

**Thesis Title**            Base Sequence Variation of the Envelope Gene of Dengue Viruses Isolated from Dengue Hemorrhagic Fever Patients with Different Grades of Severity

**Author**                    Miss Anchalee Sistanarain

**M.Sc.**                      Microbiology

**Examining Committee :**

Assoc. Prof. Dr. Niwat    Maneekarn            Chairman

Dr. Nopporn    Sittisombut            Member

Dr. Watchara    Kasinrerak            Member

### ABSTRACT

Dengue hemorrhagic fever is an acute infectious disease caused by dengue virus. Dengue virus infection of human can result in different severity of diseases. The majority of infected persons are asymptomatic. Some patients develop undifferentiated fever or dengue fever (DF) without complications. The most serious form of the disease, dengue hemorrhagic fever (DHF) or dengue shock syndrome (DSS), occurs in a small fraction of all infected individuals and can result in death. At present, the factor(s) that determines the clinical outcome of dengue infection is not yet known, but the variation in virus virulence may be involved. The purpose of this study was to evaluate the differences of nucleotide sequence of the envelope gene of dengue viruses isolated from

### III

patients with different grades of DHF. Nine dengue type 2 viruses selected for the study were isolated by the Armed Forces Research Institute of Medical Sciences from four patients with DHF and five patients with DSS who resided in a small geographical area of Bangkok during the 1987 epidemic season. Viruses were grown in C6/36 cells and their serotype confirmed by an indirect immunofluorescence assay. Viral RNA genome was extracted from C6/36 culture fluid by phenol/chloroform extraction and was reverse transcribed to cDNA. This cDNA was amplified in the region of envelope gene by polymerase chain reaction (PCR) employing *Taq* DNA polymerase. The PCR product was separated by agarose gel electrophoresis and purified by glass powder extraction. Direct sequence analysis of the amplified envelope gene was accomplished by using the dideoxy chain termination cycle sequencing method. Pairwise comparisons reveal that the nucleotide sequences of envelope gene of eight dengue viruses that were isolated from four DHF patients and four DSS patients are almost identical (nucleotide sequence identity of  $\geq 98.9\%$ ). Analysis of the deduced amino acid sequences indicates that there is only one amino acid variation among these eight dengue virus strains. On the other hand, a dengue virus strain that was isolated from a grade IV DSS patient (D87-1421) differs from the former group by upto 6.1% of the whole envelope gene sequence (nucleotide sequence identity of  $\leq 93.9\%$ ). Ten and 11 amino acids were found to be different between D87-1421 and the viruses of the first group. Thus, differences in the nucleotide and amino acid sequences of envelope gene of dengue type 2 viruses that were isolated from patients who resided in a small area of Bangkok allow the subdivision of these viruses into two groups. Similar classification of dengue type 2 viruses has been proposed previously from the study of the 1980 Bangkok epidemic. Nucleotide sequence comparisons of the 1987 isolates with those of 1980 epidemic indicate that there are closer similarities among the corresponding groups of the 1980 and 1987 seasons than between the two groups of the same year.

In conclusion, it appears that dengue type 2 viruses that are identical or almost identical in the nucleotide and amino acid sequences of envelope gene are associated with grades I, II and III of DHF. In contrast, a virus strain derived from a grade IV DHF

patient differs from the first group in both the nucleotide and amino acid sequences. Further studies may involve the determination of nucleotide and amino acid sequences of the envelope gene of more grade IV DSS isolates as well as of dengue virus strains isolated from DF patients in the same epidemic. In addition, the determination of the differences in nucleotide and amino acid sequences of other regions of dengue virus genome may also be helpful in our understanding of the pathogenesis of DHF.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

**ชื่อวิทยานิพนธ์** ความแตกต่างของลำดับเบสของยีนเอนเวโลปของเชื้อไวรัสเดงกีที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน

**ผู้เขียน** นางสาวอัญชลี กิษยนเรนทร์

**วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา**

**คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :**

รศ. ดร.นิวัฒน์ มณีกาญจน์	ประธานกรรมการ
นพ. นพพร สิทธิสมบัติ	กรรมการ
ดร. วัชรระ กสิณฤกษ์	กรรมการ

#### บทคัดย่อ

โรคไข้เลือดออกเป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสเดงกี. ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสนี้จะแสดงอาการของโรคที่รุนแรงแตกต่างกันได้มาก, โดยที่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ติดเชื้อแล้วไม่แสดงอาการหรือจะแสดงอาการที่ไม่ค่อยรุนแรงคือ เป็นโรคไข้ที่ไม่มีลักษณะจำเพาะ (undifferentiated fever) หรือโรคไข้เดงกี (dengue fever) ที่หายได้เอง. ในขณะเดียวกัน ผู้ป่วยบางรายมีโรครุนแรงมากคือจะแสดงอาการของโรคไข้เลือดออกที่ไม่มีอาการช็อคหรือที่มีอาการช็อคร่วมด้วยซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีถึงแก่ชีวิต. ในปัจจุบันนี้ ยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงที่ทำให้ผู้ติดเชื้อเดงกีเกิดโรคที่มีความรุนแรงแตกต่างกัน. แต่เคยมีผู้เสนอความคิดที่น่าสนใจว่าความแตกต่างของสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเดงกีอาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการชักนำให้เกิดอาการของโรคที่มีความรุนแรงแตกต่างกันได้. การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาถึงความแตกต่างของลำดับเบสของยีนเอนเวโลปของเชื้อไวรัสเดงกีที่แยกได้จากกลุ่มผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกที่มีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน. การศึกษาทำโดยคัดเลือกเชื้อไวรัสเดงกีที่หายปี 2 จำนวน 9 สายพันธุ์ จากผู้ป่วยอาการไข้เลือดออกที่ไม่มีอาการช็อค 4 สายพันธุ์ และจากผู้ป่วยอาการไข้เลือดออกที่มีอาการ

