บทคัดย่อ

การเลี้ยงไวรัสเดงกี่อย่างต่อเนื่องใน cell line ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสเป็นวิธีการปกติที่ใช้ในการพัฒนาเดงกี่วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (live-attenuated dengue vaccine) นอกจากนี้การเลี้ยงไวรัสเดงกี่อย่างต่อเนื่องใน cell line เช่น เซลล์ C6/36 จากยุงลาย (*Aedes albopictus*) และเซลล์ Vero (เซลล์ไตของลิง African green monkey kidney cells) ซึ่งใช้ทั่วไปในการศึกษาวิจัยเชื้อไวรัสเดงกี่หรือการทำ stock เชื้อไวรัสเดงกี่ ก็สามารถส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype ของเชื้อไวรัสเดงกี่ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามข้อมูลของความเชื่อมโยงของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Genotypic change) กับการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนทัยป์ (Phenotypic change) ที่เกิดขึ้นในช่วงที่เลี้ยงไวรัสอย่างต่อเนื่องใน cell line ยังไม่มีการอธิบายไว้ชัดเจน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการแยกไวรัสเดงกี่จากพลาสมาของคนไข้ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกี่ซีโรทัยป์หนึ่ง จำนวนหนึ่งตัวอย่างลงใน C6/36 cell และ Vero cell และเลี้ยงไวรัสอย่างต่อเนื่องในเซลล์ทั้งสองชนิดจำนวน 15 passages โดยใน passage ที่ 2 – 15 จะทำการเพาะเลี้ยงไวรัส passage ละสามซ้ำ ไวรัสเดงกี่ที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องนี้แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype คือขนาดของ Foci และรูปแบบของ Foci ที่เปลี่ยนแปลงไปในไวรัสเดงกี่แต่ละ passage ที่เพาะเลี้ยง ไวรัสเดงกี่ที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องใน C6/36 และ Vero เริ่มสร้างรูปแบบของ foci ที่จำเพาะต่อชนิดของ Cell line ที่เพาะเลี้ยงตั้งแต่ passage ที่สามเป็นต้นไป โดยไวรัสเดงกี่จาก Vero cell เริ่มสร้าง foci ขนาดใหญ่ (Large foci) ตั้งแต่ passage ที่สาม ดังนั้นจึงแนะนำว่าในการศึกษาไวรัสเดงกี่จากตัวอย่างคนไข้ไม่ควรเพาะเลี้ยงไวรัสเดงกี่เกินกว่า passage ที่สองเพื่อรักษา phenotype เดิมของไวรัสเดงกี่ที่มาจากตัวอย่างผู้ป่วยเอาไว้ จากนั้นไวรัสเดงกี่จาก C6/36 และ Vero ใน passage ที่หนึ่ง (P1) passage ที่สอง (P3) และ passage ที่ห้า (P5) ถูกเลือกเพื่อส่งไปหาลำดับเบส Whole Genome Sequencing (WGS) ด้วย Illumina ผล WGS แสดงให้เห็นว่ามี genotypic change เกิดขึ้นตั้งแต่ P1 โดยจาก variations ที่พบในตัวอย่างไวรัสเดงกี่จากพลาสมา (ข้อมูลจากการทดลองในโครงการก่อนหน้านี้) จำนวน 1,031 ตำแหน่ง มี variations ที่ส่งต่อไปที่ P1 ของ C6/36 จำนวน 39 ตำแหน่ง และ Vero จำนวน 37 ตำแหน่ง และคงเหลืออยู่ใน P3 และ P5 ของ C6/36 และ Vero จำนวน 14 และ 24 ตำแหน่งตามลำดับ โดย Variations จากพลาสมาผู้ป่วย (P0) ที่พบ conserved อยู่ในทั้งสาม passage ของ cell line ทั้งสองชนิดมีแค่แปดตำแหน่งเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบ variations ใหม่ในไวรัสเดงกี่จากทั้งสาม passages ของ cell line ทั้งสองชนิด โดยเฉพาะ Vero ที่สร้าง variants ใหม่มากกว่า C6/36 นอกจากนี้ไวรัสเดงกี่จากแต่ละชนิดเซลล์ยังสร้าง variants ที่จำเพาะต่อเซลล์นั้น ๆ (cell-type specific variants) อีกด้วย โดย variants จำนวน 20 จาก 22 ตำแหน่งจาก Vero ถูกพบอยู่ใน coding region ในขณะที่ variants ที่จำเพาะต่อ C6/36 ทั้งหมดพบอยู่ใน Untranslated region (UTR) จากผลแสดงให้เห็นว่า Vero cell ส่งผลให้ไวรัสเดงกี่เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งในระดับ Genotype และ Phenotype ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงไวรัสใน C6/36 cell ในการศึกษานี้ยังได้พยายามที่จะระบุ Variation ที่อาจสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype ของไวรัสเดงกี่ด้วย โดยพบว่ามี variants จำนวน 19 ตำแหน่งที่พบเฉพาะใน P3

