

**LAPORAN KEMAJUAN TAHAP KETIGA
Insentif Riset SINas**

Judul Topik :

**Pengembangan Kit Diagnostik Antigen NS1 Dengue
Metode Imunokromatografi dari Isolat Lokal Indonesia**

Bidang Prioritas Iptek :

TEKNOLOGI KESEHATAN DAN OBAT

RT-2012-655

KETUA PENELITI

Dr. Aryati dr., MS.,Sp.PK(K)

**LEMBAGA PENYAKIT TROPIS
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Kampus C, Mulyorejo – Surabaya 60115

Telp. (031) 5992445, 5992446. Fax : (031) 5992445

Website : www.itd.unair.ac.id. Email : itd@unair.ac.id / tdrc-ua@rad.net.id

20 September 2012

**LAPORAN KEMAJUAN TAHAP KETIGA
Insentif Riset SINas**

Judul Topik :

**Pengembangan Kit Diagnostik Antigen NS1 Dengue
Metode Immunokromatografi dari Isolat Lokal Indonesia**

Bidang Prioritas Iptek :

TEKNOLOGI KESEHATAN DAN OBAT

RT-2012-655

KETUA PENELITI

Dr. Aryati dr., MS.,Sp.PK(K)

**LEMBAGA PENYAKIT TROPIS
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Kampus C, Mulyorejo – Surabaya 60115

Telp. (031) 5992445, 5992446. Fax : (031) 5992445

Website : www.itd.unair.ac.id. Email : itd@unair.ac.id / tdrc-ua@rad.net.id

20 September 2012

EMBAR PENGESAHAN LAPORAN KEMAJUAN TAHAP KETIGA

Topik: Pengembangan Kit Diagnostik Antigen NS1 Dengue Metode Immunokromatografi
Lokal Industri

yang Progres (lok): TEKNOLOGI KESEHATAN DAN OBAT

okasi Penelitian: Lab. Dengue Lempar Penyakit Tropis dan Lab. Dengue Eijkman Institute

Ketertarikan Lempar Penyakit Tropis dan Lab. Dengue Eijkman Institute

No.	Uraian	Kategori Biaya	Jumlah (Rp)
1	Gaji dan Uprah		74.840.000,00
2	Bahan Habis Pakai		82.180.000,00
3	Pelatihan		0.000.000,00
4	Lain-lain		84.000.000,00
Jumlah biaya tahun yang dianggarkan			250.000.000,00

Selanjutnya ditandatangani: 2 November 2012

Kepala Lempar Industri: [Signature]
 LPM Universitas Airlangga: [Signature]
 Koordinator Penelitian Utama: [Signature]
 Dr. Ariani dr. MS. Sp.PK(K): [Signature]

NIP. 19811031984031001
 NIP. 198908197011001
 NIP. 1993081970002001

ABSTRAK

Demam Berdarah Dengue merupakan jenis penyakit infeksi utama yang disebabkan oleh gigitan nyamuk. Saat ini diperkirakan lebih dari 100 juta kasus Demam Dengue (DD) dan lebih dari 250.000 kasus yang berat yaitu Demam Berdarah Dengue (DBD) dan Sindrom Syok Dengue (SSD) yang terjadi setiap tahunnya di seluruh dunia. Manifestasi klinis infeksi virus Dengue beraneka ragam, dari dengue Fever sampai SSD, maka diperlukan teknik diagnosis yang cepat dan akurat untuk dapat segera mengatasi Penderita agar tidak jatuh pada keadaan yang lebih berat. Beberapa uji serologis DBD mempunyai sensitivitas yang rendah yang disebabkan salah satunya karena ketidakspezifikan antigen yang digunakan dalam mendeteksi antibodi. Virus Dengue terdiri dari *single-stranded positive sense RNA (ssRNA sense +)*. Di dalam genomnya terdapat sebuah *single Open Reading Frame (ORF)* yang mengkode 2 macam protein yaitu protein struktural dan protein nonstruktural. Protein struktural terdiri dari C (protein inti/*capsid/ core*), M (protein membran, termasuk preMembran/prM) dan E (*protein envelope*) serta 7 macam protein nonstruktural yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. Dalam merangsang pembentukan antibodi diantara protein struktural urutan imunogenitas tertinggi adalah protein E dan diikuti oleh prM dan C. Sedangkan pada protein non struktural yang paling berperan adalah protein NS1. Protein NS1 merupakan glikoprotein dengan berat molekul 46-50 kDa. Protein (sNS1/ *secreted NS1*) ini diekskresikan oleh sel mamalia yang terinfeksi virus Dengue dan memiliki peranan penting dalam diagnosis dan derajat keparahan penderita. Alat diagnostik yang beredar di pasaran memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang beragam. Penelitian ini bertujuan menciptakan alat diagnostik untuk mendeteksi NS1 yang lebih sensitif dan spesifik, cepat dan akurat. Pada penelitian ini dilakukan isolasi virus, *seminested RT-PCR, sequencing*, analisis protein dengan SDS PAGE, karakterisasi protein dengan western Blot, produksi rekombinan protein NS1, produksi antibodi poliklonal dan monoklonal antiNS1, dilanjutkan dengan upaya pelapisan antibodi pada strip imunokromatografi. Dengan diproduksinya alat diagnostik baru yang lebih spesifik dan sensitif, diharapkan dapat mengurangi mortalitas dan morbiditas penderita DBD dan memperingan beban ekonomi masyarakat dan pemerintah.

Kata Kunci : Virus Dengue, Imunokromatografi, NS1,

KATA PENGANTAR

Dengan berjalannya penelitian ini, kami tim peneliti memanjatkan segala puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan keruniannya dan kelancaran dalam melaksanakan penelitian ini. Tak lupa kami mengucapkan terima kasih kepada ketua Lembaga Penyakit tropis UNAIR, Prof.Dr.Nasronudin,dr,SpPD,K-PTI FINASIM, atas dorongan dan bantuannya selama ini sehingga penelitian ini dapat terlaksana, ketua LPPM UNAIR, Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si, yang telah membantu pengajuan penelitian ini.

Kit Diagnostik yang beredar di Indonesia saat ini masih berupa kit impor dan berbasis isolat luar Indonesia, sehingga ketika dievaluasi oleh beberapa peneliti di Indonesia didapatkan sensitivitas yang rendah. Penelitian ini bertujuan untuk membuat kit diagnostik antigen NS1 Dengue berbasis isolat lokal. Kit diagnostik yang dirancang ini diharapkan memiliki sensitivitas dan spesivitas yang lebih baik dibandingkan kit impor.

Besar harapan kami penelitian ini dapat rampung sesuai tujuan yang diharapkan, sehingga dapat memberikan kontribusi pada penanganan penderita infeksi Dengue dan memurunkan morbiditas dan mortalitas penderita. Selain itu dapat meningkatkan nama Universitas Airlangga dalam bidang penelitian.

