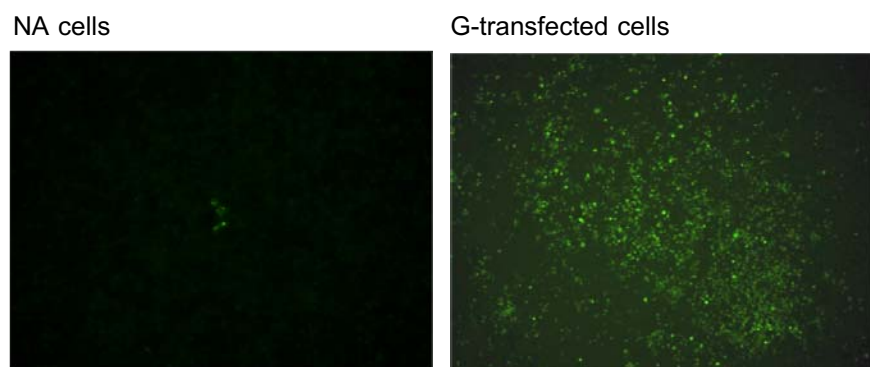
- i. ย้อม transfected cells ด้วย FITC-anti-N และ anti-G



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

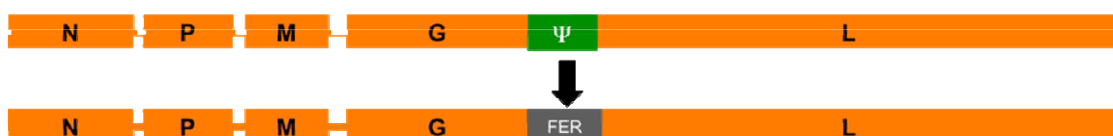
T -- T

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))

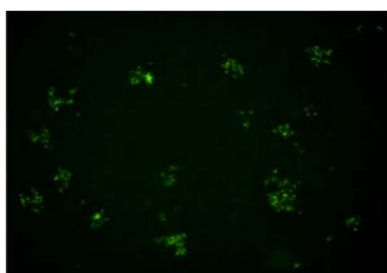
- สามารถสร้าง pCI-P7(M-G/Asel) ได้เป็นผลสำเร็จ

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))

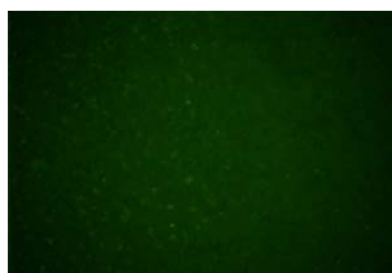
- สามารถสร้าง pCI-P7/hFER(M-G/Asel) ได้เป็นผลสำเร็จ

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



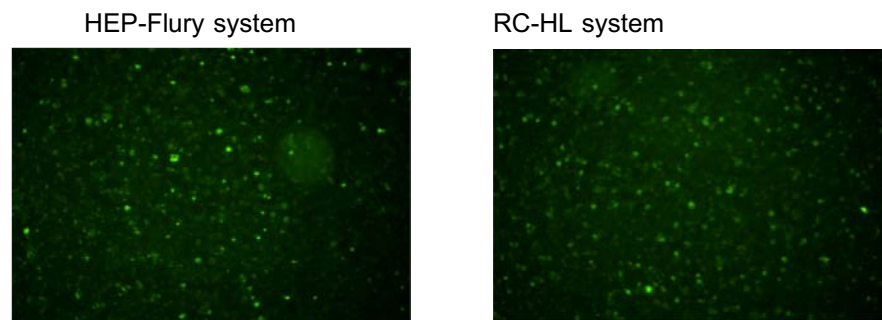
mock control

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

พบว่าการติดสีของ nucleoprotein และมีการเกิด foci ขึ้นซึ่งแสดงถึงการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไปยังเซลล์ข้างเคียงได้

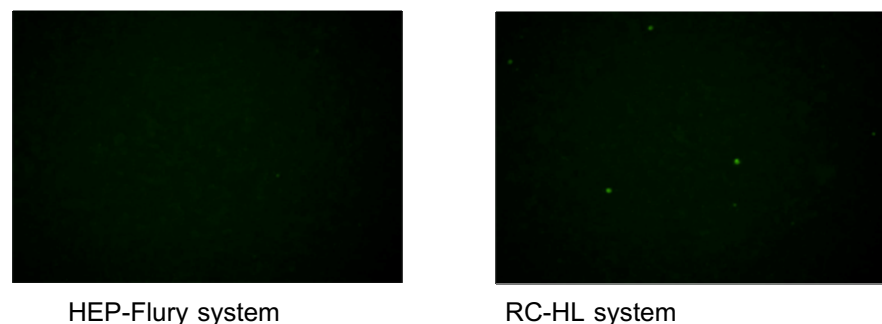
จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า full-length cDNA clone ที่ได้นั้นสามารถนำมาใช้ในการ recovery virus ได้ แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องใช้ T7 promoter และ BHK/T7-9 cells ในการ recovery ซึ่งระบบนี้จะไม่สามารถนำกลับมาใช้ต่อในประเทศไทยได้เนื่องจากปัญหาเรื่อง material transfer จึงได้พยายามทำการ recovery ภายใต้ CMV promoter 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) ซึ่งภายหลังจากทราบที่เกิดจาก 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) สมอและไซสหลังของสุนัขที่ไม่เป็นโรคพิษสุนัขบ้า (N) (n = 6)

