

ARTIKEL PENELITIAN

**ANALISIS GENETIK GEN NONSTRUKTURAL 3 DENGUE VIRUS SEROTYPE 4
STRAIN INDONESIA**

**(GENETIC ANALYSIS OF NONSTRUCTURAL GENE 3 DENGUE SEROTYPE 4
VIRUS INDONESIAN STRAIN)**

Linlin Haeni¹, Beti Ernawati Dewi²

¹Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Achmad Yani

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Email korespondensi : linlin.haeni@gmail.com

ABSTRAK

Demam Berdarah Dengue (DBD) adalah penyakit yang disebabkan virus dengan vektor nyamuk yang paling cepat menyebar di dunia. Penyebab DBD adalah virus RNA famili flaviviridae yang disebut virus dengue (DENV). Genom DENV terdiri dari tiga protein struktural yaitu capsid (C), protein membran (prM), dan protein envelop (E) serta tujuh gen protein nonstruktural yaitu NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, dan NS5. Protein NS3 mengandung epitop yang dapat dikenali oleh sistem imun humoral maupun selular oleh karena itu protein NS3 merupakan target potensial bagi pengembangan vaksin dengue. Penelitian ini diawali dengan sekuensing pada gen NS3 DENV-4 IDS 96/10. Dari hasil sekuensing dilakukan analisis filogenetik dan analisis epitop. Analisis filogenetik menunjukkan gen NS3 IDS 96 /10 berada dalam satu *clade* dengan strain yang diisolasi dari Cina (2010), Singapura (2010) dan Thailand (2000). Pada gen NS3 DENV-4 IDS 96/10 terdapat epitop yang dapat dikenali oleh sel limfosit T CD4⁺ yaitu epitop #3 pada posisi asam amino (213-227) , #9A(243-257), #4(251-265), #5(258-272), # 6(266-280), #7(273-287) yang mempunyai urutan asam amino sama antar strain yang dibandingkan. Pada posisi epitop #8(281-295) terdapat variasi urutan asam amino. Asam amino pada posisi 500-508 dikenali oleh sel limfosit T CD8⁺ mempunyai urutan yang sama antar strain yang dibandingkan, dan asam amino pada posisi 526-531 yang dikenali oleh limfosit B mempunyai urutan asam amino yang sama antar strain yang dibandingkan. Pengenalan epitop-epitop tersebut oleh limfosit T

dan limfosit B menjadi dasar pengembangan vaksin khususnya vaksin yang khusus untuk strain Indonesia.

Kata kunci : Dengue, Epitope, NS3

ABSTRACT

Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) are viral diseases transmitted by mosquito vector spreads fastest in the world. Cause of dengue fever are RNA virus family Flaviviridae called dengue virus (DENV). DENV genome encodes three structural proteins, capsid (C), membrane proteins (prM), envelope protein (E) and seven nonstructural protein NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4B, and NS5. NS3 protein contains many epitopes that can be recognized by the humoral and cellular immune system. Therefore, NS3 protein is a potential target for development of dengue vaccines. This study begins by sequencing NS3 gene DENV-4 IDS 96/10. Phylogenetic analysis and epitope analysis were done from the result of sequencing. Phylogenetic analysis showed IDS 96/10 were in one clade with strains isolated from China (2010), Singapura (2010), and Thailand (2000). NS3 gene DENV-4 IDS 96/10 contained epitopes recognized by CD4⁺T cell that is epitope # 3 on the position of amino acids (213-227), # 9A (243-257), # 4 (251-265), # 5 (258-272), # 6 (266-280), # 7 (273-287) which has the same amino acid sequence comparison between strains. At position # 8 epitope (281-295) there are variation of amino acid sequence. Amino acids at positions 500-508 is recognized by CD8⁺ lymphocytes have the same sequence between strains were compared, and the amino acids at positions 526-531 which recognized by has the same amino acid sequence comparison between strains. Recognition of these epitopes by T lymphocytes and B lymphocytes can be the basis for the development of vaccines, especially vaccines for the Indonesian strain.