Ketua Peneliti

DAFTAR ISI

	halaman
Lembar Pengesahan	i
Ringkasan/Abstrak.....	ii
Kata Pengantar.....	iii
Daftar isi	iv
Daftar Tabel.....	v
Daftar Gambar.....	vi
BAB I Pendahuluan.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Urgensi Penelitian	4
BAB II Tinjauan Pustaka	6
2.1 Virus Dengue	6
2.2 Immunopatogenesis	7
2.3 Diagnosis Klinis dan Laboratoris	9
2.4 Biomolekuler virus Dengue	10
2.5 Antigen NS1 dan pemeriksaannya	11
BAB III Tujuan dan Manfaat.....	12
3.1 Tujuan	13
3.2 Manfaat	13
BAB IV Metode.....	14
4.1 Road Map Metode Penelitian	14
4.2 Desain penelitian	14
4.3 Metode Penelitian Tahun pertama	15
BAB V Rencana Capaian, Hasil dan Pembahasan	23
5.1 Rencana capaian	23
5.2 Hasil dan Pembahasan	23
BAB VI Kesimpulan dan Saran	34
6.1 Kesimpulan	34
6.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	36



DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 1 Jumlah Sampel yang didapatkan dari 8 kota	24
Tabel 2 Pola Serotype Virus Dengue di Indonesia	25
Tabel 3 Rekapitulasi Hasil Pertumbuhan Virus Dengue 8 kota	26
Tabel 4 Sekuensing gen NS1 Virus Dengue	27

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Genom virus dengue dalam sebuah single open reading frame (ORF)	6

EXECUTIVE SUMMARY

**Pengembangan Kit Diagnostik Antigen NS1 Dengue
Metode Imunokromatografi dari Isolat Lokal
Indonesia**

Bidang Prioritas Iptek :

TEKNOLOGI KESEHATAN DAN OBAT

RT-2012-655

KETUA PENELITI

Dr. Aryati dr., MS.,Sp.PK(K)

ANGGOTA PENELITI

Dr. ARYATI, dr., MS., Sp.PK(K) - UNAIR

PUSPA WARDHANI dr., Sp.PK - UNAIR

B. YOHAN Ssi, MS -EIKMAN

Dr. E. BIMO AKSONO, drh. Msc - UNAIR

R. TEDJO SASMONO, Ph.D- EIKMAN

**LEMBAGA PENYAKIT TROPIS
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Kampus C, Mulyorejo – Surabaya 60115

Telp. (031) 5992445, 5992446. Fax : (031) 5992445

Website : www.itd.unair.ac.id. Email : itd@unair.ac.id / tdrc-ua@rad.net.id

Demam Berdarah Dengue (DBD) hingga saat ini masih menjadi masalah kesehatan yang penting di Indonesia. Kasus demam berdarah mencakup 30 propinsi. Diagnosis Demam Berdarah Dengue ditegakkan berdasarkan kriteria WHO, namun tidak semua penderita memberikan gejala yang khas. Oleh karena itu diperlukan uji yang lain untuk menegakkan diagnosis seperti uji serologis untuk mendeteksi antigen atau antibody antiDengue. Saat ini sudah ada tes yang dapat mendiagnosis DBD dalam waktu demam 8 hari pertama yaitu antigen virus dengue yang disebut dengan antigen NS1. Keuntungan mendeteksi antigen NS1 yaitu untuk mengetahui adanya infeksi dengue pada penderita tersebut pada fase awal demam, tanpa perlu menunggu terbentuknya antibodi. Namun sayangnya penggunaan tes NS1 secara tunggal, memberikan variasi sensitivitas NS1 yaitu 30-60 %.

Perlu adanya pengembangan reagen lokal produksi Indonesia yang menggunakan strain lokal sehingga didapatkan alat bantu diagnosis DBD yang sesuai dengan daerah di Indonesia. Perbedaan waktu dan daerah memberikan peranan pada terjadinya variasi genetik yang pada akhirnya menyebabkan Perbedaan sifat biologis dan antigenesitasnya. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan kit diagnostik NS1 berdasarkan isolat lokal dengan tahapan sebagai berikut 1) melakukan analisis karakteristik genetik terhadap isolat dengue di Indonesia, 2) melakukan karakterisasi dan kloning terhadap protein NS-1 sebagai kandidat kit diagnostik 3) mendapatkan prototipe kit diagnostik antigen NS-1 dengue berbasis metode imunokromatografi dari isolat lokal .

Pada tahun pertama ini dilakukan pemetaan serotipe, genotipe virus Dengue di Indonesia dan melakukan sekuensing gen NS1 yang menyandi pembentukan protein NS1 virus Dengue.

Sebanyak 361 sampel serum penderita IVD dikumpulkan yang selanjutnya dilakukan serotyping dengan metode *two step* Reverse Transcriptase -PCR konvensional dan dikonfirmasi dengan *Real time PCR*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa DENV-1 merupakan virus yang terbanyak beredar di Indonesia disusul DENV-3, DENV-2 dan DENV-4.

Genotipe yang didapatkan meliputi Genotipe I dan IV untuk DENV-1, genotipe kosmopolitan untuk DENV-2, genotipe I dan IV untuk DENV-3 dan genotipe II untuk DENV-4

Berdasarkan uji homologi menggunakan program bioedit didapatkan hasil bahwa homologi antar serotipe DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 menunjukkan hasil antara 0,67-0,75. Uji homologi intra serotipe DENV-1 menunjukkan homologi 0,914-0,996. Homologi intra serotipe DENV-2 sebesar 0,972-0,980. Pada DENV-3 didapatkan hasil homologi sebesar 0,945-0,992. Analisis homologi intra serotipe DENV-4 menunjukkan hasil 0,965-0,995.

Dari hasil tersebut diatas menunjukkan bahwa virus Dengue DEN-1,2,3,4 perbedaannya sangat besar sehingga tidak mungkin untuk memilih satu serotipe mewakili serotipe yang lain untuk dilanjutkan pada tahapan kloning. Daerah *conserved* sangat beragam diantara serotipe virus DEN-1,2,3,4. Dari rekapitulasi tersebut ditemukan bahwa daerah *conserved* masing-masing serotipe berbeda. DENV-1 memiliki 9 daerah, DENV-2 25 daerah, DENV-3 18 daerah, DENV-4 19 daerah. Panjang basa nukleotida masing masing daerah bervariasi. Jarak antara daerah *conserved* satu dengan yang lainnya nampaknya tidak terlalu jauh, sehingga dipikirkan gen yang akan dikloning merupakan gen NS1 secara keseluruhan dari masing-masing serotipe yang mewakili isolat yang homologinya tinggi.