วิธีเก็บตัวอย่าง

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

การทดลองทางห้องปฏิบัติการ

1. การสกัดแยกโปรตีนจากตัวอย่างที่เป็นสมอ ก้านสมอ และไซสหลังของสุนัขที่ไม่ได้ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้า 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

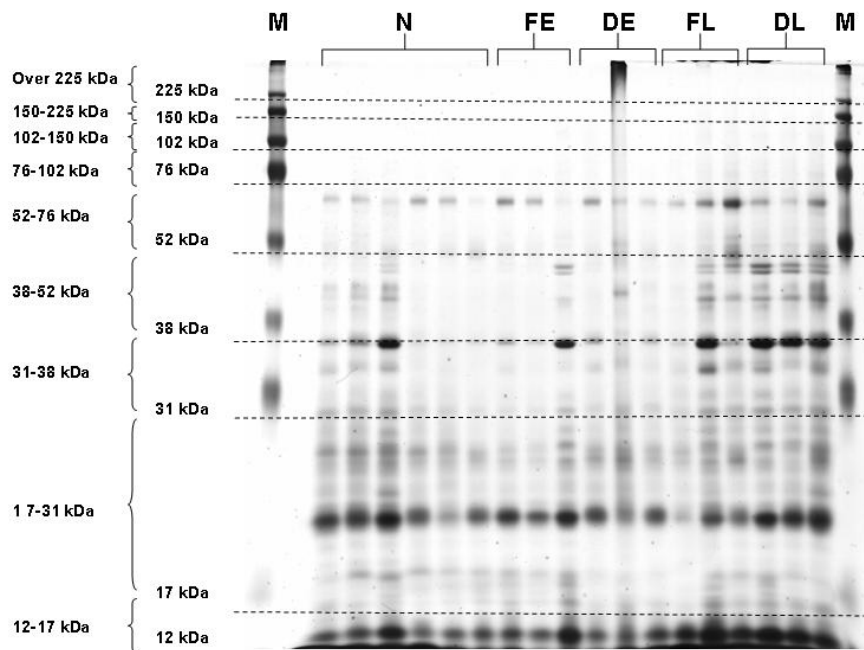
Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) เป็นเทคนิคการแยกสารและตรวจวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณสำหรับตัวอย่างที่เป็นของเหลว

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

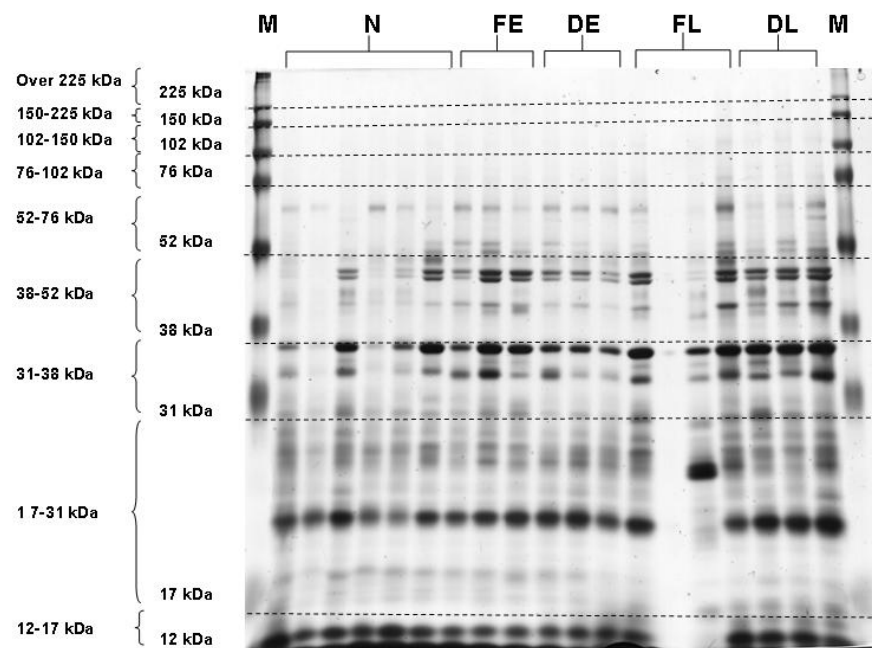
4) วิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT

ผลที่ได้รับ

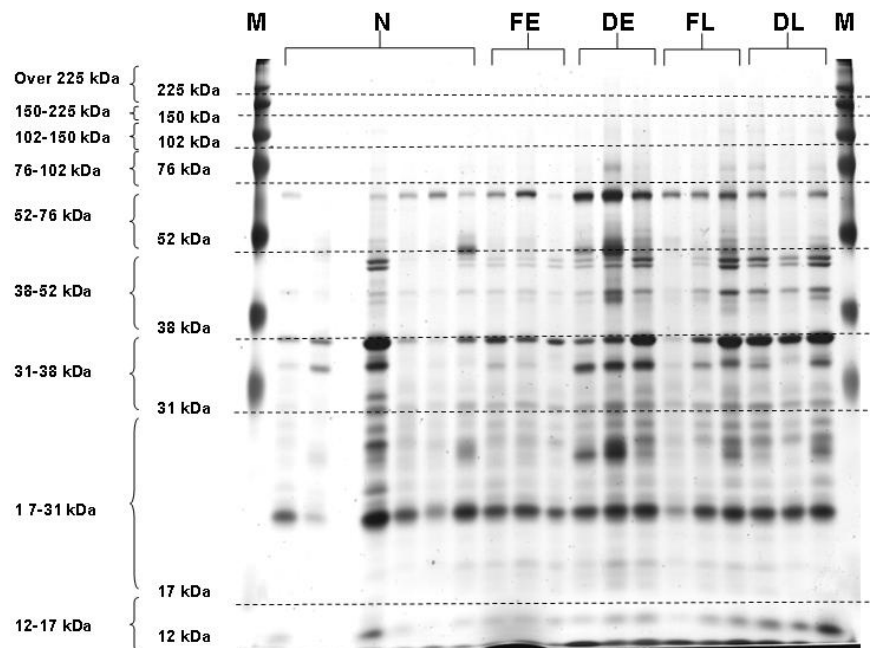
1. ผลการวิเคราะห์การแยกโปรตีนจากตัวอย่างด้วยวิธี SDS-PAGE ดังรูปที่ 1-4 พบว่าสามารถพัฒนาเทคนิคในขั้นการแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลได้โปรตีนในแผ่นเจลที่ย้อมด้วยเทคนิค silver staining และสามารถตัดก้อนเจลตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล เพื่อย่อยโปรตีนในก้อนเจลด้วยเอนไซม์ทริปซิน ให้ได้โปรตีนเพื่อนำมาศึกษาวิเคราะห์เปปไทด์ด้วย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



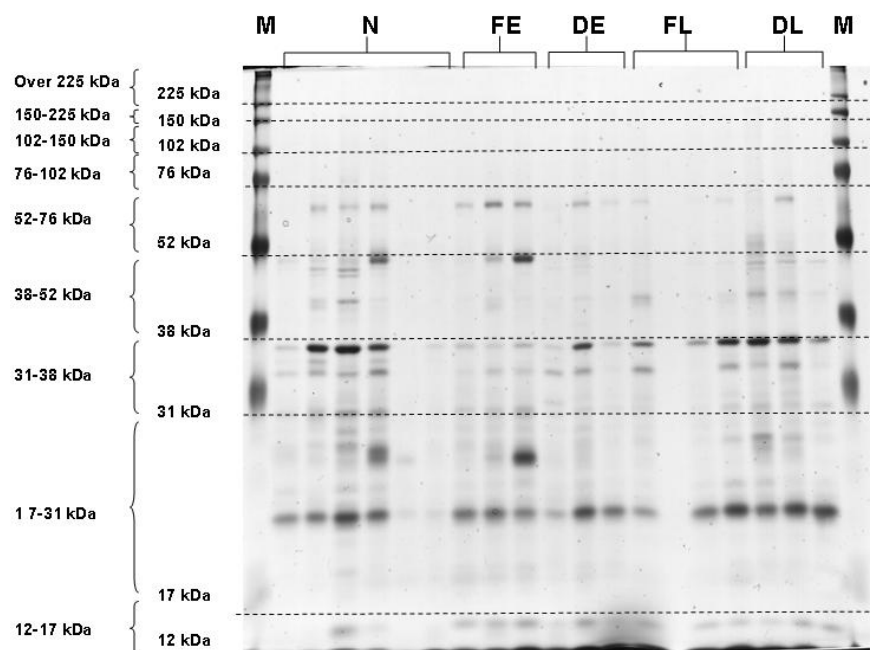
รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างเจลที่แยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในตัวอย่างสมองส่วน Hippocampus