Keywords: Dengue, Epitope, NS3

PENDAHULUAN

Demam Berdarah Dengue (DBD) adalah penyakit yang disebabkan virus dengan vektor nyamuk yang paling cepat menyebar di dunia. Dalam 50 tahun terakhir, insidensinya meningkat menjadi 30 kali lipat dengan peningkatan perluasan daerah geografis ke negara-negara baru ,

baik daerah pedesaan maupun perkotaan. Diperkirakan 50 juta orang terinfeksi virus ini setiap tahunnya dan 2,5 milyar penduduk hidup di daerah endemis dengue.¹

Sekitar 1,8 milyar (lebih dari 70%) populasi yang memiliki risiko infeksi virus

dengue di dunia terdapat di daerah Asia Tenggara dan Asia Pasifik. Di Asia Tenggara sendiri epidemi dengue telah menyebar ke daerah baru dan kasusnya meningkat pada daerah yang sudah terkena. Pada tahun 2003 8 negara (Bangladesh, India, Indonesia, Maldives, Myanmar, Sri Lanka, Thailand, Timor Leste) melaporkan kejadian kasus dengue ini. Pada tahun 2004, Bhutan melaporkan kejadian wabah pertama dengue didaerahnya dan pada tahun 2005 *Global Outbreak Alert and Response Network (GOARN)* melaporkan kejadian luar biasa dengue di Timor Leste memiliki tingkat kematian hingga 3,55 %.¹

Penyakit DBD masih merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang utama di Indonesia. Jumlah penderita dan luas daerah penyebarannya semakin bertambah seiring dengan meningkatnya mobilitas dan kepadatan penduduk. Di Indonesia DBD pertama kali ditemukan di kota Surabaya pada tahun 1968, dimana sebanyak 58 orang terinfeksi dan 24 orang diantaranya meninggal dunia (Angka Kematian (AK) : 41,3 %). Dan sejak saat itu, penyakit ini menyebar luas ke seluruh Indonesia.² Sejak tahun 1968 telah terjadi peningkatan persebaran jumlah provinsi dan kabupaten/kota yang endemis DBD, dari 2 provinsi dan 2 kota, menjadi 32

(97%) dan 382 (77%) kabupaten/kota pada tahun 2009.²

Pada tahun 2009 provinsi DKI Jakarta merupakan provinsi dengan angka insidensi DBD tertinggi (313 kasus per 100.000 penduduk) sedangkan Nusa Tenggara Timur merupakan provinsi dengan angka insidensi DBD terendah (8 kasus per 100.000 penduduk). Terdapat 11 provinsi termasuk dalam daerah risiko tinggi (Angka insidensi > 55 kasus per 100.000 penduduk).²

Virus dengue diklasifikasikan ke dalam genus Flavivirus bersama *Yellow Fever Virus (YFV)*, *West Nile virus (WNV)*, *Japanese encephalitis virus (JEV)*, dan *Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV)*.³ Genom virus dengue merupakan untai RNA tunggal linier yang berukuran ± 11 Kb. Genom virus dengue terdiri dari tiga protein struktural yaitu capsid (C), protein membran (prM), dan protein envelop (E) serta tujuh gen protein nonstruktural yaitu NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b dan NS5.^{3,4}

Virus Dengue ditularkan dari orang ke orang melalui gigitan nyamuk *Aedes (Ae)*. *Ae aegypti* merupakan vektor epidemi yang paling utama, namun spesies lain seperti *Ae.albopictus*, *Ae.polynesiensis*, dan *Ae. niveus* juga dianggap sebagai vektor sekunder. Nyamuk penular dengue ini terdapat

hampir di seluruh pelosok Indonesia, kecuali di tempat-tempat dengan ketinggian lebih dari 1000 meter di atas permukaan laut.⁵

