

Strategi Pengembangan Vaksin Dengue

Paisal¹ dan Subangkit²

Pusat Biomedis & Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes, Kemenkes RI.
email: bangkit_27@yahoo.com

Abstract

Dengue fever is a disease endemic in Indonesia. The disease is caused by dengue virus serotypes DENV1, DENV2, DENV3, and DENV4. One way to control the disease is dengue vaccine discovery. This review based on the study of literatures that showed currently several strategies for dengue vaccine development are live attenuated vaccine, subunit vaccines, and DNA vaccines. Dengue vaccine development still face challenges, especially the formulation of vaccines that can trigger an immune response against all four serotypes and the absence of a suitable experimental animal. From all the existing strategies, the promising strategy is live attenuated vaccines using recombinant inter-flavivirus.

Key words: *Dengue fever, Dengue virus, Vaccine*

Abstrak

Penyakit demam berdarah merupakan penyakit endemis di Indonesia. Penyakit ini disebabkan oleh virus dengue yang terdiri dari serotipe DENV1, DENV2, DENV3, dan DENV4. Salah satu cara yang diharapkan dapat mengendalikan penyakit dengue adalah penemuan vaksin. Kajian makalah ini berdasarkan studi literatur. Hasil kajian menunjukkan beberapa strategi pengembangan vaksin untuk dengue saat ini adalah vaksin hidup dilemahkan (*live attenuated vaccine*), vaksin subunit, dan vaksin DNA. Strategi pengembangan vaksin masih menghadapi tantangan terutama formulasi vaksin yang dapat memicu respon imun seimbang terhadap keempat serotipe dan belum adanya hewan coba yang cocok. Strategi yang paling menjanjikan adalah vaksin hidup dilemahkan menggunakan metode rekombinan antar-flavivirus.

Kata kunci: *Demam Berdarah, Virus Dengue, Vaksin*

Pendahuluan

Penyakit demam berdarah merupakan salah satu penyakit endemis di Indonesia. Penyakit ini pertama kali dilaporkan terjadi Jakarta dan Surabaya pada tahun 1968, 15 tahun setelah kasus pertama di Filipina. Selama wabah tersebut, ditemukan 58 kasus klinis dengan jumlah kematian 24 kasus. Tahun berikutnya kasus meningkat menjadi 167 dengan kematian 40 orang.¹ Sejak saat itu, insiden demam berdarah terus meningkat dan daerah yang terkena semakin banyak.² Pada tahun 2008 kasus demam berdarah dengue di Indonesia mencapai 137,469 kasus dengan angka kematian 1,187. Sedangkan pada tahun 2009, terjadi peningkatan jumlah kasus dan kematian yaitu berturut-turut 154,855 dan 1,384.³

Penyakit demam berdarah disebabkan oleh virus dengue. Virus ini termasuk ke dalam genus *Flavivirus* dan famili *Flaviviridae*. Virus lain yang termasuk ke dalam genus *Flavivirus* antara lain adalah, *Japanese Encephalitis Virus* (JEV), *Tick-Borne Encephalitis Virus* (TBEV), *West Nile Virus* (WNV), dan *Yellow Fever Virus* (YFV).⁴

Virus dengue berbentuk sferis dengan diameter sekitar 50 nm.⁵ Pada permukaannya terdapat protein E (selubung) dan protein M (membran), sedangkan bagian dalamnya terdapat protein C (kapsid). Protein C berbentuk ikosahedral berdiameter kurang lebih 30 nm,⁶ berfungsi membungkus materi genetik virus.