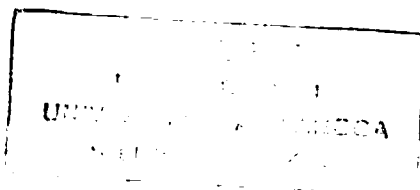
Pada tahap selanjutnya kloning gen NS1 sebaiknya merupakan whole gen NS1 dan bukan merupakan potongan dari daerah *conserved* dan dipilih beberapa isolat yang mewakili berbagai daerah di Indonesia untuk dilakukan kloning gen NS1

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Demam Berdarah Dengue (DBD) hingga saat ini masih menjadi masalah kesehatan yang penting di Indonesia. Di wilayah Asia Tenggara, Indonesia termasuk peringkat kedua setelah Thailand berdasarkan jumlah kasus DBD yang dilaporkan. Saat ini diperkirakan lebih dari 100 juta kasus Demam Dengue (DD) dan lebih dari 250.000 kasus yang berat yaitu Demam Berdarah Dengue (DBD) dan Sindrom Syok Dengue (SSD) yang terjadi setiap tahunnya di seluruh dunia. Kejadian ini semakin mewabah dari tahun ke tahun (dos Santos, 2002; Perez, 1998). Di Indonesia telah dilaporkan sebanyak 58.301 kasus terhitung mulai 1 Januari hingga 30 April 2004 dan 658 kematian yang telah tercatat di Departemen Kesehatan. Kasus demam berdarah mencakup 30 propinsi. Kejadian luar biasa ini telah terjadi pada 293 kota dan 17 propinsi (Soegijanto, 2004).

Merebaknya DBD yang termasuk salah satu *emerging disease* merupakan tantangan yang memerlukan penelitian, pengembangan dan penerangan IPTEK (Menristek, 2006). Merebaknya kembali penyakit karena infeksi dengue ini ditentukan oleh banyak faktor. Berbagai faktor tersebut yang mempengaruhi kejadian penyakit Demam Berdarah Dengue, antara lain faktor *host*, lingkungan (*environment*) dan faktor virusnya (*agent*) sendiri. Faktor *host* yaitu kerentanan (*susceptibility*) dan respon imun. Faktor lingkungan (*environment*) yaitu kondisi geografi (ketinggian dari permukaan laut, curah hujan, angin, kelembaban, musim); kondisi demografi (kepadatan, mobilitas, perilaku, adat istiadat, sosial ekonomi penduduk). Jenis nyamuk sebagai vektor penular penyakit juga ikut berpengaruh. Faktor *agent* yaitu sifat virus Dengue, yang hingga saat ini telah diketahui ada 4 jenis serotipe yaitu Dengue 1, 2, 3 dan 4. Semua hal di atas, tidak terlepas dari transpor virus patogen atau terjadi evolusi atau ekologi dari *native pathogen* yang pada awalnya hanya menyebabkan kasus ringan atau bahkan tidak memberikan gejala pada manusia (Messer, 2003).



Virus dengue terdiri dari 4 serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Keempat serotipe virus ini terdapat di Indonesia dan dilaporkan bahwa serotipe virus Den-3 sering menimbulkan wabah, sedangkan di Thailand penyebab wabah yang dominan adalah virus Den-2 (Soegijanto, 2004). Variasi genetik yang berbeda pada ke-4 serotipe ini tidak hanya menyangkut antar-serotipe, tetapi juga subtipe (genotipe) di dalam serotipe itu sendiri tergantung waktu dan daerah penyebarannya. Pada masing-masing segmen *codon*, variasi di antara serotipe dapat mencapai 2,6 – 11,0 % pada tingkat nukleotida dan 1,3 – 7,7 % untuk tingkat protein. Perbedaan urutan nukleotida ini ternyata menyebabkan variasi dalam sifat biologis dan antigenitasnya (Leitmeyer, 1999).

Virus dengue termasuk dalam genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae*, yang terdiri dari 10.700 basa di dalam genomnya. Virus dengue terdiri dari *single-stranded positive sense RNA (ssRNA sense +)*, dimana di dalam genomnya terdapat sebuah *single Open Reading Frame (ORF)* yang mengkode 2 macam protein yaitu protein struktural dan protein nonstruktural. Protein struktural terdiri dari C (protein inti/*capsid*), M (protein membran, termasuk *preMembrane*) dan E (protein envelop). serta 7 macam protein nonstruktural yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 dimana ditandai oleh sebuah 5' dan 3' *nontranslated regio (NTR)* di kedua ujungnya (Yao, 2002). Protein struktural merupakan 25% dari total protein, sedangkan protein nonstruktural merupakan bagian yang terbesar (75%) terdiri dari NS-1 – NS-5. Berdasarkan urutan *sequence heterogeneity*-nya, dikatakan NS-3 maupun NS-5 memiliki *sequence heterogeneity* lebih rendah dibandingkan C-prM dan E (Chao et al, 2005).

Kemampuan untuk merangsang pembentukan antibodi di antara protein struktural, urutan imunogenisitas tertinggi adalah protein E, diikuti oleh protein prM dan C, sedangkan pada protein nonstruktural yang paling berperan adalah protein NS1 (Leitmeyer, 1999). Diagnosis Demam Berdarah Dengue ditegakkan dengan kriteria WHO, 2007 yaitu demam 2-7 hari, manifestasi perdarahan, trombositopenia dengan jumlah trombosit kurang dari 100.000/ul dan hemokonsentrasi yang ditandai dengan peningkatan hematokrit lebih dari 20% (WHO, 1997).

Pemeriksaan serologis berupa IgM dan IgG antidengue sangat diperlukan untuk membedakan demam yang diakibatkan virus dengue ataukah demam oleh sebab lain (demam tifoid, influenza, malaria, hepatitis dan lain-lain). Pemeriksaan IgM dan IgG antidengue juga diperlukan untuk membedakan apakah infeksi tersebut pertama kali/primer atau infeksi sekunder/tersier/berikutnya. Hal ini penting untuk penatalaksanaan manajemen terapi di samping epidemiologi, karena pada infeksi sekunder keadaan dapat menjadi lebih berat (DBD/SSD= Sindrom Syok Dengue). Pada kit komersial deteksi Ig G dan Ig M kebanyakan menggunakan rekombinan protein E sebagai antigen dalam konjugatnya, Padahal diketahui disamping protein E juga terdapat protein lain yaitu C dan prM yang bersifat imunogenik (Sekaran, 2008).

Saat ini sudah ada tes yang dapat mendiagnosis DBD dalam waktu demam 8 hari pertama yaitu antigen virus dengue yang disebut dengan antigen NS1. Keuntungan mendeteksi antigen NS1 yaitu untuk mengetahui adanya infeksi dengue pada penderita tersebut pada fase awal demam, tanpa perlu menunggu terbentuknya antibodi. Namun sayangnya penggunaan tes NS1 secara tunggal, memberikan variasi sensitivitas NS1 yaitu 63,0 – 93,4% walaupun spesifisitasnya 100% (Blackshell, 2008).