Program pengendalian vektor di Indonesia belum berjalan dengan baik, terbukti dengan kenaikan kasus DBD setiap tahun.² Oleh karena itu dikembangkan penelitian vaksin dengue. Berbagai macam vaksin dengue berdasarkan jenisnya dan sedang dalam penelitian diantaranya adalah *recombinant subunit vaccines*, *purified inactivated virus vaccines*, *live attenuated vaccine* dan vaksin DNA.⁶⁻¹⁰ Vaksin DNA dapat menginduksi respon imun humoral maupun seluler, relatif stabil, aman, mudah dan cepat dalam konstruksi dan produksinya.⁹

Penelitian terdahulu tentang vaksin DNA berbasis gen NS3 diantaranya penelitian yang dilakukan Costa *et al* tahun 2011.¹¹ Penelitian tersebut diawali dengan pengklonan gen NS3 DENV-2 strain New Guinea C (NGC DENV2) ke dalam vektor pcDNA3. Plasmid rekombinan tersebut diimunisasikan pada mencit Balb/c untuk dievaluasi derajat morbiditasnya serta dilakukan pemeriksaan kadar interferon (IFN)- γ . Hasil penelitian menunjukkan vaksin DNA yang mengkode gen NS3 utuh mampu memberikan proteksi pada mencit Balb/c serta

menginduksi respons imun seluler dengan produksi IFN- γ .¹¹

Protein NS3 mempunyai epitop yang dapat menginduksi respon imun seluler yaitu aktivasi sel limfosit T CD8⁺ dan limfosit T CD4⁺. Penelitian tentang epitop yang dapat menginduksi respon imun sel limfosit T CD4⁺ salah satunya adalah penelitian yang dilakukan oleh Okamoto *et al.* pada tahun 1998.¹² Penelitian ini didahului dengan pengambilan PBMC dari donor yang terinfeksi virus dengue. Lima klon sel limfosit T CD4⁺ yang khusus berikatan dengan HLA-DPw2 direaksikan dengan epitop *overlapping* berupa peptida sintesis yang didesain dari DENV-4. Hasil penelitian menunjukkan adanya epitop yang dapat mengenali dan memberikan respon terhadap 5 klon Limfosit T CD4⁺ yang khusus berikatan dengan HLA-DPw2 diantaranya epitop #3 pada posisi asam amino (213-227), #9A (243-257), #4 (251-265), #5 (258-272), #6 (266-280), #7 (273-287), #8 (281-295).¹² Penelitian oleh Kurane *et al.* pada tahun 1993 menunjukkan epitop dengan pada posisi amino 255-264 dapat dikenali dan menginduksi respon imun sel limfosit T CD4⁺ apabila epitop tersebut berikatan dengan HLADP-w2.¹³ Penelitian Zivny pada tahun 1995 menunjukkan epitop dengan urutan asam amino TPEGIPTL

pada posisi 500-508 dapat dikenali dan dapat menginduksi klon limfosit T CD8⁺ apabila epitop tersebut berikatan dengan HLA-B3501.¹⁴

Penelitian tentang protein NS3 yang dapat menimbulkan respon imun humoral diantaranya penelitian yang dilakukan Tan *et al* tahun 1990 menemukan adanya monoklonal antibodi yang ditimbulkan oleh respon imun terhadap protein NS3 dengue virus serotype 1 strain Hawaiian. Monoklonal antibodi tersebut disuntikkan pada mencit Balb/c. Hasil penelitian menunjukkan monoklonal antibodi tersebut mampu meningkatkan ketahanan mencit Balb/c ketika diinfeksi virus dengue serotype 1 strain Hawaiian dengan dosis yang mematikan.¹⁵

Penelitian Moreland *et al* tahun 2010 menunjukkan adanya antibodi monoklonal Fab 3F8 yang dapat mengenali epitop pada NS3 pada posisi 526 – 531 dengan urutan asam amino RGE₂XRK.¹⁶ Berdasarkan beberapa penelitian di atas, maka dilakukan penelitian untuk mempelajari karakteristik molekuler protein NS3 DENV-4 strain Indonesia, sehingga dapat dikembangkan vaksin DNA berbasis protein NS3 tersebut.