Materi genetik virus dengue terdiri dari RNA untai positif berukuran sekitar 11 kb dengan satu *open reading frame*. Materi genetik ini ditranslasi menjadi satu poliprotein berukuran 3391 asam amino,⁷ yang kemudian di potong-potong oleh protease menjadi tiga protein struktural (protein E, prM, dan C) dan tujuh protein non struktural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5).⁸

Secara antigenik, virus dengue dibagi menjadi empat serotipe, yaitu DENV 1, DENV 2, DEN 3, dan DENV 4.⁹ Keempat serotipe ini mempunyai perbedaan asam amino pada protein selubung (*envelope*) sekitar 25 sampai 40 persen dan perbedaan pada nukleotida dan asam amino genotipnya berturut-turut 6% dan 3%.¹⁰ Karena adanya perbedaan serotipe, maka dapat terjadi infeksi primer dan infeksi sekunder. Infeksi primer adalah infeksi virus dengue dari serotipe apapun untuk pertama kalinya. Sedangkan infeksi sekunder adalah infeksi virus dengue pada individu yang sama dari serotipe berbeda.

Infeksi salah satu serotipe akan mencetuskan kekebalan jangka panjang terhadap serotipe bersangkutan. Tetapi kekebalan tersebut hanya bertahan beberapa bulan terhadap infeksi virus dengue serotipe lainnya.¹¹ Penelitian menunjukkan bahwa infeksi serotipe berlainan juga dapat menyebabkan munculnya gejala klinis lebih berat, yang diduga terjadi melalui mekanisme ADE (*Antibody Dependent Enhancing*).¹² ADE adalah fenomena dimana antibodi yang terbentuk terhadap serotipe sebelumnya, justru meningkatkan kemampuan virus untuk masuk ke dalam sel inang pada infeksi berikutnya dengan serotipe berbeda.¹³

Gejala klinis infeksi virus dengue mulai dari asimtomatik, demam dengue, sampai dengan demam berdarah dengue. Pada demam berdarah dengue dapat ditemukan tes tourniquet positif, petekchie, epistaksis, atau hematemesis. Patogenesis

terjadinya perdarahan adalah karena adanya vaskulopati, trombositopenia, disfungsi trombosit, dan koagulopati.¹⁴

Saat ini belum ditemukan pengobatan spesifik untuk penyakit dengue. Langkah yang banyak dilakukan adalah pengendalian vektor, yaitu nyamuk atau jentik *Aedes* baik *A. aegypti* maupun *A. albopictus*. Sayangnya, pengendalian vektor sulit dilakukan dan sering mengalami kegagalan.¹⁵ Cara lain untuk menghadapi infeksi dengue yang adalah dengan penemuan vaksin dengue. Usaha pencarian vaksin telah dilakukan sejak tahun 1940an,¹⁶ sampai saat ini strategi yang mengalami kemajuan pesat saat ini adalah vaksin hidup dilemahkan menggunakan metode rekombinan antar-flavivirus.

Kendala utama dalam pengembangan vaksin adalah sulitnya mencari formulasi yang sesuai yang dapat mencetuskan respon imun tubuh secara seimbang terhadap keempat serotipe virus dengue.¹⁷ Jika respon imun tidak seimbang, dikhawatirkan dapat timbul gejala demam berdarah yang lebih parah akibat paparan virus dengue di kemudian hari. Kendala lain dari pengembangan vaksin adalah tidak adanya hewan model yang cocok, yang dapat menimbulkan manifestasi penyakit seperti halnya pada manusia.¹⁸

Pada tulisan ini, kami akan memaparkan beberapa strategi pengembangan vaksin dengue. Tujuannya adalah agar dapat menjadi sumber informasi untuk pencarian dan pengembangan metode-metode baru pembuatan vaksin dengue.

Metode

Perkembangan strategi vaksin dengue terkini diamati dengan melakukan studi literatur.

Hasil

Dari studi literatur didapatkan beberapa metode pengembangan vaksin dengue dengan pendekatan metode vaksin hidup yang dilemahkan (*live attenuated*); Metode delesi dan rekombinan antar-serotipe; Metode Rekombinan antar-flavivirus; Vaksin Subunit dan Vaksin DNA yang mempunyai kelebihan masing-masing-masing.