Pada penelitian terbaru di Indonesia dengan menggunakan kit komersial untuk mendeteksi antigen NS1 pada penderita infeksi virus dengue, memberikan hasil berbeda dengan penelitian di luar negeri. Sensitivitas kit NS1 di Indonesia yang telah di teliti yaitu 30,3 % (Puspitarini 2009), 46,3 % (Andayani 2009), 52,2 % (Agustina, 2010). Perbedaan tersebut dikarenakan beberapa hal yaitu; geografis dan serotype virus yang berbeda. Serotipe virus Dengue di Indonesia didominasi oleh DEN-2 sedangkan di luar negeri didominasi DEN-3 (Agustina 2010). Pada penelitian ini ingin merancang kit NS1 yang spesifik dengan isolate local di Indonesia sehingga dapat meningkatkan detektibilitas infeksi virus Dengue. Dengan diagnosis dini, cepat, tepat dan akurat diharapkan menurunkan mortalitas dan morbiditas penderita infeksi virus Dengue di Indonesia.

1.2 Urgensi Penelitian

Demam Berdarah Dengue (DBD) hingga saat ini masih menjadi masalah kesehatan yang penting di Indonesia. Di Indonesia telah dilaporkan sebanyak 58.301 kasus terhitung mulai 1 Januari hingga 30 April 2004 dan 658 kematian telah tercatat di Departemen Kesehatan. Kasus demam berdarah mencakup 30 propinsi. Kejadian luar biasa ini telah terjadi pada 293 kota dan 17 propinsi (Soegijanto, 2004).

Diagnosis Demam Berdarah Dengue ditegakkan berdasarkan kriteria WHO, namun tidak semua penderita memberikan gejala yang khas. Oleh karena itu diperlukan uji yang lain untuk menegakkan diagnosis seperti uji serologis untuk mendeteksi antigen atau antibody antiDengue. Saat ini kit reagen yang beredar di Indonesia merupakan reagen impor dari luar negeri yang dalam pembuatannya menggunakan antigen rekombinan yang berasal dari strain luar Indonesia. Penggunaan reagen Dengue impor di Indonesia dengan antigen yang tidak sesuai dengan strain local dapat menyebabkan kurangnya sensitivitas dan spesifisitas uji diagnosis, seperti yang dilaporkan Sekaran bahwa sensitivitas beberapa uji serologis Dengue yang beredar berkisar 46 -100 % dan spesifisitasnya berkisar 43- 100 %. Pemilihan reagen secara cermat sangat perlu untuk menunjang diagnosis.

Perlu adanya pengembangan reagen lokal produksi Indonesia yang menggunakan strain lokal sehingga didapatkan alat bantu diagnosis DBD yang sesuai dengan daerah di Indonesia. Menurut Leitmeyer perbedaan waktu dan daerah memberikan peranan pada terjadinya variasi genetik yang pada akhirnya menyebabkan Perbedaan sifat biologis dan antigenesitasnya (Leitmeyer 1999).

Pada penelitian terbaru di Surabaya dengan menggunakan kit komersial untuk mendeteksi antigen NS1 pada penderita infeksi virus dengue, memberikan hasil berbeda dengan penelitian di luar negeri. Sensitivitas kit NS1 di Indonesia yang telah diteliti yaitu 30,3 % (Puspitarini 2009), 46,3 % (Andayani 2009), 52,2 % (Agustina, 2010). Perbedaan tersebut dikarenakan beberapa hal yaitu; geografis dan serotipe virus yang berbeda. Pengetahuan

akan serotipe yang dominan dan susunan genomnya sangat penting karena berkaitan dengan perubahan protein yang diproduksi maupun perubahan epitope yang dominan. Dengan adanya globalisasi, jalur transportasi akan semakin mudah diakses sehingga penyebaran vektor akan meluas. Penyebaran vector yang meluas akan menyebabkan timbulnya varian-varian baru virus Dengue dan memungkinkan adanya mutasi genome penyandi.

Adanya mutasi dapat mengakibatkan perubahan reaktivitas antibodi terhadap antigen NS1 sehingga mempengaruhi dapat performans alat diagnostik yang ada saat ini. Dengan diketahuinya adanya mutasi maka peneliti mengharapkan dapat memperbaiki alat diagnostik yang ada saat ini.

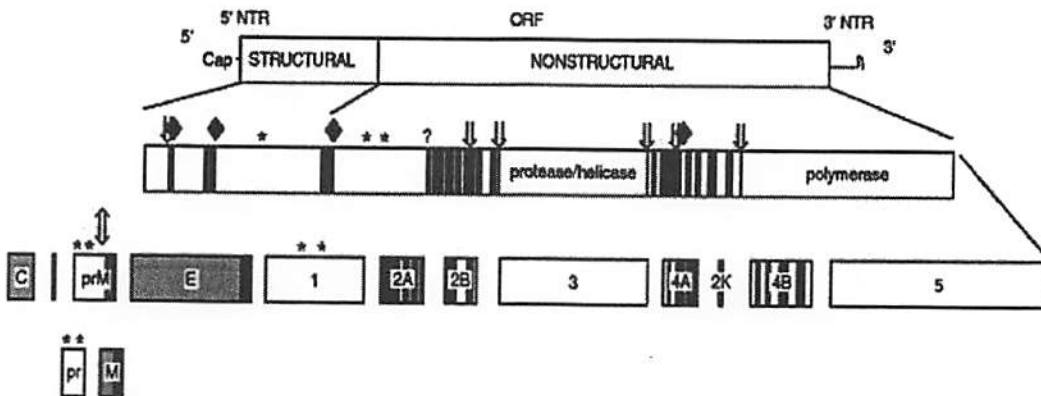
Dengan diketahuinya adanya mutasi pada regio NS1 maka dapat menjadi dasar bagi pengembangan vaksin Dengue ataupun pengembangan kit diagnostik lokal. Sebagai pusat penelitian Dengue di Indonesia, Universitas Airlangga khususnya ITD dapat mengembangkan pembuatan kit diagnostic dan vaksin DBD sehingga memberikan manfaat yang luas bagi masyarakat dan pemerintah.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Virus Dengue

Virus Dengue termasuk dalam genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae*, yang terdiri dari 10.700 basa di dalam genomnya. Virus Dengue terdiri dari *single-stranded positive sense RNA (ssRNA sense +)*. Di dalam genomnya terdapat sebuah *single Open Reading Frame (ORF)* yang mengkode 2 macam protein yaitu protein struktural dan protein nonstruktural. Protein struktural terdiri dari C (protein inti/capsid/core), M (protein membran, termasuk *preMembrane*) dan E (protein envelop) serta 7 macam protein nonstruktural yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 yang ditandai oleh sebuah 5' dan 3' *nontranslated region (NTR)* pada kedua ujungnya (Yao, 2002).

Protein struktural merupakan 25% dari total protein, sedangkan protein nonstruktural merupakan bagian yang terbesar (75%) terdiri dari NS-1 – NS-5. Kemampuan untuk merangsang pembentukan antibodi di antara protein struktural, urutan imunogenitas tertinggi adalah protein E, yang diikuti oleh protein prM dan C, sedangkan pada protein nonstruktural yang paling berperan adalah protein NS-1 (Leitmeyer, 1999).