BAHAN DAN METODE

1. Penentuan serotipe IDS 96/10

Dilakukan terlebih dahulu isolasi RNA dari kultur virus IDS 96/10, penyiapan cDNA IDS 96/10 dengan transkripsi balik, kemudian dilakukan cek serotipe IDS 96/10.

2. Analisis karakteristik genetik NS3 IDS 96/10.

Dilakukan amplifikasi gen NS3 DENV-4 IDS 96/10 menggunakan primer *whole gen* dan primer *overlapping*. Hasil amplifikasi dikirimkan untuk dilakukan sekuensing. Pada hasil sekuensing dilakukan analisis homologi nukleotida, analisis filogenetik, analisis homologi asam amino dan analisis epitop.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan serotipe IDS 96/10

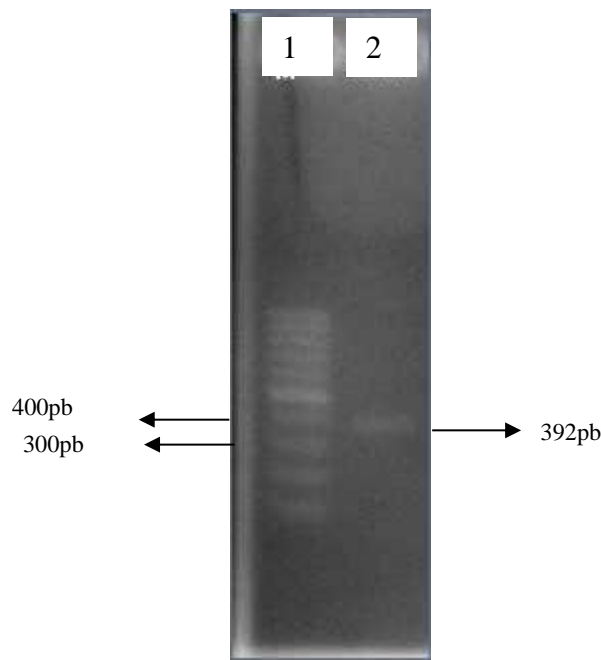
Penelitian diawali dengan isolasi RNA IDS96/10. RNA hasil isolasi kemudian disintesis menjadi cDNA dengan metode *reverse transcription*, kemudian cDNA tersebut di cek serotipenya dengan cara amplifikasi cDNA tersebut menggunakan metode Lanciotti *et al* tahun 1992 dengan menggunakan primer Lan D1 dan TS4 yang mengenali daerah antara capsid dan prM dari DENV-4. Visualisasi hasil amplifikasi cDNA menunjukkan pita DNA bermigrasi diantara petanda DNA 300 pb dan 400 pb

(392 pb). Hal ini menunjukkan bahwa pembuatan cDNA IDS 96/10 telah berhasil dan diduga IDS 96/10 adalah DENV-4.

Karakteristik gen NS3 DENV-4 IDS 96/10

a. Amplifikasi gen NS3 DENV-4 IDS 96/10 untuk sekuensing. Setelah mendapatkan cDNA DENV-4 IDS 96/10, selanjutnya dilakukan amplifikasi keseluruhan gen NS3.

Amplifikasi gen NS3 dengan menggunakan primer 4092sDEN4 dan 6572cDEN4 sehingga panjangnya berkisar 2480 pb. Setelah dilakukan amplifikasi, kemudian dianalisis dengan elektroforesis. Selanjutnya dielektroforesis didapatkan pita yang sejajar dengan marker Hind III dengan ukuran di atas 2322 pb (berkisar 2480 pb). Adanya pita yang berukuran 2480 pb tersebut menyatakan bahwa gen NS3 sudah berhasil diamplifikasi.



Gambar 1 Hasil Amplifikasi cDNA DENV-4 IDS 96/10 dengan Menggunakan Metode Lanciotti. Lajur 1. Marka 100pb; 2. DENV-4 IDS 96/10

b. Analisis nukleotida NS3 DENV-4 IDS 96/10. Hasil amplifikasi kemudian dilakukan sekuensing, kemudian hasil sekuensing-sekuensing dianalisis menggunakan *software* Genetyx 2.0 dan

Bioedit 7.0. Nukleotida hasil sekuensing menghasilkan runutan nukleotida gen NS2b, NS3 dan NS4a. Runutan nukleotida yang akan dianalisis adalah sekuen NS3.

