

Abstract

Project Code : MRG5480128

Project Title : Genetic and phenotypic characterization of tissue cultured-adapted chikungunya viruses

Investigator : Rojjanaporn Pulmanusahakul
Institute of molecular biosciences, Mahidol University

E-mail Address : rojjanaporn.pul@mahidol.ac.th

Project Period : 15 มิถุนายน 2554 –
(ระยะเวลาโครงการ)

Chikungunya virus (CHIKV), a mosquitoes-borne *Alphavirus*, is an etiological agent of chikungunya fever. The virus is an enveloped positive single stranded RNA virus. In 2005-2006, CHIKV re-emerged and caused the major outbreak started from the Indian Ocean islands and spread to many countries in Asia including Thailand. In this project, the whole genome of CHIKV isolated from a Thai patient was sequenced. The results showed the virus belongs to the East Central South African (ECSA) genotype with an alanine to valine substitution at position 226 of the E1 protein, which is consistent with other isolates in the same outbreak. The CHIKV isolates was then undergone through two independent plaque purification series in Vero and C6/36 cells, resulting in the viruses that produced large and small plaque size, respectively. The viruses exhibited different levels of pathogenicity after intracranially infected to suckling mice in which the large plaque virus is highly pathogenic whereas the small plaque virus is almost non-pathogenic. Comparison of the genetic sequences of the Vero adapted-virus and parental isolates revealed 3 amino acid differences, nsP2: P618R, nsP3: G117R and E2: N187K, while the C6/36 adapted-virus differ from the parental virus only one position at nsP2: D546G.

Keywords: Chikungunya virus, Thai isolate, Tissue culture-adaptation, Plaque purification, Viral pathogenicity

ชื่อโครงการ: การศึกษาพันธุกรรมและคุณลักษณะของไวรัสชิคุนกุนยาที่มีการปรับตัวเข้ากับเซลล์เพาะเลี้ยง

ไวรัสชิคุนกุนยาเป็นสาเหตุของโรคไข้วัดข้อชิคุนกุนยาซึ่งมีอยู่เป็นพาหะ ไวรัสนี้จัดอยู่ในวงศ์ *alphavirus* ซึ่งเป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้มและมีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายบวก ในช่วงปีค.ศ. 2005 ถึง 2006 ได้เกิดการระบาดของไวรัสชิคุนกุนยารั้งใหญ่ โดยเริ่มเกิดขึ้นที่หมู่เกาะในมหาสมุทรอินเดีย และแพร่ระบาดมาจนถึงทวีปเอเชีย รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งโครงการนี้ได้ทำการศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย โดยทำการหาลำดับเบสทั้งจีโนมของไวรัส หลังจากนำผลที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าไวรัสนี้จัดอยู่ในกลุ่ม ECSA และมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 226 ของโปรตีน E1 จาก alanine เป็น valine ซึ่ง สอดคล้องกับผลของผู้วิจัยอื่นที่ทำการศึกษาไวรัสชิคุนกุนยาจากการระบาดครั้งเดียวกันนี้ จากนั้นผู้วิจัยได้นำไวรัสชิคุนกุนยานี้ไปเลี้ยงในเซลล์ไตลิง (Vero) และมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการเลือก plaque ขนาดใหญ่ หรือเลี้ยงในเซลล์ยูง (C6/36) แล้วเลือก plaque ขนาดเล็ก โดยไวรัสที่มีลักษณะ plaque ต่างกันนี้แสดงควมรุนแรงต่างกันหลังจากฉีดเข้าสมองหนูแรกเกิด ไวรัสที่สร้าง plaque ขนาดใหญ่มีความรุนแรงมาก ในขณะที่ไวรัสที่สร้าง plaque ขนาดเล็กเกือบจะไม่มีอันตรายต่อหนู เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของไวรัสทั้งสองกับไวรัสต้นแบบที่แยกจากผู้ป่วย พบว่าไวรัสที่สร้าง plaque ใหญ่มีการสร้างกรดอะมิโนแตกต่างจากไวรัสต้นแบบ 3 ตำแหน่ง คือ ที่โปรตีน nsP2 ตำแหน่ง 618 จากโปรตีนเป็นอาร์จีนีน ที่โปรตีน nsP3 ตำแหน่ง 117 จากไกลซีนเป็นอาร์จีนีน และที่โปรตีน E2 ตำแหน่ง 187 จากแอสพาราจีนเป็นไลซีน ส่วนไวรัสที่สร้าง plaque ขนาดเล็กมีความแตกต่างจากไวรัสต้นแบบแค่ หนึ่งตำแหน่งที่ 546 ของโปรตีน nsP2 จากกรดแอสพาทิกเป็นไกลซีน