## VI

ข้อ 5 สายพันธุ์. เชื้อไวรัสแดงที่ห้วยปี 2 เหล่านี้ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารแยกได้จากผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่ใกล้เคียงกันในกรุงเทพมหานคร ระหว่างการระบาดใหญ่ในปีพ.ศ. 2530. เมื่อนำเชื้อไวรัสแดงที่มาจากเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด C6/36 และตรวจยืนยันว่าเป็นห้วยปี 2 โดยวิธี indirect immunofluorescence assay แล้ว จึงแยกอาร์เอ็นเอของเชื้อจากน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้สารฟีนอลและคลอโรฟอร์ม และใช้อาร์เอ็นเอนั้นเป็นแม่พิมพ์ (template) ในการสร้างสายดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่ที่มีลำดับเบสเข้าคู่ได้กับอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส (cDNA). จากนั้น นำดีเอ็นเอมาเพิ่มจำนวนตรงเฉพาะบริเวณยีนเอนเวโลปด้วยวิธีโพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน (polymerase chain reaction) โดยอาศัยเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase และแยกท่อนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้วโดยวิธี agarose gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี glass powder extraction แล้วจึงนำไปหาลำดับเบสโดยตรงโดยวิธี dideoxy chain termination cycle sequencing. ผลจากการศึกษาลำดับเบสของยีนเอนเวโลปของเชื้อไวรัสแดงที่พบว่ามีจำนวน 8 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยอาการไข้เลือดออกที่ไม่มีอาการข้อ 4 สายพันธุ์ และจากผู้ป่วยที่มีอาการข้อ 4 สายพันธุ์ มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันมาก (มีลำดับเบสที่ตรงกันเท่ากับหรือมากกว่า 98.9 เปอร์เซ็นต์). เชื้อไวรัสในกลุ่มแรกทั้ง 8 สายพันธุ์นี้มีลำดับของกรดอะมิโนแตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น. ในทางตรงกันข้าม เชื้อไวรัสแดงที่จำนวน 1 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยอาการไข้เลือดออกที่มีอาการข้อรุนแรงเกรด 4 มีลำดับเบสของส่วนยีนเอนเวโลปที่แตกต่างจากเชื้อในกลุ่มแรกถึง 6.1 เปอร์เซ็นต์ (มีลำดับเบสที่ตรงกันเท่ากับหรือน้อยกว่า 93.9 เปอร์เซ็นต์) และมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันถึง 10-11 ตำแหน่ง. ดังนั้นความแตกต่างของลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีนเอนเวโลปของเชื้อไวรัสแดงที่ห้วยปี 2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่ใกล้เคียงกันในกรุงเทพฯ ระหว่างปี พ.ศ. 2530 ช่วยให้สามารถแบ่งเชื้อไวรัสแดงที่ห้วยปี 2 ออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย, เช่นเดียวกับกับผลการศึกษาเชื้อไวรัสแดงที่ห้วยปี 2 ครั้งก่อนในปี พ.ศ. 2523 ที่กรุงเทพฯ. การเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อที่แยกได้จากปี พ.ศ. 2530 และปี พ.ศ. 2523 บ่งชี้ว่า ในระหว่างเชื้อทั้ง 2 กลุ่มย่อยของปี พ.ศ. 2530 และปี พ.ศ. 2523 เชื้อในกลุ่มย่อยที่ตรงกันของปี พ.ศ. 2530 และปี พ.ศ. 2523 มีความคล้ายคลึงกันมากกว่าเชื้ออีกกลุ่มย่อยหนึ่งที่แยกได้ในปีเดียวกัน.

กล่าวโดยสรุป การศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อไวรัสแดงที่ห้วยปี 2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกที่มีความรุนแรงจัดอยู่ในเกรด 1, 2 และ 3 ที่มีลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีนเอนเวโลปจะเหมือนกันหรือเกือบเหมือนกันทุกประการ. แต่เมื่อเทียบกับเชื้อไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วย

## VII

โรคไข้เลือดออกเกรด 4 พบว่าทั้งลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสแดงที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกที่มีความรุนแรงจัดอยู่ในเกรด 1, 2 และ 3 แตกต่างจากเกรด 4 อย่างชัดเจน. แนวทางการศึกษาต่อไปคือ ตรวจสอบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนในส่วนยีนเอนเวโลปของเชื้อไวรัสแดงที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกเกรด 4 จากการระบาดปีเดียวกันให้มีจำนวนมากขึ้น และอาจศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อจากผู้ป่วยโรคไข้แดงที่ซึ่งจะมีความรุนแรงน้อย, นอกจากนี้ อาจตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีนอื่นๆของเชื้อไวรัสแดงที่ชุดเดียวกันนี้ด้วย.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved