



การกระจายของไวรัสพิษสุนัขบ้าในระบบประสาทส่วนกลาง
ของสุนัขและคนที่แสดงอาการแบบต่าง ๆ



นางสรนัมภ์ ศิริระวัฒนพงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคำหลักสูตรปริศนุญวิชาศาสตรมหาบัณฑิต

สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531

ISBN 974-569-633-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015942

I175.139.95

VIRAL DISTRIBUTION IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM
VARIOUS PRESENTATIONS OF DOG AND HUMAN RABIES

Mrs. Suranan Tirawatnpong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Inter-Department of Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-569-633-1



Thesis Title Viral Distribution in Central Nervous System
 Various Presentations of Dog and Human Rabies
By Mrs. Suranan Tirawatnpong
Inter-Department Medical Microbiology
Thesis Advisor Associated Professor Praphan Phanuphak, M.D., Ph.D.
Co-Advisor Assistant Professor Thiravat Hemachudha, M.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
partial fulfillment of the requirements for the Master's degree.

Thavorn Vajrabhaya
..... Dean of the Graduate School
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis committee :

Santi Thoongsuwan
..... Chairman
(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)
Praphan Phanuphak, M.D. Thesis Advisor
(Associate Professor Praphan Phanuphak, M.D., Ph.D.)
Thiravat Hemachudha
..... Co-Advisor
(Assistant Professor Thiravat Hemachudha, M.D.)
Samruay Shaungshoti
..... Member
(Professor Samruay Shaungshoti, M.D., D.Sc.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมเพียงแผ่นเดียว



สุรพันธ์ ศิริระวัฒนพงษ์ : การกระจายของไวรัสพิษสุนัขบ้าในระบบประสาทส่วนกลางของสุนัขและคนที่แสดงอาการแบบต่าง ๆ (VIRAL DISTRIBUTION IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM VARIOUS PRESENTATIONS OF DOG AND HUMAN RABIES) อ.ที่ปรึกษา : รศ.นพ.ประพันธ์ ภาณุภาค, 117 หน้า.

การวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาการกระจายของไวรัสพิษสุนัขบ้าในระบบประสาทส่วนกลางของสุนัขและคนที่แสดงอาการแบบต่าง ๆ พร้อมทั้งพัฒนาวิธีการตรวจหาไวรัสพิษสุนัขบ้าจากสมองและไขสันหลังให้มีความไวและความจำเพาะดี

ผู้วิจัยได้ตรวจหาไวรัสพิษสุนัขบ้าในระบบประสาทส่วนกลางของสุนัขและผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าที่มีอาการแบบสมองอักเสบและอัมพาต (หรือแบบคุร้ายและ เชื่องซึม) ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้ avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) ช่วยเสริมปฏิกิริยา

สมองและไขสันหลังส่วนต่าง ๆ ของสุนัข 6 ตัวที่เริ่มแสดงอาการ (กลุ่มคุร้ายและ เชื่องซึม อย่างละ 3 ตัว) และของผู้ป่วย 7 ราย (กลุ่มสมองอักเสบ 4 ราย และอัมพาต 3 ราย) ที่เสียชีวิต นำไปแช่ในฟอร์มาลีน และเตรียมเป็น paraffin sections ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่เตรียมจากม้า เซลล์ประสาท (neurons และ neuroglia) ที่พบแอนติเจนของไวรัสจะมีลักษณะเป็นแบบ inclusion bodies และ/หรือแบบ diffuse staining ใน cytoplasm การย้อมไวรัสโดยวิธี immunoperoxidase ใน histologic section มีความไว 86.7% ในขณะที่การย้อม Seller's, Fluorescent antibody test จาก brain impression smear และการฉีดสมองหนู มีความไว 40%, 100% และ 100% ตามลำดับ

ผลของการย้อมพบแอนติเจนของไวรัสพิษสุนัขบ้าทั้งใน neurons และ neuroglia และการกระจายของไวรัสในสมองและไขสันหลังส่วนต่าง ๆ ของสุนัขและผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าที่มีอาการทั้ง 2 แบบ โดยที่ลักษณะการกระจายตัวของไวรัสรวมทั้งการอักเสบของเนื้อเยื่อระบบประสาทไม่มีความสัมพันธ์กับอาการแสดงทางคลินิกของโรค

