

Imunogenisitas kandidat vaksin DNA Rekombinan dengan Gen Inseri Premembran dan Envelope Virus Dengue tipe 2 pada Mencit = Immunogenicity of Recombinant DNA vaccine candidate using Premembrane and Envelope Genes of Dengue Virus type 2 in mice

Rina Yunita, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20329937&lokasi=lokal>

Abstrak

ABSTRAK

Latar Belakang : Penyakit demam dengue dan demam berdarah dengue yang disebabkan oleh virus dengue masih menjadi masalah kesehatan di dunia. Hingga saat ini pengobatan spesifik serta vaksin untuk infeksi dengue belum tersedia, dan berbagai strategi pembuatan vaksin sedang dikembangkan oleh berbagai pihak. Sebagai salah satu negara endemis infeksi dengue, Indonesia juga perlu melakukan pengembangan vaksin dengue dengan menggunakan strain virus yang berasal dari Indonesia. Pada penelitian ini akan dikembangkan kandidat vaksin DNA rekombinan dengan gen inseri Premembran dan Envelope virus dengue tipe 2 sebagai bagian dari pengembangan vaksin dengue tetravalen di Indonesia.

Metode : Plasmid DNA rekombinan dirancang mengandung gen premembran dan envelope dari virus dengue tipe 2 isolat Indonesia. Fragmen DNA diinsersi ke dalam vektor plasmid pUMVC4a serta ditransformasi ke dalam sel E.coli DH5-#945;. Klon plasmid yang didapat dikonfirmasi dengan metode PCR, enzim restriksi dan sekuensing. Ekspresi protein dari plasmid diuji melalui metode transfeksi pada sel Vero. Selanjutnya plasmid disuntikkan pada mencit jenis Balb/C sebanyak 3 kali dengan interval 3 minggu pada daerah intramuskular. Penyuntikan menggunakan 2 metode : suntikan intramuskular dengan jarum (IM) dan suntikan dengan menggunakan alat needle-free injector (NFI) dengan menggunakan 2 macam dosis plasmid, yaitu 25 #956;g dan 100 #956;g DNA. Pemeriksaan antibodi dilakukan dengan metode ELISA dan PRNT. Setelah fase imunisasi selesai, dilakukan uji tantang dengan menyuntikkan 2,5 x 10⁵ PFU/ml DENV-2 secara intraperitoneal pada beberapa kelompok mencit untuk melihat pembentukan sel B memori. Data antibodi yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan analitik.

Hasil : Plasmid rekombinan pUMD2 telah berhasil diperoleh. Transfeksi pada sel Vero menunjukkan adanya ekspresi protein intra dan ekstraselular melalui pemeriksaan imunostaining dan ELISA. Melalui pemeriksaan ELISA, antibodi terdeteksi hanya pada kelompok penyuntikan NFI (p<0,005). Titer antibodi tertinggi dijumpai pada kelompok penyuntikan dengan NFI dosis 100 #956;g, kemudian NFI 25 #956;g dengan perbedaan yang tidak bermakna (p>0,005) antara kedua kelompok tersebut. Melalui PRNT 70% ditemukan bahwa antibodi netralisasi terhadap DENV-2 terbentuk pada mencit yang diberi imunisasi dengan metode NFI, sedangkan pada kelompok IM titernya tidak terdeteksi (<1/10). Titer antibodi terbaik diperoleh pada kelompok penyuntikan NFI dosis 100 ug yaitu 1/80-1/160. Titer hari ke-4 dan 8 setelah penyuntikan 2,5 x 10⁵ PFU/ml virus pada kelompok yang diimunisasi secara IM dan NFI mengalami peningkatan. Sebaliknya, pada kelompok yang tidak diberi virus tidak terdapat peningkatan titer netralisasi. Hal ini menunjukkan adanya pembentukan sel B memori dari imunisasi yang diberikan.

Kesimpulan : Pembuatan plasmid rekombinan dengan gen inseri pre-M dan E DENV2 strain DS18/09 telah berhasil dilakukan. Terdapat respon antibodi netralisasi dan anamnestic dari mencit yang diberi imunisasi secara NFI, namun imunisasi secara IM hanya menunjukkan respon antibodi anamnestic dari sel memori.

Plasmid DNA rekombinan ini memiliki potensi sebagai kandidat vaksin DNA terhadap virus dengue tipe 2. Perlu dilakukan penelitian selanjutnya berupa rancangan vaksin tetravalen dalam upaya pengembangan vaksin dengue secara menyeluruh.

<hr>

ABSTRACT

Introduction : Dengue fever and dengue haemorrhagic fever caused by dengue virus is still a major health problem. There are four types of Dengue virus which antigenically distinguished : DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4. Currently, no specific treatment for Dengue infection and no vaccine are available, and various strategies have been used to develop dengue vaccine. Indonesia as one of dengue-endemic country has to attempt dengue vaccine development particularly using Indonesian virus strain. In this study, recombinant DNA vaccine candidate using DENV-2 pre-membrane and envelope genes was constructed as a part of dengue tetravalent vaccine development in Indonesia.

Methods : The recombinant plasmid consisting pre-membrane and envelope genes from DENV-2 Indonesia isolate was constructed. DNA fragment were inserted to pUMVC4a plasmid vector and then transformed to E. Coli DH5- α . The construction was confirmed using PCR, restriction enzyme and sequencing. Protein expressions of preM and E were determined by transfection into Vero cells. Group of Balb/C mice were injected with amount of plasmid via intra muscular route. The injection was conducted using 2 delivery methods : conventional syringe-needle (IM) and needle-free injector (NFI) device. Doses of plasmid that being compared are 25 μ g and 100 μ g. Mice were immunized with plasmid 3 times with 3 weeks interval. Antibody titre were determined by ELISA and PRNT. After immunization phase, part group of mice challenged with $2,5 \times 10^5$ PFU/ml DENV-2 intra peritoneally to confirm whether immunization induced memory cells. Antibody data were interpreted by descriptive and analytic methods

Results : The recombinant plasmid pUMD2 has been constructed. Confirmation of gene sequence showed no mutation at the clone. Vero cells-81 transfected with pUMD2 expressed prM and E as determined by immunofluorescence staining as intracellular protein and by ELISA to detect extracellular protein. In ELISA results, antibody was detected only in NFI group ($p < 0,005$). Highest antibody titre was found in NFI group with dose 100 μ g followed by dose 25 μ g. However, antibody titre by ELISA between NFI group dose 100 μ g and 25 μ g were not statistically significant ($p > 0,005$). Neutralizing antibody by PRNT 70% showed concordant result compared to ELISA. Neutralizing titre to DENV-2 was developed in NFI group, but it was not detectable in IM group of mice ($< 1/10$). The highest titre of neutralization achieved by 100 μ g, NFI group whose titer 1/80-1/160. Immunized mice in all groups raised greater neutralizing antibody titers on days 4 and 8 after challenge with $2,5 \times 10^5$ PFU/ml of DS 18/09 of dengue type 2 virus. Compared to immunized mice that were not challenged which developed no increasing neutralizing titre, it indicated that immunization could produced memory B cell responses.

Conclusions : Recombinant plasmid as a candidate for dengue DNA vaccine has been constructed. The plasmid expressed premembrane and envelope proteins in Vero cells. Immunogenicity test from the plasmid DNA demonstrated neutralizing antibody responses and anamnestic responses in mice which immunized only by NFI method. IM injection method only showed anamnestic antibody responses. Overall, this DNA plasmid has a potency to be used as a candidate for DNA vaccine against dengue virus type-2. Study for designing tetravalent vaccine model is necessary as a part in vaccine dengue development.