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

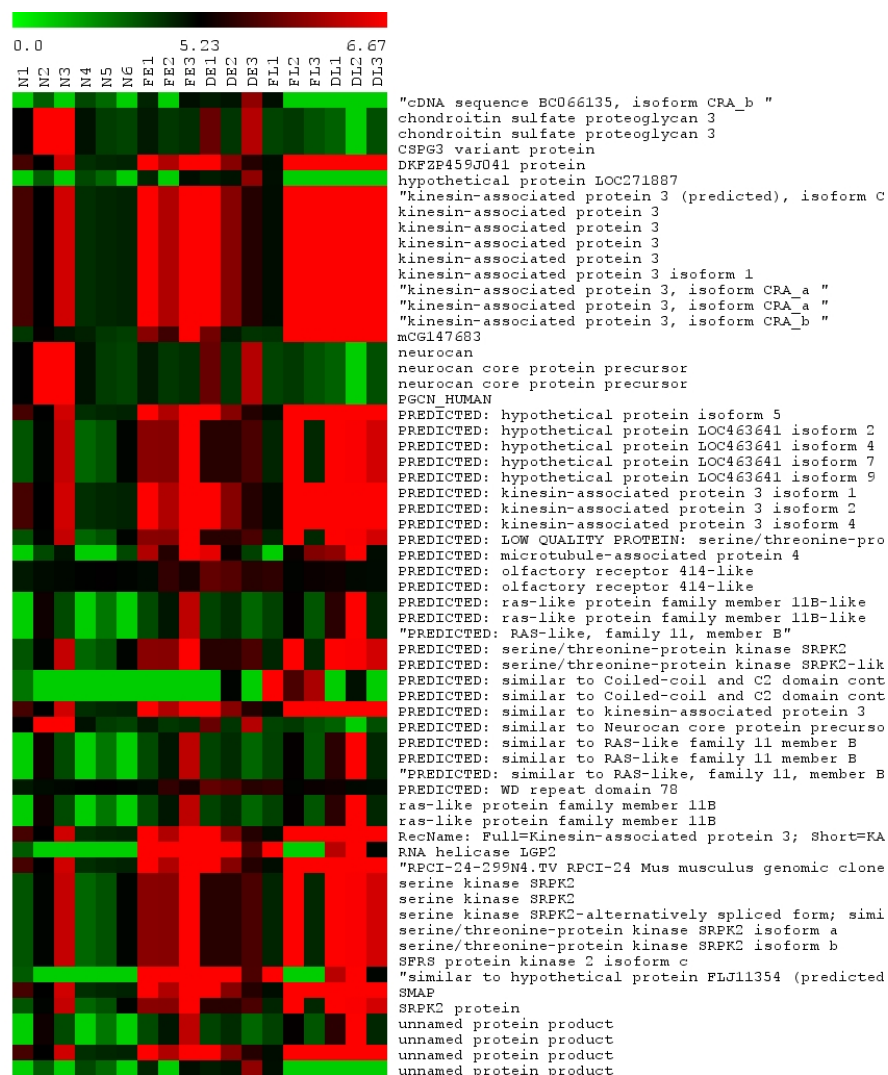
DL = กลุ่มสุนัขที่เป็นโรคพิษสุนัขบ้าแบบอัมพาตที่เสียชีวิตช้า

(0 หมายถึง ไม่มีค่า intensity)

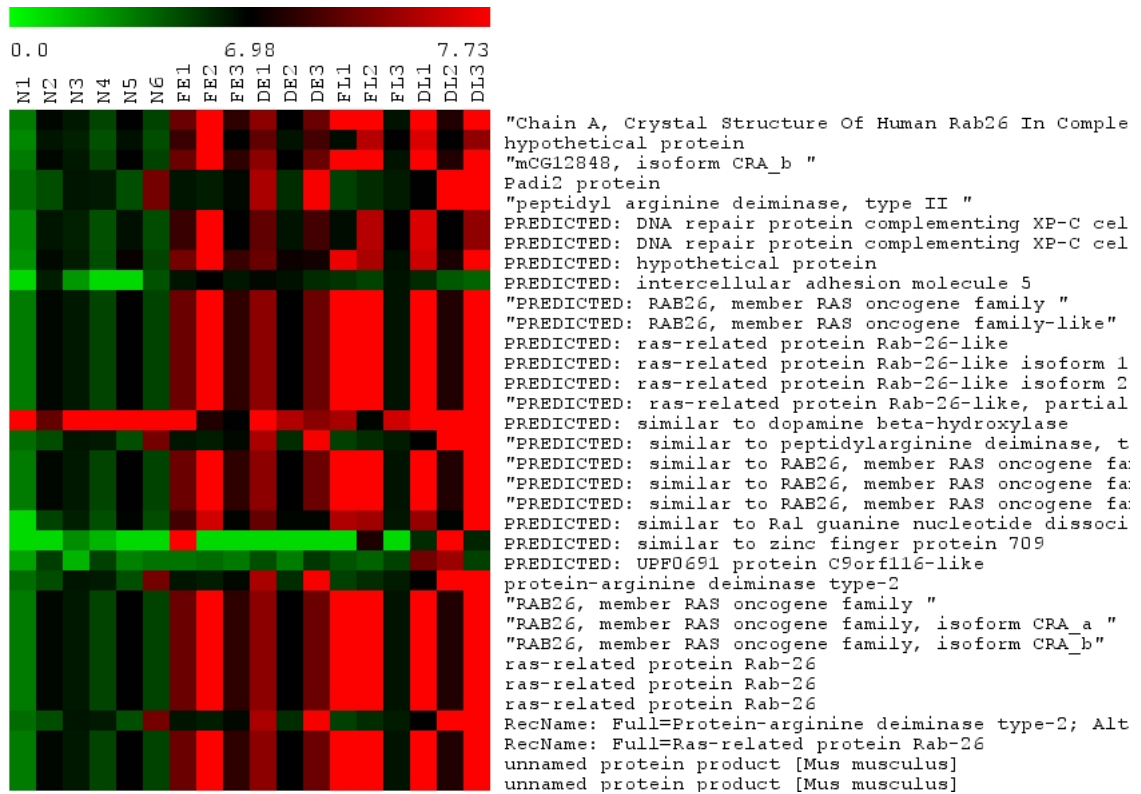
(↑ หมายถึง มีค่า intensity ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ 0)

(↑↑ หมายถึง มีค่า intensity ที่เพิ่มขึ้นมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ 0)

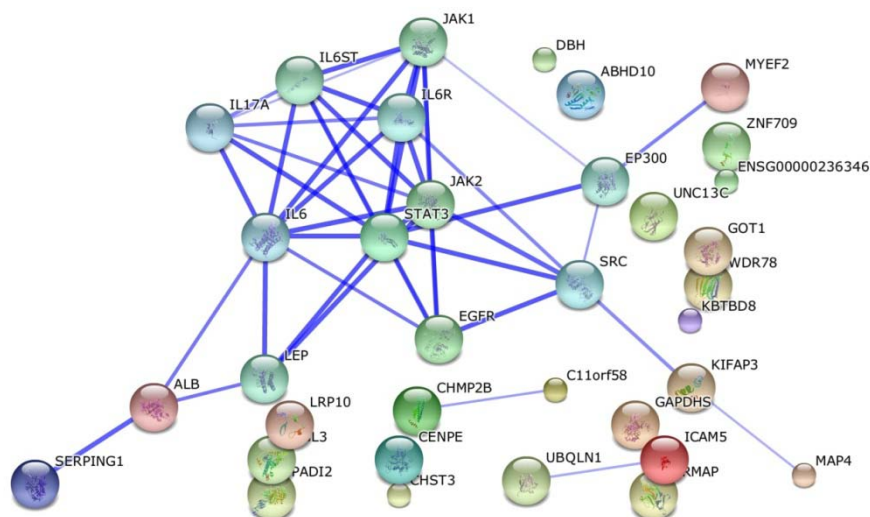
2. ผลการวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนที่มีการแสดงออกของสมองส่วน Hippocampus, Parietal, Brainstem และไขสันหลัง ของสุนัขที่ไม่ได้ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้า สุนัขที่ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้าทั้งในแบบดุร้ายและแบบอัมพาต จากโปรแกรม MeV ดังรูปที่ 5-8 พบว่าสามารถพัฒนาเทคนิคในขั้นการวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนได้



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



รูปที่ 8 แสดงผลการเปรียบเทียบ การแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของไซสโนลหลัง 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

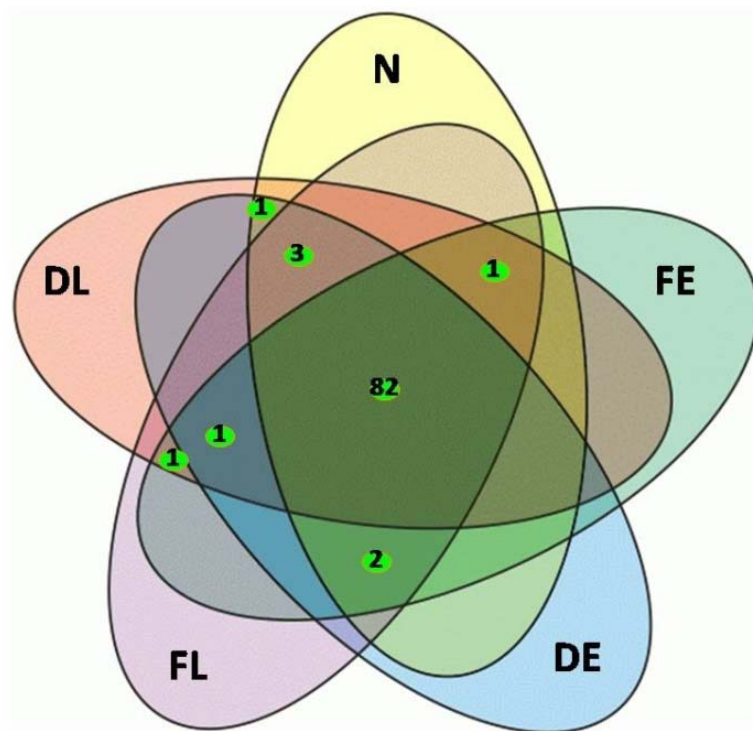
dopamine beta-hydroxylase (dopamine beta-monooxygenase) (617 aa)

■ 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 เปรียบเทียบกับสุนัขที่ไม่ได้ติดเชื้อโรคพิษสุนัขบ้า