Gambar 2.1 Genom virus Dengue dalam sebuah *single Open Reading Frame (ORF)* (dikutip dari Chambers, 1999)

2.2. Immunopatogenesis

Berbagai teori immunopatogenesis untuk menerangkan manifestasi klinis infeksi virus Dengue adalah teori virulensi virus, teori immunopatologi, teori antigen antibodi, teori *infection enhancing antibody*, teori mediator, peran endotoksin, peran limfosit, teori trombosit endotel, teori apoptosis (Sutaryo, 2004).

Imunopatogenesis DBD dan SSD masih merupakan masalah yang kontroversial. Dua teori yang masih banyak digunakan untuk menjelaskan perubahan patogenesis pada DBD dan SSD yaitu hipotesis infeksi sekunder (teori *secondary heterologous infection*) dan *antibody dependent enhancement hypothesis (ADE)*. Teori infeksi sekunder menyebutkan bahwa apabila seseorang mendapatkan infeksi primer dengan satu jenis virus, akan terjadi proses kekebalan terhadap infeksi dengan jenis virus tersebut untuk jangka waktu yang lama, tetapi jika orang tersebut mendapatkan infeksi sekunder dengan jenis serotipe virus yang lain, maka terjadi infeksi yang berat. Pada teori kedua (ADE), menyebutkan tiga hal yaitu *antibodies enhance infection*, *T-cells enhance infection* serta limfosit T dan monosit akan melepaskan sitokin yang berkontribusi terhadap terjadinya DBD dan SSD. Singkatnya secara umum ADE dijelaskan sebagai berikut. Jika terdapat antibodi spesifik terhadap jenis virus tertentu, maka antibodi tersebut dapat mencegah terjadinya penyakit, tetapi sebaliknya apabila antibodi yang terdapat dalam tubuh merupakan antibodi yang tidak dapat menetralisasi virus, justru dapat menimbulkan penyakit yang berat. Respons imun humoral diperankan oleh antibodi sedangkan respons imun seluler diperankan oleh MHC (*Major histocompatibility complex*) *class II-restricted CD4+ T cells* dan *class I-restricted CD8+ T cells*. Antibodi terhadap virus Dengue memegang peranan penting dalam mencegah infeksi melalui *serotype-specific neutralizing antibodies* dan meng-*enhance* infeksi Dengue yang dapat berakhir dengan DBD dan SSD melalui aktivitas *serotype-crossreactive non-neutralizing antibodies* (Djunaedi, 2004 ; Kurane 1992).

Infeksi primer ditandai dengan timbulnya antibodi IgM terhadap virus Dengue sekitar tiga sampai lima hari setelah timbulnya demam, meningkat tajam dalam satu sampai tiga minggu serta dapat dideteksi sampai tiga bulan.

Antibodi IgG terhadap virus Dengue diproduksi sekitar dua minggu sesudah infeksi. Titer IgG ini meningkat amat cepat, lalu menurun secara lambat dalam waktu yang lama dan biasanya bertahan seumur hidup. Pada infeksi sekunder terjadi reaksi anamnestic dari pembentukan antibodi, khususnya dari kelas IgG di mana pada hari ke dua saja, IgG ini sudah dapat meningkat tajam. Pada berbagai penelitian di daerah di mana infeksi primer dan sekunder terjadi keduanya, didapatkan suatu angka signifikan yang menyatakan bahwa pada pasien dengan infeksi sekunder dengue, antibodi IgM tidak terdeteksi dalam waktu lima hari sejak infeksi timbul, bahkan pada beberapa kasus tidak menunjukkan suatu respon hingga hari ke 20.

Pada tubuh seseorang yang mengalami infeksi sekunder oleh serotipe virus yang lain maka akan mengakibatkan proliferasi dan transformasi limfosit untuk memproduksi antibodi IgG dalam jumlah tinggi. Selain itu virus Dengue juga berproliferasi dalam limfosit yang bertransformasi tadi sehingga menghasilkan virus dalam jumlah banyak. Hal tersebut akan mengakibatkan terbentuknya antigen-antibodi kompleks (*virus antibody complex*) yang selanjutnya akan mengakibatkan hal sebagai berikut .

1. Sistem komplemen mengalami aktivasi yang mengakibatkan dilepaskannya anafilatoksin C3a dan C5a yang menyebabkan peningkatan permeabilitas dinding pembuluh darah dan merembesnya cairan plasma melalui endotel ke jaringan tubuh sehingga terjadi syok hipovolemik.
2. Agregasi trombosit terjadi, dan kondisi ini menyebabkan ADP terlepas sehingga trombosit mengalami kerusakan metamorfosis. Agregat trombosit ini akan melepaskan vasoaktif amin (histamin dan serotonin) yang akan meningkatkan permeabilitas kapiler dan juga melepaskan PF3 (*Platelet Factor 3*) yang akan merangsang koagulasi intravaskular (DIC). Agregasi trombosit ini akan segera dimusnahkan oleh sistem retikuloendotelial dengan akibat trombositopenia.
3. Proses maturasi megakariosit di sumsum tulang tertekan, yang mengakibatkan trombositopenia dan menekan berbagai faktor pembekuan darah yang dapat mengakibatkan perdarahan.

4. Aktivasi faktor Hageman (faktor XII) terjadi, sehingga menyebabkan terjadinya pembekuan intravaskular yang meluas (DIC). Pada proses ini plasminogen akan menjadi plasmin yang berperan dalam pembentukan anafilatoksin dan penghancuran fibrin menjadi *fibrin degradation product* (FDP). Aktivasi ini juga akan merangsang sistem kinin yang berperan dalam proses meningkatnya permeabilitas pembuluh darah.

Patogenesis utama yang membedakan Demam Berdarah Dengue dari Demam Dengue adalah adanya peningkatan permeabilitas endotel kapiler. Keadaan ini menyebabkan ekstrasvasi cairan intravaskular ke ekstrasvasular sehingga volume plasma berkurang, akibatnya terjadi hipotensi, hemokonsentrasi, hipoproteinemia, efusi ke rongga serosa, peritoneum, pleura dan perikard dan menimbulkan syok. Syok hipovolemik ini akan mengakibatkan terjadinya anoksia jaringan, asidosis metabolik dan kematian.

2.3. Diagnosis Klinis dan Laboratoris

Kriteria WHO, 1997 masih menggunakan kriteria klinis dan laboratoris untuk menegakkan DBD, sebagai berikut.

Kriteria Klinis .

- a. Demam tinggi mendadak, tanpa sebab jelas, berlangsung terus menerus selama 2-7 hari.
- b. Terdapat manifestasi perdarahan ditandai dengan :
uji Rumpel Leede/*RL/tourniquet* positif, petekia, ekimosis, purpura, perdarahan mukosa, epistaksis, perdarahan gusi, hematemesis dan atau melena.
- c. Pembesaran hati (hepatomegali).
- d. Syok, ditandai nadi cepat dan lemah serta penurunan tekanan nadi, hipotensi, kaki dan tangan dingin, kulit lembab dan pasien tampak gelisah.