Pembahasan

Vaksin hidup dilemahkan (*Live Attenuated Vaccine*)

Metode serial passage

Prinsip metode serial passage adalah terjadinya mutasi akibat dari kultur yang berulang-ulang. Mutasi tersebut menyebabkan virus mengalami atenuasi dan tidak infeksius lagi. Metode serial passage diterapkan oleh Sabin dan Schlesinger pada tahun 1945. Sabin membiakkan secara berulang virus DEN-1 menggunakan otak mencit. Sukarelawan yang mendapatkan vaksin tersebut, hanya mengalami gejala dengue yang ringan.¹⁶ Tetapi, vaksin ini dihentikan pengembangannya karena masalah kemurnian vaksin akibat penggunaan otak mencit sebagai media kultur.¹⁹

Metode serial passage juga dilakukan oleh para peneliti dari Universitas Mahidol Thailand pada tahun 1980-an. Berbeda dengan Sabin yang menggunakan otak mencit, vaksin ini menggunakan sel *Primary Dog Kidney* (PDK) untuk mengatenuasi DEN1, DEN2, dan DEN4, dan sel *Primary African Green Monkey Kidney* (PGMK) untuk mengatenuasi DEN3.²⁰ Pada pengujian monovalen, bivalen, dan trivalen, vaksin ini memberikan serokonversi 90-100%. Tetapi, pada pengujian formulasi tetravalen, timbul reaktogenitas yang cukup signifikan.²¹ Vaksin ini dihentikan, selain karena timbulnya reaksi

reaktogenitas, juga karena adanya kesulitan formulasi terutama untuk komponen DENV 3.¹⁷

Hampir bersamaan dengan Universitas Mahidol, *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR) Amerika Serikat juga melakukan serial passage virus dengue pada sel PDK. Pada uji coba, respon antibodi netralisasi pada dua kali pemberian berselang 6 bulan hanya 36-63%.²²

Metode delesi dan rekombinan antar-serotipe

Mutasi acak yang terjadi pada serial passage pada pengembangan vaksin sebelumnya ternyata tidak memberikan hasil memuaskan. Seiring dengan berkembangnya teknologi biologi molekuler, dimana seorang peneliti dapat melakukan perubahan pada DNA, maka atenuasi virus dengue dilakukan dengan cara mutasi pada bagian tertentu cDNA virus dengue.

NIAID, NIH, Bethesda, Maryland melakukan mutasi delesi pada segmen 3'-UTR of DENV4, tepatnya pada nukleotida 172-143 (30 nukleotida), sehingga dikenal juga sebagai $\Delta 30$ (rDEN4 $\Delta 30$).²³ Hasil mutasi ini ternyata mampu mengatenuasi perkembangan virus. Mengikuti keberhasilan pada DEN4, dilakukan juga mutasi delesi pada DEN1 sehingga diperoleh virus DEN1 $\Delta 30$.²⁴ Virus rekombinan ini juga ternyata mengalami atenuasi sama baiknya dengan DEN4 $\Delta 30$. Tetapi kesuksesan ini tidak terjadi pada serotipe DEN2 dan DEN3. DEN2 $\Delta 30$ tidak teratenuasi dengan baik dan DEN3 $\Delta 30$ gagal mengalami atenuasi. Oleh karena itu diambil jalan keluar dengan membuat virus chimera, yaitu protein struktural prM dan E DEN2 dan DEN3 dimasukkan ke backbone DEN4 $\Delta 30$ sehingga dihasilkan DEN2/4 $\Delta 30$ ²⁵ dan DEN3/4 $\Delta 30$ ²⁶. Pada uji klinik fase 1, rDEN4Delta30-4995 yang merupakan derivatif dari DEN4 $\Delta 30$ terbukti aman,

teratenuasi dengan baik, dan immunogenik. Walaupun terjadi reaksi eritematosa lokal pada tempat injeksi pada beberapa sukarelawan.²⁷