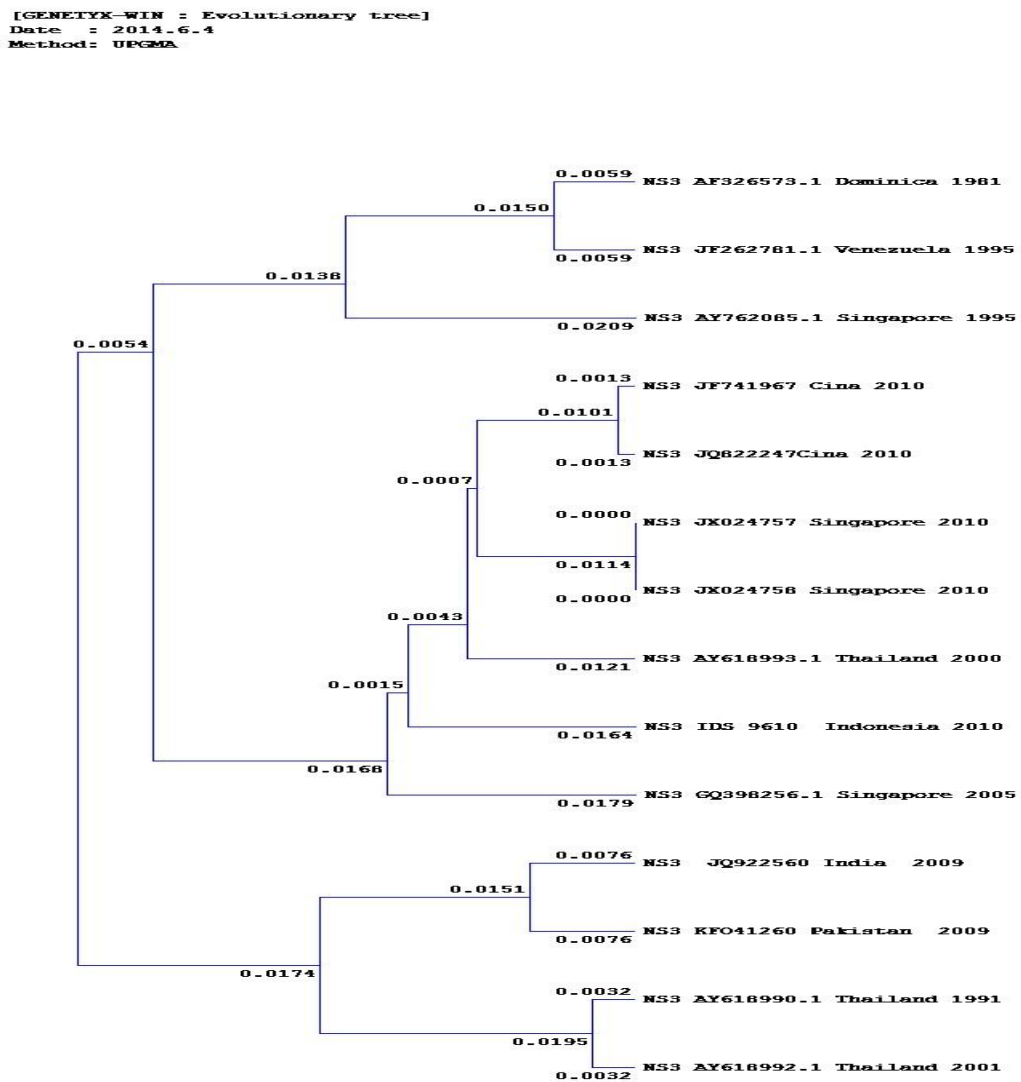
Sekuen NS3 DENV-4 IDS 96/10 diurutkan (*alignment*) dengan NS3 DENV-4 yang berasal dari negara lain menggunakan *software* Bioedit 7.0, untuk mengetahui tingkat homologi dan untuk mengetahui perubahan yang terjadi dari setiap isolat. Data strain DENV-4 yang diteliti dan strain negara lain yang diunduh dari GenBank.