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 น่าจะมีการทำงานของการตอบสนองภูมิคุ้มกันที่มากขึ้น 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 มีโปรตีนชนิดใดที่ต่างกับสมองใหญ่ 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 วัชรพฤษชาติ
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 ที่ได้ศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ ช่วยยืนยันว่าเทคนิค 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 สิ้นฐานาวา
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 รุ่มาตาหดหรือขยายอย่างผิดปกติ 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 พุกษรภัทรานนท์ 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 และหนีสกัดการตรวจพบของเซลล์อักเสบที่ก้านสมอง 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 ช่วงโชติ**. 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, Lochareonkul 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”, จันทรฉาย คุมพล (บรรณาธิการ), ใน การเปลี่ยนแปลงภาวะอากาศ ความอยู่รอดของมวลมนุษย์. หน้า 103-109.กรุงเทพมหานคร: ปาเจรา, 2551.
 34. จิรพล สินธุนาวา. การเปลี่ยนแปลงภาวะอากาศ ความอยู่รอดของมวลมนุษย์ แปลจาก The Alas of Climate Change. จันทรฉาย 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 ขาญณรงค์ (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 หัวใจคุณทำอะไร (ตอนที่ 1)

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันอังคาร ที่ 28 ตุลาคม 2551

- บทความเรื่อง หัวใจคุณทำอะไร (ตอนที่ 2) กำเนิดอาหารธุรกิจ (อำมหิต)

หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 10 พฤศจิกายน 2551

- บทความเรื่อง หัวใจคุณทำอะไร (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 ไขพัฒนาการเชื่อ ใช้วัดหมู 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 2009อะไรจะมาอีกใน 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 เคยแล้วยังตายอีกต่างหาก

หนังสือพิมพ์มติชนรายวัน วันอาทิตย์ ที่ 11 ก.ค.2553

- บทความเรื่อง เขี่ยขอรัฐ : 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' สู่นุญร่วมมือ WHO 'ไวรัสสัตว์สู่คน'

หนังสือพิมพ์ กรุงเทพธุรกิจ วันจันทร์ ที่ 27 ก.ย.2553

- บทความเรื่อง กลูโคซามีนไม่บำรุงข้อเข่า แปะก๊วยไม่ป้องกันสมองเสื่อม

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 คำหาว่าชั้นเป็นบ้า

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

- ที่นี้ประเทศไทย....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" ดันต่อสารพัดโรคติดเชื้ออุบัติใหม่

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 ชัน

บทความในวารสาร

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

โดย ดร.สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี

- ข่าวเรื่อง วิจัยโรคสมองอักเสบติดจากไวรัสสุนัขบ้า ค้างคาว หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ ฉบับวันที่ 11 มกราคม 2553
- ข่าว เรื่อง เตือนสมองอักเสบจากค้างคาวแม่ไก่ หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ ฉบับวันที่ 9 ธันวาคม 2552
- บทความเรื่อง ความเข้าใจผิดเกี่ยวกับโรคพิษสุนัขบ้า โดยธีระวัฒน์ เหมะจุฑา และ สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี วารสาร สรรพสารDNA เมษายน 2553 หน้า32
- ร่วมสนทนาในประเด็น “โรคพิษสุนัขบ้า” วัน 24 มีนาคม 2552 ในรายการ Goodlife ออกอากาศสด ทางสถานีโทรทัศน์ 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	การสัมมนาในรูปแบบการบรรยายการวิชาการ / 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	การสัมมนาในรูปแบบการบรรยายการวิชาการ / 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 แก่อสาสมัครสาธารณสุขหมู่บ้าน 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 คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาฯ
10 ก.ย.51	วิทยากรการประชุมกลุ่มย่อยในหัวข้อ เรื่อง " การ หลอม รวมของวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับ ผลกระทบ ทางจริยธรรม กฎหมายและสังคม : การ มองไปข้างหน้าเพื่อเตรียมโครงสร้างพื้นฐานทาง กฎหมายรองรับ " 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) เนื่องใน วัน " ปิยมหาราชาล้ำลึก" 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 พค.2551 ณ ห้องภาณุรังษี บอลรูม รร.รอยัลริเวอร์	สมาคมไวรัสวิทยา (ประเทศ ไทย)
9 ม.ค.52	วิทยากรในงานประชุมเสวนาทางวิชาการเพื่อเผยแพร่ ความรู้ เรื่อง Ebola-Reston Virus บรรยายในหัวข้อ " ความเป็นไปได้ของการพบเชื้อ อีโบล่า ในประเทศไทย และแนวทางการเฝ้าระวัง	ฝ่ายวิชาการและศูนย์วิจัยโรค อุบัติใหม่ อุบัติซ้ำในสัตว์ คณะ สัตวแพทยศาสตร์ 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 " สภาวะปัญหาการป้องกันควบคุมโรคพิษสุนัขบ้าในสัตว์และในคน 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 ศูนย์การประชุมรณนี้แจ่มจรัส 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 พญา 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.แอมบาสซาดอร์ 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 ใน ภาวะวิกฤตโลกร้อน" ในงานประชุมวิชาการ เทคโนโลยี และความปลอดภัยด้านอาหารและน้ำ ครั้งที่ 3/2553เรื่อง ก้าวทันสถานการณ์..ก้าวทัน เทคโนโลยีด้านสุขาภิบาลอาหารและน้ำ	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	สำนักกีฬาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 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	การประยุกต์ใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ สำหรับงานวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ การแพทย์	คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
23 กุมภาพันธ์ 2553	Protein bioinformatics	ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
24 กุมภาพันธ์ 2553	Protein bioinformatics	ภาควิชาโภชนศาสตร์เขตร้อนและ วิทยาศาสตร์อาหาร คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล
27 กุมภาพันธ์ 2553	Proteomics in Biomedical Research	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
28 กุมภาพันธ์ 2553	Protein Bioinformatics	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ชีว การแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
4 มีนาคม 2553	Proteomics and its application	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
31 มีนาคม 2553	การประยุกต์ใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ สำหรับงานวิจัยด้านโปรตีน	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
17 พฤษภาคม 2553	การศึกษาวิเคราะห์และประยุกต์ใช้ เทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์ในงานวิจัยกึ่ง อุตสาหกรรม	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ แห่งชาติ
15 มิถุนายน 2553	การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์ กับงานวิจัยด้านการแพทย์	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	การประยุกต์ใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ สำหรับงานวิจัยด้านโภชนาการ	สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล
11 สิงหาคม 2553	การประยุกต์ใช้ MS ในงานวิจัยด้าน การแพทย์	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 : การจัดองค์การภายใต้สำนักบริหารสิ่งแวดล้อม
17 มี.ค. 2552	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น / โอกาสและบทบาทของนักเทคนิคการแพทย์ และกายภาพบำบัดในยุคแห่งการเปลี่ยนแปลง
19 มี.ค. 2552	คณะรัฐศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย / คุณภาพชีวิต สิ่งแวดล้อม จริยธรรม
21 มี.ค. 2552	สำนักงานพัฒนาข้าราชการพลเรือน (ก.พ.) / กฎหมายเกี่ยวกับทรัพยากรธรรมชาติและ การบริหารจัดการสิ่งแวดล้อม
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, MPPH) 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 พิณ 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.อกนิษฐ์ 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).

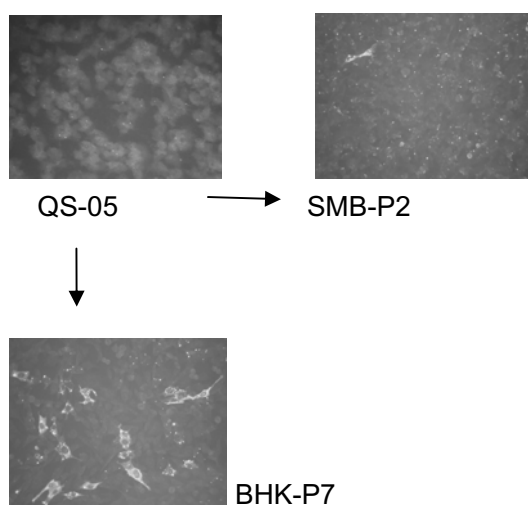
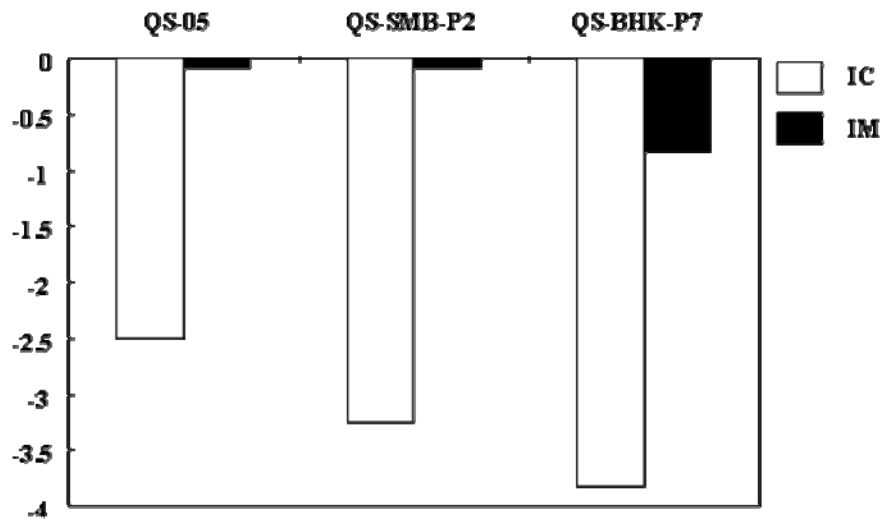