Metode Rekombinan antar-flavivirus

Selain vaksin rekombinan menggunakan backbone virus dengue, Sanofi Pasteur juga mengembangkan vaksin menggunakan backbone vaksin yellow fever 17D. Vaksin yellow fever 17D merupakan salah satu vaksin flavivirus yang paling efektif dan aman, serta telah digunakan secara luas.²⁸ Bagian struktural prM dan E dari backbone yellow fever 17D diganti dengan prM dan E dari DEN 1 – 4. Pada percobaan preklinik dan, vaksin CYD-TDV (Sanofi Pasteur CYD *Tetravalent Dengue Vaccine*) menginduksi stimulasi sel dendritik dan memunculkan imun respon yang signifikan pada primata non-manusia. Sedangkan pada percobaan klinik menggunakan 6000 orang anak-anak dan dewasa, tiga dosis vaksin mampu mencetuskan respon imun untuk keempat serotipe tanpa ada masalah keamanan yang berarti.²⁹ Demikian pula pada percobaan klinik fase IIb pada 4002 pasien, vaksin CYD TDV dapat ditoleransi dengan baik tanpa adanya masalah keamanan selama 2 tahun setelah pemberian.³⁰

Vaksin Subunit

Vaksin subunit umumnya menggunakan protein struktural yaitu prM dan E. Protein ini dibuat dari berbagai macam sistem ekspresi seperti baculovirus, yeast, *Escherichia coli*, *Vaccinia virus*, dan sel mamalia.³¹ Keuntungan dari vaksin subunit adalah reaktogenitas lebih rendah. Sedangkan kelemahannya adalah kurang mampu mencetuskan respon imun seluler.

Coller BA dkk,³² dengan menggunakan sistem ekspresi sel *Drosophila S2* berhasil mendapatkan vaksin potongan protein E dengue (DEN-80E). Pada percobaan, vaksin ini mampu mencetuskan respon antibodi netralisasi yang tinggi dan

menunjukkan kemampuan proteksi baik pada mencit maupun primata non-manusia. Selain itu, formulasi tetravalen tidak menunjukkan interferensi antar antigen DEN-80E. Vaksin ini dipertimbangkan untuk dilanjutkan ke uji klinik.

Yang J dkk,³³ dengan menggunakan *Escherichia coli*, berhasil mendapatkan protein E Domain III DENV 2 (EDIII). Pada percobaan menggunakan mencit BALB/c dan C57BL/6, protein EDIII mampu mencetuskan antibodi netralisasi cukup tinggi dan menunjukkan proteksi silang yang rendah terhadap infeksi DENV 1. Selain itu, antibodi terhadap EDIII juga dapat melindungi mencit dari paparan virus dengue secara *in vivo*.

Vaksin DNA

Vaksin DNA menggunakan gen prM dan E yang diinsersikan ke dalam plasmid yang berfungsi sebagai vektor. Plasmid kemudian diinjeksikan ke dalam kulit, subkutan, atau otot. Ditempat tersebut plasmid akan mengekspresikan protein prM dan protein E.

Vaksin DNA mempunyai beberapa keuntungan, antara lain dapat menginduksi respon imun humoral dan seluler seperti halnya vaksin hidup dilemahkan. Selain itu, relatif lebih murah, stabilitas lebih baik terhadap suhu, dan dapat disimpan lebih lama.³¹

Konishi E dkk,³⁴ mengembangkan vaksin DNA tetravalen yang terdiri dari plasmid yang mengekspresikan protein prM dan E. Pada percobaan menggunakan mencit BALB/c yang diimunisasi sebanyak dua kali menggunakan *needle-free jet injector*, mampu mencetuskan antibodi netralisasi terhadap semua serotipe. Tidak ditemukan interferensi antar keempat serotipe.