Kriteria Laboratoris .

- a) Trombositopenia (100.000/ μ l atau kurang).
- b) Hemokonsentrasi, dapat dilihat dari peningkatan hematokrit 20% atau lebih, menurut standar umur dan jenis kelamin, atau penurunan hematokrit 20% sesudah terapi cairan.

2.4. Biomolekuler virus Dengue

Virus dengue terdiri dari 4 serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Keempat serotipe virus ini terdapat di Indonesia dan dilaporkan bahwa serotipe virus Den-3 sering menimbulkan wabah, sedangkan di Thailand penyebab wabah yang dominan adalah virus DEN-2 (Soegijanto, 2004). Variasi genetik yang berbeda pada ke-4 serotipe ini tidak hanya menyangkut antar-serotipe, tetapi juga sub tipe (genotipe) di dalam serotipe itu sendiri tergantung waktu dan daerah penyebarannya. Pada masing-masing segmen *codon*, variasi di antara serotipe dapat mencapai 2,6 – 11,0 % pada tingkat nukleotida dan 1,3 – 7,7 % untuk tingkat protein. Perbedaan urutan nukleotida ini ternyata menyebabkan variasi dalam sifat biologis dan antigenitasnya (Leitmeyer, 1999).

Virus dengue termasuk dalam genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae*, yang terdiri dari 10.700 basa di dalam genomnya. Virus dengue terdiri dari *single-stranded positive sense RNA (ssRNA sense +)*, dimana di dalam genomnya terdapat sebuah *single Open Reading Frame (ORF)* yang mengkode 2 macam protein yaitu protein struktural dan protein nonstruktural. Protein struktural terdiri dari C (protein inti/*capsid*), M (protein membran, termasuk *preMembrane*) dan E (protein envelop) serta 7 macam protein nonstruktural yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 dimana ditandai oleh sebuah 5' dan 3' *nontranslated regio (NTR)* di kedua ujungnya (Yao, 2002). Protein struktural merupakan 25% dari total protein, sedangkan protein nonstruktural merupakan bagian yang terbesar (75%) terdiri dari NS-1 – NS-5. Berdasarkan urutan *sequence heterogeneity*-nya, dikatakan NS-3 maupun NS-5 memiliki *sequence heterogeneity* lebih rendah dibandingkan C-prM dan E (Chao et al, 2005).

Kemampuan untuk merangsang pembentukan antibodi di antara protein struktural, urutan imunogenisitas tertinggi adalah protein E, diikuti oleh protein prM dan C, sedangkan pada protein nonstruktural yang paling berperan adalah protein NS1 (Leitmeyer, 1999).

2.5. Antigen NS1 dan pemeriksaannya

2.5.1. Antigen NS1 dalam Patogenesis Infeksi Virus Dengue5

Antigen NS1 berupa glikoprotein di *flavivirus*, dengan berat molekul 45 kDa, memiliki peran penting dalam replikasi dan kelangsungan hidup virus. Antigen NS1 disintesis oleh retikulum endoplasmik, saat replikasi virus di dalam sel, diangkut ke membran plasma dan disekresikan ke luar sel. Proses glikosilasi menyebabkan NS1 disekresi 1 hari setelah demam hingga tidak ditemukan lagi 5-6 hari kemudian. Sekresi NS1 keluar sel itu menjadi dasar beberapa studi dilakukan untuk meneliti penggunaan NS1 antigen sebagai perangkat diagnostik infeksi virus dengue. Beberapa peneliti mengemukakan hubungan antara antigen NS1 kuantitatif dengan keparahan penyakit, namun studi lain tidak menemukan hubungan tersebut (Libraty, 2002).

Peran NS1 dalam patogenesis infeksi dengue masih belum jelas dan masih diteliti. Adanya sekresi antigen NS1 dari sel dan kadar antigen NS1 tinggi dalam darah pada fase akut menimbulkan dugaan peran antigen NS1 pada imunopatogenesis infeksi virus dengue (Alcon, 2002; Libraty, 2002).

Libraty, et al, menyampaikan bentuk kompleks imun dengan protein NS1 yang disekresi dalam serum dan ikatan protein NS1 dengan sel endotel merupakan faktor potensial dalam patogenesis DBD (Libraty, 2002).

Huang (1999), menunjukkan adanya IgM anti NS1 spesifik terhadap NS1 protein, namun penulis lain menyanggahnya. Kuno (1991) dan Shu (2000) menemukan IgG spesifik NS1 pada penelitiannya. (Kuno, 1991; Huang 1999; Shu 2000). Alcon, et al (2002) menyatakan adanya imun kompleks di plasma pada fase akut, tetapi mungkin berhubungan atau tidak berhubungan dengan keparahan penyakit. Peran penting juga ditunjukkan oleh antibodi anti E *cross-reactive* terhadap plasminogen dan antibodi anti NS1 *cross-reactive* terhadap faktor pembekuan darah. Hubungan antara antibodi spesifik NS1 dengan gambaran klinis masih belum jelas.

Penelitian Avirutnan P, et al., terhadap 182 sampel penderita di Thailand mulai November - Desember 2003 mencoba menjelaskan peran *soluble NS1* dan *membrane associated NS1* (mNS1) menimbulkan gejala kebocoran plasma dan syok pada DBD. Pemeriksaan isolasi virus juga dilakukan terhadap sampel, RT PCR, kadar antibodi spesifik dan kadar C3a dan C5a. Penelitian ini menghasilkan hipotesis peran antigen NS1 dalam proses kebocoran plasma.

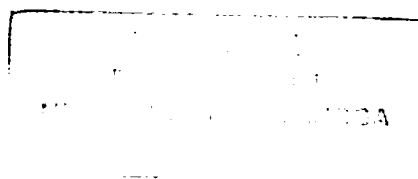
Aktivasi komplemen terjadi karena reaksi antigen NS1 dengan antibodi monoklonal dan poliklonal spesifik antigen NS1 yang diikuti respon lokal dan sistemik anafilatoksin dari SC5b-9 sehingga terjadi kebocoran plasma (Avirutnam, 2006).

2.5.2. Peran Pemeriksaan Antigen NS1

Peran NS1 dalam patogenesis infeksi virus Dengue masih belum jelas dan masih diteliti. Adanya sekresi antigen NS1 dari sel dan kadar antigen NS1 tinggi dalam darah pada fase akut menimbulkan dugaan adanya peran antigen NS1 pada imunopatogenesis infeksi virus Dengue. (Alcon, 2002, Libraty 2002).

Terdapat tiga macam kit komersial NS1 dengue, yaitu dari Panbio, Bio-Rad, dan SD Diagnostik. Metode yang dipakai yaitu : imunokromatografi (ICT), NS1 antigen capture ELISA. Kombinasi deteksi NS1, Ig G dan Ig M dalam bentuk kit ICT juga sudah beredar di pasaran. Penelitian tentang sensitivitas dan spesifisitas kit tersebut di luar negeri adalah sebagai berikut : sensitivitas kit ELISA Bio-Rad 93,4 % dan spesifisitasnya 100 % (Kurasamy 2006), sensitivitas ICT Bio-Rad 90,4 % dan spesifisitasnya 99,5 %, Hasil tersebut tidak sama dengan penelitian di Indonesia yang menunjukkan hasil lebih rendah daripada penelitian tersebut.