Figure 1 morphological difference under microscopy

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 quaspecies 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.; Worapruerkjaru, 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	0.0004	NS	0.0014	0.0010		
Cytochrome P450 2B12 (CYP11B12)	gi 62639273	192	0.1120 ± 0.0081	0.0798 ± 0.0014	0.0008	0.0111	NS	0.0007		
Cytokeratin type II	gi 73996498	255	0.0253 ± 0.0055	0.0357 ± 0.0022	0.0480	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	0.0126	NS	NS	0.0095		
FBXW10 protein	gi 20306882	736	0.2409 ± 0.0428	0.2500 ± 0.0288	0.0182	NS	0.0406	0.0271		
Guanine deaminase	gi 73946803	1267	0.0424 ± 0.0139	0.0456 ± 0.0102	0.0009	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	0.0018	NS	0.0141	0.0019		
Interferon alpha 4	gi 18767673	107	0.1034 ± 0.0076	0.1106 ± 0.0066	0.0078	NS	0.0092	0.0313		
Keratin 1	gi 160961491	264	0.0330 ± 0.0027	0.0358 ± 0.0050	0.0004	NS	0.0007	0.0016		
Peroxisome 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	0.0073	NS	0.0084	0.0311		
Protein C9orf55 isoform 1	gi 73971036	106	0.0696 ± 0.0106	0.0623 ± 0.0055	0.0395	NS	NS	0.0410		
Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor (Pyruvic carboxylase) (PCB) isoform 1	gi 73982897	95	0.0881 ± 0.0107	0.0907 ± 0.0041	0.0225	NS	0.0456	0.0346		
SARM1 protein	gi 114325428	1359	0.0231 ± 0.0118	0.0180 ± 0.0030	0.0440	NS	0.0308	0.0204		
Brainstem										
Actin-related protein 2 isoform 4	gi 73969820	490	0.1348 ± 0.0067	0.1785 ± 0.0249	0.0250	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	0.0078	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	0.0008	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	0.0001	0.0066	NS	0.0001		
Centrosomal protein 63kDa isoform 2	gi 194221623	754	0.1721 ± 0.0061	0.3377 ± 0.0335	0.0007	0.0006	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	0.0160	0.0363	NS	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	0.0076	0.0115	NS	0.0209		
Cytosolic purine 5-nucleotidase (5-nucleotidase cytosolic II) isoform 8	gi 73998435	993	0.3931 ± 0.0260	0.6284 ± 0.0636	0.0041	0.0063	NS	0.0128		
GDP dissociation inhibitor 2	gi 50978926	429	0.1042 ± 0.0063	0.0839 ± 0.0096	0.0011	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	0.0186	0.0452	NS	0.0257		
GTP-binding protein alpha o	gi 8394152	550	0.1927 ± 0.0220	0.3018 ± 0.0375	0.0104	0.0164	NS	0.0248		

Immunoglobulin heavy chain variable region	gi111270066	1023	0.2323 ± 0.0192	0.4159 ± 0.0349	0.2525 ± 0.0302	0.0007	0.0012	NS	0.0031
Silent information regulator 2	gi173697550	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	gi173996547	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	gi173977917	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	gi157085977	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	gi157108097	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)	gi157108007	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	gi173968673	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	gi173955331	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	gi173964131	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	gi173964131	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	gi173958067	814	0.0935 ± 0.0197	0.1495 ± 0.0279	0.0139 ± 0.0139	0.0037	NS	NS	0.0028
Dihydropyrimidinase-like 2	gi140254595	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	gi157091277	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	gi173966974	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	gi173965500	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	gi173965500	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	gi173965502	445	0.0174 ± 0.0059	0.0371 ± 0.0069	0.0000 ± 0.0000	0.0017	NS	NS	0.0012
Glycogen phosphorylase, muscle form (Myophosphorylase)	gi1730556	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	gi150979166	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	gi150979116	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	gi148476968	159	0.0630 ± 0.0070	0.0087 ± 0.0048	0.0411 ± 0.0100	0.0007	0.0005	NS	0.0266
Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha isoform 2	gi173951310	651	0.1590 ± 0.0061	0.1092 ± 0.0059	0.2230 ± 0.0127	0.0000	0.0041	0.0005	0.0000
Keratin 1	gi160961491	698	0.1207 ± 0.0148	0.0849 ± 0.0108	0.1658 ± 0.0247	0.0222	NS	NS	0.0173
Keratin 10 isoform 2	gi114667513	1381	0.0176 ± 0.0176	0.0756 ± 0.0227	0.3540 ± 0.1066	0.0047	NS	0.0057	0.0205
Heat shock protein beta-1	gi150979116	874	0.3965 ± 0.0214	0.3070 ± 0.0141	0.6276 ± 0.0376	0.0000	NS	0.0001	0.0000
Myotubularin related protein 6	gi1194672062	811	0.1762 ± 0.0133	0.0835 ± 0.0066	0.1628 ± 0.0140	0.0001	0.0002	NS	0.0009
NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa precursor isoform 1	gi157110953	283	0.0410 ± 0.0095	0.0402 ± 0.0048	0.0000 ± 0.0000	0.0005	NS	0.0011	0.0013
N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein beta	gi162645998	735	0.0988 ± 0.0099	0.1470 ± 0.0457	0.0000 ± 0.0000	0.0155	NS	NS	0.0134

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
Peroxiredoxin 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
Serotransferrin 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