c. Homologi nukleotida NS3 DENV-4 IDS 96/10. Hasil homologi nukleotida NS3 DENV-4 IDS 96/10 tertinggi dengan semua strain yang dibandingkan dengan persentase 97 % adalah dengan strain dari Thailand tahun 2000.

d. Analisis homologi asam amino. Sekuen asam amino diperoleh dengan mengkonversi sekuen nukleotida yang didapat sebelumnya.

Analisis filogenetik

Analisis filogenetik merupakan suatu analisis untuk mengetahui hubungan kekerabatan berdasarkan kemiripan dan perbedaan karakteristik genetik. Pada penelitian ini analisis filogenetik berdasarkan atas karakteristik nukleotida gen NS3 DENV-4 IDS 96/10 dibandingkan strain negara lain yang diunduh dari GenBank.



Gambar 2 Pohon Filogenetik dengan Metode Kimura-2 Parameter

Analisis filogenetik IDS 96/10 menurut gen NS3 yang dilakukan dalam penelitian ini digunakan metode kimura-2 parameter. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan metode UPGMA yang terdapat dalam *software Genetyx*. Hasil analisis filogenetik menunjukkan IDS 96/10 membentuk satu *clade* dengan strain yang berasal dari Cina (2010), Singapura (2010), dan Thailand (2000).

Dalam penelitian sebelumnya yang dilakukan Dewi, et al diketahui bahwa IDS 96/10 termasuk dalam genotipe II bersama strain yang berasal dari Dominica (1981), Jamaica(1983), Tahiti(1979,1985), Honduras(2007), Thailand(2000) dan strain lain dari Indonesia. Dari analisis filogenetik tersebut dapat dilihat strain yang diisolasi pada tahun yang sama membentuk *clade* yang sama yaitu strain

dari Cina tahun 2010, Singapura 2010 dan Indonesia 2010.

Analisis epitop

Pada penelitian ini dilakukan pensejajaran asam amino IDS 96/10 dengan asam amino NS3 strain lain yang terdapat pada GenBank. Penelitian Okamoto et al(1998) menunjukkan epitop *overlapping* yang dapat mengenali dan memberikan respon terhadap 5 klon limfosit T CD4⁺ yang khusus berikatan dengan HLA-DPw2 diantaranya epitop #3 pada posisi asam amino (213-227) , #9A(243-257), #4(251-265), #5(258-272), # 6(266-280),#7(273-287),#8(281-295). Hasil penelitian menunjukkan sekuen asam amino pada epitop #3, epitop #9A, epitop #4, epitop #5, epitop #6, epitop #7 sama pada semua sekuen strain NS3 yang dibandingkan. Dengan adanya epitop yang sama pada semua strain yang dibandingkan diharapkan klon sel limfosit T CD4⁺ yang merupakan respon imun terhadap epitop tersebut memiliki afinitas yang sama, sehingga pembuatan vaksin berdasarkan epitop ini dapat menjadi vaksin yang universal.

Pada epitop #8 (pada posisi asam amino 292) terdapat perbedaan asam amino antar strain. Pada posisi asam amino 292 terdapat asam amino sistein (C) pada strain dari Indonesia 2010 (strain yang diteliti), Thailand 2000, Singapura