Pada penelitian terbaru di Indonesiadengan menggunakan kit komersial untuk mendeteksi antigen NS1 pada penderita infeksi virus dengue, memberikan hasil berbeda dengan penelitian di luar negeri. Sensitivitas kit NS1 di Indonesia yang telah di teliti yaitu 30,3 % (Puspitarini 2009), 46,3 % (Andayani 2009), 52,2 % (Agustina, 2010). Perbedaan tersebut dikarenakan beberapa hal yaitu; geografis dan serotype virus yang berbeda. Serotipe virus Dengue di Indonesia didominasi oleh DEN-2 sedangkan di luar negeri didominasi DEN-3 (Agustina 2010).



BAB IV. METODE

4.1 ROAD MAP METODE PENELITIAN

4.1.1. Tahun Pertama

- a) Dilakukan penentuan serotipe virus Dengue menggunakan metode RT-PCR dengan primer sesuai Lanciotti
- b) Produksi virus dilakukan apabila hasil RT-PCR positif
- c) Sekuensing, analisis homologi, dan analisis filogenetik dilakukan untuk mengetahui tingkat kesamaan gen penyandi protein NS1 dari DEN 1-4 berbagai isolat virus Dengue di Indonesia

4.1.2 Tahun Kedua

- a) Kloning gen NS1 virus Dengue isolat lokal dengan metode gateway Invitrogen
- b) Ekspresi protein rekombinan NS1 pada E. coli BL-21

4.1.3 Tahun Ketiga

- a) Pembuatan antibodi monoklonal anti NS1 ✓
- b) Penentuan jenis konjugat, antigen/antibodi pada zone deteksi uji imunokromatografi serta Pelapisan strip kromatografi dengan rekombinan antigen/antibodi, dan konjugat.
- c) Optimasi strip kromatografi

4.2 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris.

4.3 Metode Penelitian Tahun Pertama

4.3.1 RT-PCR Dengue metode Lanciotti

A. Ekstraksi Dengue viral RNA dari sampel serum atau supernatant kultur sel menggunakan *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen)

1. Pipet 560 μ l buffer AVL. (disimpan pada suhu ruang) kedalam sebuah 1.5 ml *microcentrifuge tube*. Tambahkan 5.6 μ l dari 1 μ g/ μ l carrier RNA (dilarutkan kedalam buffer AVE). Campur dengan pipetting.
Catatan : crystal akan berkembang jika buffer AVL diletakan diatas es.
2. Tambahkan 140 μ l dari serum atau sel kultur supernatant ke campuran buffer AVL – carrier RNA. Campur dengan memvortex selama 15 detik.
3. Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit
4. Dengan singkat sentrifus *tube* untuk memisahkan tetesan dari dalam tutup
5. Tambahkan 560 μ l Ethanol (96 – 100%) ke dalam sampel dan campur dengan memvortex selama 15 detik. Dengan singkat sentrifus *tube* untuk memisahkan tetesan dari tutup
6. Dengan hati-hati tambahkan 630 μ l larutan dari langkah 5 ke *QIAamp mini spin column* (dalam sebuah 2 ml *collection tube*) tanpa membasahi rim. Tutup cap dan centrifuge pada 8.000 rpm selama 1 menit. Tempatkan *QIAamp spin column* kedalam sebuah 2 ml *collection tube*. Dan buang tube yang berisi filtrat.
7. Dengan hati-hati buka *QIAamp mini spin column* dan ulangi step 6. Ulangi step ini sampai semua lisat telah tertampung pada *spin column*.
8. Dengan hati-hati buka *QIAamp mini spin column* dan tambahkan 500 μ l buffer AW1. Tutup cap dan sentrifus pada 8.000 rpm selama 1 menit. Tempatkan *QIAamp mini spin column* kedalam sebuah *collection tube* bersih disediakan) dan buang tube yang berisi filtrat.
9. Dengan hati-hati buka *QIAamp mini spin column* dan tambahkan 500 μ l buffer AW2. Tutup cap dan centrifuge dengan kecepatan penuh pada 13.000 rpm selama 3 menit.

10. Tempatkan *QIAamp mini spin column* kedalam sebuah *collection tube* baru 1.5 ml (tidak disediakan) dan buang *collection tube* lama yang berisi sari. Centrifuge pada kecepatan penuh selama 1 menit.
11. Tempatkan *QIAamp mini spin column* kedalam sebuah *collection tube* bersih 1.5 ml *microsentrifus tube* (tidak disediakan) dan buang *collection tube* lama yang berisi sari. Dengan hati-hati buka *QIAamp mini spin column* dan tambahkan 60 μ l buffer AVE yang sudah disesuaikan pada suhu ruang. Tutup cap dan inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Sentrifus pada 8.000 rpm selama 1 menit.
12. Simpan RNA pada - 80°C.

B. Reaksi RT-PCR untuk Deteksi dan Serotyping of DENV

Dalam tabung PCR dibuat campuran untuk RT reaksi-reaksi yang berisi komponen-komponen berikut :

Komponen	Qty (μ l)
0.1 M DTT	1
10 Mm dNTP mix	1
D2 primer (10 pmol)	0,5
RNA	6
Nuclease-free water	6,5
Sentrifus briefly	
Incubate at 65°C selama 5 menit, letakan di es segera, kemudian tambahkan :	
5X First strand buffer	4
RNA se Out	0,5
Superscript III RT	0,5
Total	20

Reaksi inkubasi pad *thermal cycler* dengan mengikuti kondisi :

- 25°C selama 5 menit
- 42°C selama 60 menit
- 70°C selama 15 menit

4°C pertahankan

C. Reaksi PCR untuk Deteksi DENV

Campuran reagen dibuat dalam tabung PCR yang terdiri dari komponen berikut :

Komponen	Qty (µl)
10 x Roche Buffer	2,5
10 Mm dNTP mix	0,5
25 mM MgCl ₂	1,5
D1 primer (10 pmol)	0,3
D2 primer (10 pmol)	0,3
cDNA	2
Roche Taq DNA Polymerase	0,15
Nuclease-free water	17,75
Total	25

Reaksi inkubasi pada *thermal cycler* dengan mengikuti kondisi :

95°C selama 2 menit

40 siklus pada

95°C selama 30 detik

60°C selama 1 menit

72°C selama 1 menit 30 detik

72°C selama 10 menit

4°C pertahankan

D. Reaksi PCR untuk Serotyping DENV

Dalam tabung PCR, buatlah campuran untuk Reaksi PCR berisi komponen berikut :

Komponen	Qty (μ l)
10X Roche Buffer	2,5
10 Mm dNTP mix	0,5
25 mM MgCl ₂	1,5
CDNA	2
D1 primer (10 pmol)	0,3
TS1 primer (10 pmol)	0,2
TS2 primer (10 pmol)	0,2
TS3 primer (10 pmol)	0,2
DEN4 primer (10 pmol)	0,2
Roche Taq DNA Polymerase 5 U/ μ l	0,15
Nuclease Free Water	17,25
Total	25

Pengaturan Thermal cycler :

95°C selama 2 menit

10 siklus :

95°C selama 30 detik

60°C selama 1 menit

72°C selama 1 menit 30 detik

72°C selama 10 menit 4°C

Primer yang digunakan untuk reaksi RT-PCR Dengue tertera pada tabel 3.1

Tabel 3.1 Primer pada pemeriksaan *serotyping* RT-PCR Dengue (Lanciotti, 1992).