Dari berbagai jenis vaksin yang telah diuraikan, masing-masing mempunyai perbedaan dalam mencetuskan respon

imun. Pada vaksin hidup dilemahkan, respon imun terjadi terhadap banyak epitop, sedangkan pada vaksin subunit, respon imun hanya terjadi terhadap beberapa epitop. Berbeda halnya dengan vaksin DNA. Vaksin ini diharapkan mampu mengekspresikan protein yang dikodenyakan pada sel inang, sehingga timbul respon imun terhadap protein tersebut.

Beberapa vaksin hidup dilemahkan telah memasuki uji klinik fase 2 dan 3. Vaksin subunit masih menemui kendala berarti yaitu kurang mampu mencetuskan respon imun, terutama dalam jangka panjang. Vaksin DNA masih terus dikembangkan dan cukup menjanjikan, terutama dalam hal kemampuan mencetuskan respon imun seimbang bagi keempat serotipe.

Kesimpulan

Pengembangan vaksin yang mengalami kemajuan pesat saat ini adalah vaksin hidup dilemahkan menggunakan metode rekombinan antar-flavivirus.

Saran

Pengendalian penyakit dengue, masih diperlukan mengingat masih banyaknya kasus dengue terutama di Negara-negara tropis. Untuk itu pengembangan vaksin dengue masih terbuka lebar dikarenakan masih belum ditemukannya vaksin yang efektif

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Dra. Beti Ernawati dewi, Ph.D selaku Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah telah membantu dalam diskusi dan arahan artikel ini serta Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si, Apt selaku Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah memberikan dorongan dalam penulisan artikel ini. Terima kasih juga diucapkan kepada seluruh rekan

laboratorium virology Pusat Biomedis dan Teknologi dasar Kesehatan.

Daftar Rujukan

1. Soedarmo SP. The epidemiology, prevention and control of dengue hemorrhagic fever in Indonesia. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi*. 1994 Dec;10 Suppl:S109-12.
2. Suroso T, Achmad H, Imran A. Dengue Haemorrhagic Fever Outbreaks in Indonesia 1997-1998. *Den Bulletin*. 1998;22:45-50.
3. Departemen Kesehatan RI. Data kasus DBD per bulan di Indonesia tahun 2010, 2009, dan 2008. Jakarta. 2010.
4. Lidenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology Fifth Edition*. Boston: Lippincott Williams & Wilkins, 2007; p. 1101-1151
5. Smith TJ, Brandt WE, Swanson JL, McCown JM, Buescher EL. Physical and biological properties of dengue-2 virus and associated antigens. *J Virol*. 1970 Apr;5(4):524-32.
6. Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Indian J Dermatol*. 2010;55(1):68-78.
7. Deubel V, Kinney RM, Trent DW. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype: comparative analysis of the full-length genome. *Virology*. 1988 Jul;165(1):234-44.
8. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 1990, 3: 376-396
9. Russell PK, Nisalak A. Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test. *J Immunol* 1967;99:291-6.
10. Shrestha B, Brien JD, Sukopolvi-Petty S, Austin SK, Edeling MA, et al. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous

- genotypes of dengue virus type 1. *PLoS Pathog.* 2010 Apr 1;6(4):e1000823.
11. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* 2004 Apr;113(7):946-51.
 12. Morens DM. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis.* 1994 Sep;19(3):500-12.
 13. Cummings DA, Schwartz IB, Billings L, Shaw LB, Burke DS. Dynamic effects of antibody-dependent enhancement on the fitness of viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 18;102(42):15259-64.
 14. Chuansumrit A, Tangnararatchakit K. Pathophysiology and management of dengue hemorrhagic fever. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine.* 2006; 8 (Suppl 1): 3-11.
 15. Ooi EE, Goh KT, Gubler DJ. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. *Emerg Infect Dis.* 2006 Jun;12(6):887-93.
 16. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1952 Jan;1(1):30-50.
 17. Kitchener S, Nissen M, Nasveld P, Forrat R, Yoksan S, Lang J, Saluzzo JF. Immunogenicity and safety of two live-attenuated tetravalent dengue vaccine formulations in healthy Australian adults. *Vaccine.* 2006 Feb 27;24(9):1238-41.
 18. Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses.* 2012 Jan;4(1):62-82.
 19. Raviprakash K, Defang G, Burgess T, Porter K. Advances in dengue vaccine development. *Hum Vaccin.* 2009 Aug;5(8):520-8.
 20. Bhamarapravati N, Sutee Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine.* 2000 May 26;18 Suppl 2:44-7.
 21. Kanesa-thasan N, Sun W, Kim-Ahn G, Van Albert S, Putnak JR, King A, Raengsakulrach B, et al. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine.* 2001 Apr 30;19(23-24):3179-88.
 22. Sun W, Cunningham D, Wasserman SS, Perry J, Putnak JR, Eckels KH, Vaughn DW, et al. Phase 2 clinical trial of three formulations of tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naïve adults. *Hum Vaccin.* 2009 Jan-Feb;5(1):33-40.
 23. Durbin AP, Whitehead SS, McArthur J, Perreault JR, Blaney JE Jr, Thumar B, Murphy BR, et al. rDEN4delta30, a live attenuated dengue virus type 4 vaccine candidate, is safe, immunogenic, and highly infectious in healthy adult volunteers. *J Infect Dis.* 2005 Mar 1;191(5):710-8.
 24. Durbin AP, Whitehead SS, Shaffer D, Elwood D, Wanionek K, Thumar B, Blaney JE, et al. A single dose of the DENV-1 candidate vaccine rDEN1Δ30 is strongly immunogenic and induces resistance to a second dose in a randomized trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Aug;5(8):e1267.
 25. Durbin AP, McArthur JH, Marron JA, Blaney JE, Thumar B, Wanionek K, Murphy BR, et al. rDEN2/4Delta30(ME), a live attenuated chimeric dengue serotype 2 vaccine is safe and highly immunogenic in healthy dengue-naïve adults. *Hum Vaccin.* 2006 Nov-Dec;2(6):255-60.
 26. Blaney JE Jr, Hanson CT, Firestone CY, Hanley KA, Murphy BR, Whitehead SS. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Dec;71(6):811-21.
 27. Wright PF, Durbin AP, Whitehead SS, Ikizler MR, Henderson S, Blaney JE, Thumar B, et al. Phase 1 trial of the dengue virus type 4 vaccine candidate rDEN4{Delta}30-4995 in healthy adult volunteers. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Nov;81(5):834-41.

-
- ²⁸. Mudd PA, Piaskowski SM, Neves PC, Rudersdorf R, Kolar HL, Eernisse CM, Weisgrau KL, et al. The live-attenuated yellow fever vaccine 17D induces broad and potent T cell responses against several viral proteins in Indian rhesus macaques--implications for recombinant vaccine design. *Immunogenetics*. 2010 Sep;62(9):593-600.
- ²⁹. Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*. 2011 Sep 23;29(42):7229-41.
- ³⁰. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2012 Nov 3;380(9853):1559-67.
- ³¹. Durbin AP, Whitehead SS. Dengue vaccine candidates in development. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;338:129-43.
- ³². Collier BA, Clements DE, Bett AJ, Sagar SL, Ter Meulen JH. The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease. *Vaccine*. 2011 Sep 23;29(42):7267-75.
- ³³. Yang J, Zhang J, Chen W, Hu Z, Zhu J, Fang X, Yuan W, et al. Eliciting cross-neutralizing antibodies in mice challenged with a dengue virus envelope domain III expressed in *Escherichia coli*. *Can J Microbiol*. 2012 Apr;58(4):369-80.
- ³⁴. Konishi E, Kosugi S, Imoto J. Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. *Vaccine*. 2006 Mar 15;24(12):2200-7.