2005, Singapura 2010 dan Cina 2010 sedangkan pada strain dari India 2009, Dominica 1981, Thailand 1991, Thailand 2001, Singapura 1995, Venezuela 1995, dan Pakistan 2009 terdapat asam amino yang berbeda yaitu asam amino serin (S). Perbedaan ini menjadi dasar pengembangan vaksin karena epitop virus dengue cenderung mengalami perubahan meskipun dalam satu negara yang sama. Contohnya di negara Singapura, asam amino pada epitop #8 berbeda antara strain yang diisolasi pada tahun 1995 dengan strain yang diisolasi pada tahun 2005 dan 2010. Perbedaan ini mungkin akan menyebabkan perbedaan afinitas sel limfosit T CD4⁺ sehingga diperlukan vaksin yang berbeda. Hal ini juga menjadi dasar perlunya dikembangkan vaksin dengue secara terus menerus yang khusus untuk isolat dari Indonesia karena vaksin yang dikembangkan di negara lain belum tentu dapat menanggulangi infeksi dengue yang terjadi di Indonesia. Hal ini berkaitan dengan epitop dan pengenalan oleh sel TCD4⁺ yang berbeda.

Penelitian yang lainnya dilakukan oleh Kurane et al.(1993), penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi HLA yang berikatan dengan epitop (posisi asam amino 255-264) yang dapat mengaktivasi sel limfosit T CD4⁺ . HLADP pada donor pada penelitian ini adalah HLA DPA1* 01,

HLADPB1*0201, secara serologis didefinisikan sebagai HLADPw2.¹³ Pada penelitian ini epitop pada posisi asam amino 255-264 *conserve* pada semua strain yang diteliti dan pada semua strain dari berbagai negara yang dibandingkan. Jadi dapat disimpulkan HLADPw2 dapat mengikat epitop pada posisi asam amino 255-264 pada strain yang diteliti dan pada semua strain dari berbagai negara yang dibandingkan dan ikatan epitop dan HLADPw2 tersebut dapat mengaktivasi sel limfosit TCD4⁺.

Penelitian epitop yang dikenali oleh limfosit T CD8⁺ diantaranya penelitian oleh Zivny tahun 1995. Penelitian ini menunjukkan epitop TPEGIPTL pada posisi 500-508 dapat dikenali dan dapat menginduksi klon limfosit T CD8⁺ apabila epitop tersebut berikatan dengan HLA-B3501. Epitop tersebut dapat dikenali oleh berbagai klon sel limfosit T dari serotipe virus dengue berbeda.¹⁴ Pada penelitian ini terdapat epitop dengan urutan asam amino yang sama. Urutan asam amino tersebut identik pada semua strain yang dibandingkan, artinya epitop tersebut bersifat *conserve* pada semua strain yang dibandingkan dan dapat dijadikan dasar untuk pembuatan vaksin universal.

Penelitian epitop yang dapat mengenali limfosit B dilakukan oleh

Moreland et al. Antibodi monoklonal pada penelitian ini adalah antibodi monoklonal Fab3F8. Antibodi monoklonal tersebut mengenali epitop pada posisi 526 – 531 yaitu RGE_xRK. Posisi asam amino 526 – 531 adalah domain III Helikase yang mempunyai fungsi untuk replikasi virus. Inhibisi oleh antibodi monoklonal Fab3F8 dapat menurunkan replikasi virus. Pada penelitian ini x adalah asam amino Q. Urutan asam amino tersebut sama pada semua strain yang dibandingkan artinya epitop tersebut bersifat *conserve* dan dijadikan dasar pembuatan vaksin universal.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini telah didapatkan ampikon gen NS3 DENV-4 IDS 96/10 berukuran 1854 pb. Data hasil sekuen selanjutnya digunakan untuk analisis filogenetik dan analisis epitop. Hasil analisis filogenetik menunjukkan IDS 96/10 membentuk satu *clade* dengan strain yang berasal dari Cina (2010), Singapura (2010) dan Thailand (2000). Analisis epitop menunjukkan gen NS3 DENV-4 IDS 96/10 memiliki epitop yang dapat dikenali sel limfosit T CD4⁺ pada posisi asam amino (213-227) , (243-257), (251-265), (258-272), (266-280), (273-287), epitop-epitop tersebut bersifat lestari (*conserve*) pada semua gen NS3 di dunia