จากการศึกษานี้พบว่า การกระจายของไวรัสพิษสุนัขบ้ากลับมีความสัมพันธ์กับช่วงเวลาตั้งแต่เกิดอาการแสดงของโรคจนถึงระยะที่เสียชีวิตมากกว่า โดยที่ทั้งผู้ป่วยและสุนัขที่มีชีวิตอยู่ในช่วงเวลาน้อยกว่า 7 และ 5 วันตามลำดับ จะมีเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าอยู่ในเซลล์ประสาทเป็นจำนวนมากในส่วนก้านสมองและไขสันหลัง ซึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีระยะเวลาของโรคนานกว่านี้จะพบไวรัสกระจายตัวอย่างกว้างขวางตลอดระบบประสาทส่วนกลางในทุก ๆ ส่วน

ผลของการศึกษานี้ไม่ยืนยันสมมติฐานที่ว่า การกระจายตัวของไวรัสพิษสุนัขบ้าและการอักเสบมีล้วนเกี่ยวข้องกับลักษณะอาการแบบต่าง ๆ ของโรคทั้งในคนและสัตว์ แต่น่าจะเกี่ยวข้องกับปัจจัยอย่างอื่นอีกหลายอย่าง เช่นระบบภูมิคุ้มกัน และความผิดปกติทางหน้าที่การทํางานของเซลล์ประสาท ดังที่มีผู้ทำการศึกษามาก่อนและควรที่จะมีการค้นคว้าอีกต่อไปในอนาคต นอกจากนี้การที่พบไวรัสใน neuroglia เป็นจำนวนมากเป็นการลบล้างความเชื่อเดิมที่ว่าไวรัสพิษสุนัขบ้าจะอยู่ใน neurons เท่านั้น การย้อมหาไวรัสด้วยวิธี immunoperoxidase โดยใช้ ABC นี้สามารถดัดแปลงไปใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับไวรัสหรือแอนติเจนอื่นได้อีกด้วย

ภาควิชา สุนัขโรคทางกรรมพันธุ์
สาขาวิชา สุนัขและแมว สุนัขโรคทางกรรมพันธุ์
ปีการศึกษา 2531

ลายมือชื่อนิติกร
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



SURANAN TIRAWATNPONG : VIRAL DISTRIBUTION IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM VARIOUS PRESENTATIONS OF DOG AND HUMAN RABIES.
THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PRAPHAN PHANUPHAK, M.D., Ph. D.
117 PP.

In order to study the viral pathogenesis of the two distinctive forms of dog and human rabies (furious and dumb or encephalitic and paralytic), rabies viral antigen distribution in central nervous system was studied by immunohistochemical technique with avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) amplification.

Various regions of brain and spinal cord of rabid dogs at the early stage and of human patients were fixed in formalin and prepared for paraffin sections. Equine anti-rabies globulin was used as the primary antibody. Staining was characterized by inclusion bodies and or diffuse staining in the cytoplasm of neurons and neuroglia. Sensitivity of immunoperoxidase staining on histological section and the conventional tests i.e. Seller's stain, Fluorescent antibody test on brain impression smear and Mouse inoculation test were 86.7%, 40%, 100% and 100% respectively.

The results showed that rabies viral antigen was distributed in neuroglia as well as in neurons in all regions of brain and spinal cord of both dogs and human rabies, and the distribution was anatomically similar in both forms of the disease regardless of the species. There was no correlation between inflammatory reactions and amount of antigens or clinical forms of the disease.

Viral localization was correlated with survival period, i.e. interval between onset of disease and death. Human patients as well as rabid dogs, whose survival periods were less than 7 and 5 days respectively, had greater amount of antigen-positive neurons in brain stem and spinal cord, whereas those who had longer survival period had widespread dissemination of rabies antigen in the entire central nervous system.

The results did not support the hypothesis that differential distribution of rabies virus and inflammation were responsible for the diversity of the manifestations in human and canine rabies. Pathogenesis thus may be multifactorial, involving immunological as well as physiological disturbances, and does not depend on viral localization.

The immunoperoxidase staining using ABC technique can also be extended and applied to researches on viral or other studies in the future.

ภาควิชา
สาขาวิชา
ปีการศึกษา 2531

ลายมือชื่อผู้พิมพ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา



ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my profound gratitude to the following persons who have helped, supported and advised me in this work.

My deepest appreciation to:

Dr. Thiravat Hemachudha, M.D., Assistant Professor of Neurology Division, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his continual interest, devotion, suggestion, attention, encouragement, and kindness throughout my study. I thank him and am most grateful.

Dr. Praphan Phanuphak, M.D., Ph. D., Associate Professor of Immunology Division, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his helpful suggestions, and review of manuscript.

Professor Dr. Samruay Shaungshoti, M.D., D.Sc. Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his valuable advice and his excellence in the examination of the pathology slides of human brain sections.

Dr. Sathaporn Manutsathit, M.D., Bumrasanaradura Communicable Disease Control Hospital, Bangkok, for his excellent cooperation in the study of human rabies.

Dr. Weera Tepsumethanon, D.V.M., and Dr. Chaiyaporn Polsuwan, D.V.M., Rabies Diagnosis Unit, Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society, for their great help in the observation, diagnosis by Seller's staining, FAT and MIT, and autopsy of the rabid dogs.

I would like to thank Dr. Reutai Sakulramrung, M.D., Ph.D., Head of Immunology Division and Dr. Kawee Pupaibul, Head of Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their kind permission to study at the Graduate School, Chulalongkorn University. Thanks are also extended to all my colleagues in the Immunology Division for their support and being good friends during my study, to Miss Somsap Thungsatthasiri for the typing of the manuscript, and last to Dr. B.L. Reynolds for his help in correcting the English.

Finally, I record my deep gratitude to my parents, my husband, especially my only son " Nonthawat " who have given their love, and understanding.

This work was supported in part by grants from Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross Society and Chulalongkorn University Hospital and by the Committee of the Graduate School, Chulalongkorn University.



CONTENT

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES	xii
ABBREVIATIONS.....	xiii
OBJECTIVES.....	xv
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. LITERATURE REVIEW.....	7
RABIES VIRUS.....	7
1. Background.....	7
2. Viral Antigens.....	8
3. Negri Body.....	9
CLINICAL FEATURES OF RABIES.....	10
1. Incubation Period.....	11
2. Prodrome.....	12
3. Acute Neurological Phase.....	12
4. Coma.....	14
5. Recovery.....	14
PATHOGENESIS.....	16
NEUROPATHOLOGICAL CHANGES IN RABIES.....	26
1. Neuropathological Changes in Human Rabies.....	26
2. Neuropathological Changes in Canine Rabies.....	29

	Page
LABORATORY DIAGNOSIS OF RABIES.....	31
1. Seller's Rapid Technique.....	33
2. Animal Inoculation.....	33
3. Fluorescent Antibody Test (FAT).....	34
4. Immunoperoxidase Staining (IP).....	35
 III. MATERIALS AND METHODS	
1. Places of study.....	38
2. Materials.....	38
2.1 Rabid Dogs.....	38
2.2 Rabies Patients.....	39
3. Preparation of Paraffin-Sectioned Slides.....	40
3.1 Tissue Processing and Embedding.....	40
3.2 Preparation of Tissue-Sectioned Slides.....	40
4. Preparation of Rabbit Anti-Rabies Serum.....	41
5. Rabbit Anti-Rabies Immunoglobulin G Preparation...	41
6. Reconstitution of Commercial Equine Anti-Rabies Globulin (BBL).....	43
7. Methods of Immunoperoxidase Staining Using Avidin- Biotin-Peroxidase Complex (ABC) Technique	43
8. Determination of Factors Affecting the Immunoperoxidase Staining, ABC Technique.....	46
8.1 Affecting on Antibodies.....	46
8.2 Trypsinization for Digesting the Aldehyde Linkages.....	47
8.3 Inhibition of Nonspecific Background Staining and Endogeneous Peroxidase Activity.....	48

	Page
9. Specificity of Reaction in Immunoperoxidase Staining, ABC Technique.....	48
10. Sensitivity of Immunoperoxidase Staining, ABC Technique.....	49
11. Methods of Quantitation.....	49
12. Analysis of Data.....	50
 IV. RESULTS	
1. Immunoperoxidase Staining for Detection of Rabies Viral Antigen in Tissues.....	51
2. Specificity of Reaction in Immunoperoxidase Staining, ABC Technique	54
3. Sensitivity of Immunoperoxidase Staining, ABC Technique.....	54
4. Regional Distribution of CNS Infection and Inflammation in Infected dogs.....	55
5. Regional Distribution of CNS Infection and Inflammation in Human Patients.....	56
V. DISCUSSION.....	59
Conclusions.....	65
REFERENCES.....	88
APPENDIX I.....	109
APPENDIX II.....	112
CURRICULUM VITAE.....	117



LIST OF TABLES

Table	page
1. Checkerboard titration to determine the optimal dilution of antibodies.....	67
2. Determination of optimal concentration of trypsin.....	69
3. Duration and temperature for trypsin treatment.....	70
4. Comparison of IP (ABC method), Seller's stain, FAT and MIT.....	71
5. Characteristics of dogs with rabies.....	72
6. Distribution of rabies antigen and inflammation in CNS of dog rabies.....	73
7. Mean of amount of viral antigen in neurons and neuroglia in various CNS regions of dog rabies.....	74
8. Characteristics of patients with rabies.....	75
9. Distribution of rabies antigen and inflammation in CNS of human rabies.....	76
10. Mean of amount of viral antigen in neurons and neuroglia in various CNS regions of human rabies.....	77



LIST OF FIGURES

Figure	page
1. Clinical pattern of human encephalitic rabies.....	78
2. Clinical pattern of human paralytic rabies.....	79
3. Affinity chromatography of rabbit anti-rabies on Protein A-Sepharose CL-4B column.....	80
4. Immunoelectrophoresis of rabbit anti-rabies IgG against A. Swine anti-rabbit serum.....	81
B. Goat anti-rabbit IgG.....	81
5. Immunoperoxidase staining of rabies viral antigen showing intensive brown inclusion bodies in neurons in the anterior horn of cervical segment of spinal cord from Patient 6, who presented as paralytic rabies.....	82
6. Rabies viral antigen in neurons in the midbrain of a dumb dog, Dog 3. Dense peroxidase reaction, in the form of inclusions, is present in the cytoplasm.....	83
7. Diffuse staining of rabies viral antigen in neuron and neuropils in the medulla of a furious dog, Dog 1.....	84
8. Rabies infection of neurons and astrocytes in the occipital region of Patient 5.....	85
9. Diffuse staining of rabies viral antigen in astrocytes in the midbrain of Dog 4.....	86
10. Dense perivascular infiltrations of mononuclear cells in the brain stem of Patient 4.....	87

ABBREVIATIONS

1°	=	Primary
2°	=	Secondary
2nd ed.	=	Second edition
°C	=	celsius (centigrade)
Ab	=	Antibody
Ag	=	Antigen
d	=	daltons
ed.	=	editor
e.g.	=	exempli gratia
et al.	=	et alii
etc.	=	et cetera
FAT	=	Fluorescent Antibody Test
g	=	gramme
i.e.	=	id est
IgG	=	Immunoglobulin G
IP	=	Immunoperoxidase
kg	=	kilogramme
l	=	litre
mg	=	milligramme
µg	=	microgramme
min.	=	minute
ml	=	millilitre
µl	=	microlitre
µm	=	micron
µµ	=	millimicron

M	=	molar
MIT	=	Mouse Inoculation Test
MW	=	Molecular Weight
N	=	normal
ng	=	nanogramme
nm	=	nanometre
PBS	=	Phosphate Buffered Saline
rpm	=	round per minute

OBJECTIVES

1. To study the distribution of rabies virus in the central nervous system of dog and human rabies of various presentations.
2. To develop an immunoperoxidase method using avidin-biotin-peroxidase complex for the detection of rabies virus in the central nervous system.