และ P5 ของ Vero ซึ่งเป็น passage ที่ไวรัสเดงกี่สร้าง large foci โดย variants ทั้ง 19 ตำแหน่งนี้ทั้งหมดเป็น non-synonymous variation ซึ่งเปลี่ยนชนิด Amino acid โดยหลายตำแหน่งพบอยู่ในยีน NS4B โดย variants เหล่านี้อาจสัมพันธ์กับการเกิด large foci ในไวรัสเดงกี่จาก Vero ได้ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ของ variations เหล่านี้ต่อการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype หรือ fitness ของไวรัสเดงกี่ใน Vero cell จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลต่อไป.

Abstract

The serial passaging to accumulate genetic changes is one of the methods commonly used in live-attenuated dengue vaccine development. In addition, extensive serial passaging in cell lines, such as C6/36 from Aedes albopictus mosquito and Vero cells from African green monkey kidney epithelial cells, routinely used for virus research or stock collection also resulted in phenotypic changes. However, there is still no clear information connecting genetic changes to phenotypic changes observed during serial passaging. In this study, we isolated dengue virus from the plasma of a dengue patient and then serially passaged dengue virus in C6/36 and Vero cells in triplicate. The virus from serial passages showed phenotypic changes including foci size and pattern of foci. The dengue virus serially passaged in C6/36 and Vero cells started to develop the specific patterns of foci at the third passage after virus isolation from the plasma. The dengue virus cultured in Vero cell produced large foci since passage three (P3) onwards. Therefore, dengue virus from clinical isolation should not be cultured beyond the second passage to retain the original phenotype. Dengue virus cultured in C6/36 and Vero cells from passage 1 (P1), passage three (P3), and passage five (P5), were selected for genome sequencing by Illumina platform. The genome sequencing data revealed that genotypic changes occurred since the P1. Only 39 and 37 of 1,031 original variants detected in dengue virus sequenced from patient's plasma (P0) were transferred to P1 of C6/36, respectively. However, only 14 and 24 variants still remained in P3 and P5 from C6/36 and Vero cells. Only eight conserved variants were detected in P0 (patient's plasma) and P1, P3, and P5 of dengue cultured in C6/36 and Vero cells. New variants were found in all three passages of both cell lines, especially Vero. The cell-type specific variants were also observed in dengue virus from C6/36 and Vero cells. There are 20 from 22 Vero-specific variants found in coding region, whereas all of C6/36-specific variants were located in UTR. Therefore, Vero cells seemed to drive the higher rate of genotypic

and phenotypic change in dengue virus population than that of C6/36 cell line. The variants which may associated to phenotypic change were identified. There are 19 variants detected only in P3 and P5 of Vero which may related to large foci. Interestingly, all 19 variants are non-synonymous with several variants located in NS4B gene. However, the correlation of these variations to phenotypic change or dengue fitness need to be further investigated.
Keywords : dengue virus, viral cell culture, genetic changing, C6/36 cell, Vero cell