yang dibandingkan. Pada epitop #8 (pada posisi asam amino 292) terdapat perbedaan asam amino antar strain yang diteliti. Pada posisi asam amino 292 terdapat asam amino sistein (C) pada strain dari Indonesia 2010 (strain yang diteliti), Thailand 2000, Singapura 2005, Singapura 2010, dan Cina 2010 sedangkan pada strain dari India 2009, Dominica 1981, Thailand 1991, Thailand 2001, Singapura 1995, Venezuela 1995, dan Pakistan 2009 terdapat asam amino yang berbeda yaitu asam amino serin (S). Analisis epitop juga menunjukkan gen NS3 DENV-4 IDS 96/10 memiliki epitop yang dapat dikenali oleh sel T CD8⁺ pada posisi 500-508 yang bersifat *conserve* pada semua negara yang dibandingkan. Analisis epitop juga menunjukkan bahwa gen NS3 DENV-4 IDS 96/10 memiliki epitop yang dapat dikenali oleh limfosit B yaitu pada posisi asam amino 526-531.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization (WHO). *Dengue Guideline for diagnosis, treatment, prevention and control*. Ed 2nd. 2009.
2. Pusat data dan Surveilans Epidemiologi Kementrian Kesehatan RI. *Demam Berdarah Dengue*. Jakarta.2010.
3. Liedenbach B.D, Thiel H.J, Rice C.M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. Fundamental virology. 5rd ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2007: 589 – 639.
4. Perera R & Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr op Microbiol*. 2008; 11(4): 369-377.
5. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia Direktorat Jenderal Pengendalian penyakit dan penyehatan lingkungan. *Modul pengendalian Demam Berdarah Dengue*. Jakarta. 2011
6. Murphy B.R & Whitehead S.S. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. *Ann Rev of Immunologi*. 2011; 29:587–619.
7. Schmitz J, Rohrig J, Barret A, Hombach J. Next generation dengue vaccines: A review of candidates in preclinical development. *Vaccine*. 2011; 29 : 7276–84
8. Ishikawa T, Yamanaka A, Konishi E. A Review of succesful flavivirus vaccines and the problem with those flavivirus for which vaccines are not yet available. *Vaccine*. 2014; 12: 1-11
9. Liu M.A. DNA Vaccine a review. *J. int med*. 2003; 253: 402 -410.
10. Mateen I, Saba I. A review on DNA vaccines. *J of Health Sci*. 2011; 1(1):1-7.
11. Costa S.M, Yorio A.P, Goncalves A.J.S, Vidale M.M, Costa E.C.B, Borges R.M

- et al. Induction of a Protective Response in Mice by the Dengue Virus NS3 Protein using DNA Vaccine. *Plos one*. 2011; 6 (10): e25685.
12. Okamoto Y, Kurane I, Loporati AM, Ennis F.A. Definition of the Region on NS3 which Contains Multiple Epitopes Recognized by Dengue Virus Serotype-Cross-Reactive and Flavivirus-cross-reactive, HLA-DPw2-restricted CD4⁺ T cell clones. *J. Virol*. 1998; 79: 697-704.
 13. Kurane I, Dai LC, Livingston PG, Reed E, Ennis F.A. Definition of an HLA-DPw2-restricted epitope on NS3, recognized by a dengue virus serotype-cross-reactive human CD4⁺ CD8-cytotoxic T-cell clone. *J. Virol*. 1993; 67 (10): 6285.
 14. Zivny J, Kurane I, Loporati AM, Ibe M, Takiguchi M, Zeng L et al. A Single Nine-amino acid Peptide Induces Virus-specific, CD8 + Human Cytotoxic T Lymphocyte Clones of Heterogeneous Serotype Specificities. *J. Exp. Med*. 1995; 182: 853-63.
 15. Tan C.H.C, Yap E.H, Singh M, Deubel V, Chan YC. Passive Protection Studies in Mice with Monoclonal Antibodies Directed Against the Nonstructural Protein NS3 of Dengue 1 Virus. *J. Virol*. 1990; 71:745-748
 16. Moreland NJ, Tay MYF, Lim E, Paradkar PN, Doan DNP. High Affinity Human Antibody Fragments to Dengue Virus Non-Structural Protein 3. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(11): e881