Primer	Sekuens	Posisi gel	Jumlah dlm bp
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'	134-161	511
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'	616-644	511
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	568-586	482
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	232-252	119
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400-421	290
TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	506-527	392

3.3.2 Reaksi PCR untuk Sekuensing gen NS1

A. RT-PCR untuk persiapan *template sequencing*

Dalam tabung PCR, buat campuran untuk Reaksi RT berisi komponen berikut :

Komponen	Qty (μ l)
Serotype specific primers (masing-masing 1 μ l)	2
Nuclease free water	4
10 mM dNTP mix	1
RNA sampel	6
Incubate at 65°C selama 5 menit, letakan di es segera selama 3 menit, kemudian tambahkan :	
5X First strand buffer	4
0,1 M DTT	1

19

RNA se Out (40 U/ μ l)	1
Superscript III RT	1
Total	20

Reaksi inkubasi pada siklus thermal dengan mengikuti kondisi :

55°C selama 60 menit

70°C selama 15 menit

Pertahankan 4°C

B. PCR untuk persiapan *template sequencing*

Dalam tabung PCR, buat campuran untuk Reaksi RT berisi komponen berikut :

Komponen	Qty (μ l)
10X Pfu Buffer	5
10 Mm dNTP mix	1
cDNA	2
Sense primer *(10 pmol)	1
Antisense primer *(10 pmol)	1
Pfu Turbo DNA Polymerase 2.5 U/ μ l	1
Nuclease Free Water	39
Total	50

* Petunjuk primer spesifik serotipe untuk masing DENV serotipe

Pengaturan Thermal cycler :

95°C selama 2 menit

45 siklus :

95°C selama 30 detik

55°C selama 1 menit

72°C selama 4 menit 30 detik

72°C selama 10 menit

Pertahankan 4°C

C. Ekstraksi DNA dari agarose gel menggunakan QIAquick Kit Ekstraksi Gel (Qiagen)

1. Potong gel agarose berisi DNA, timbang potongan gel. Tambahkan 3 volume buffer QG kedalam 1 volume gel (100 mg – 100 μ l)
2. Inkubasi pada 50°C selama 10 menit (atau sampai seiris gel telah berhasil dilarutkan). Untuk membantu pelarutan gel, campur dengan vortexing tube setiap 2 – 3 menit selama inkubasi. Penting : solubilize agarose dengan lengkap
3. Setelah seiris gel berhasil dilarutkan, periksa bahwa warna campuran adalah kuning (sesuai Buffer QG tanpa larutan agarose)
4. Tempatkan sebuah QIAquick spin column didalam sebuah tube collection 2 ml yang disediakan
5. Untuk mengikat DNA, terapkan sampel (750 μ l) ke column QIAquick dan sentrifus selama 1 menit, untuk volume sampel lebih dari 750 μ l, hanya mengisi dan spin
6. Buang melalui aliran dan tempatkan QIAquick column kembali ke tube collection. Tube collection digunakan kembali untuk memproduksi sampah plastic
7. Tambahkan 0,5 ml buffer QG ke QIAquick column dan sentrifus selama 1 menit
8. Cucilah, tambahkan 750 μ l buffer PE ke QIAquick column, biarkan column selama 5 menit setelah penambahan buffer PE sebelum disentrifus selama 1 menit
9. Buang melalui aliran dan tempatkan QIAquick column untuk tambahan 1 menit pada 13.000 rpm
10. Tempatkan QIAquick column kedalam tube microsentrifus 1,5 ml yang baru dan bersih
11. Untuk Elute DNA, tambahkan 50 μ l buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) atau H₂O ke pusat membrane QIAquick, biarkan column selama 1 menit mengikuti sentrifus selama 1 menit. Pastikan bahwa elution buffer dibagikan secara langsung kedalam membrane QIAquick untuk melengkapi elution bound DNA. Alternatif untuk meningkatkan konsentrasi DNA,

tambahkan 50 μ l elution buffer pada pusat membrane QIAquick. biarkan column selama 1 menit dan kemudian sentrifus selama 1 menit

Catatan : semua proses sentrifus diselesaikan pada 13.000 rpm

D. Ethanol/EDTA/Sodium Acetate Precipitation

1. Buat campuran yang terdiri 1,5 μ l dari 125 mM EDTA pH 8.0 (dibuat dengan fresh), 1,5 μ l dari 3 M Sodium Acetate pH 5.2, 37.5 μ l dari Absolute Ethanol dan 15 μ l dari pengembangan produk didalam sebuah 1.5 eppendorf tube.
2. Vortex sebentar
3. Letakan pada es selama 10 menit
4. Spin down 12,000 rpm, 4°C selama 20 menit
5. Pisahkan supernatant dengan pipeting
6. Tambahkan 250 μ l 70% Ethanol (dibuat fresh)
7. Spin down 12,000 rpm, 4°C selama 10 menit
8. Pisahkan supernatant dengan pipeting
9. Cepatkan Vac selama 10 menit
10. Bungkus tube dengan aluminium foil dan simpan pada suhu - 20°C

4.3.3 Analisis Filogenetik dan Homologi

Analisis filogenetik dan homologi dilakukan menggunakan program bioinformatika genetix versi 9 dan Mega 5.

BAB V. RENCANA CAPAIAN, HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Rencana capaian

Pada penelitian tahap pertama ini diharapkan didapatkan berbagai serotipe dari beberapa kota di Indonesia sehingga diketahui jenis serotipe yang mendominasi di Indonesia. Dari berbagai serotipe virus Dengue yang didapatkan akan dilanjutkan untuk dilakukan sekuensing masing-masing 10 perwakilan masing-masing serotipe, sehingga didapatkan informasi tentang susunan nukleotida yang akan digunakan untuk keperluan kloning NS1.

Pada tahap ini sudah dilakukan serotyping dari sebanyak 361 sampel penderita infeksi Dengue. Sampel dengan hasil serotyping positif dilanjutkan dengan kultur virus yang apabila didapatkan pertumbuhan virus Dengue dilanjutkan sekuensing gen E dan NS1 virus Dengue dari isolat tersebut. Dari target sebanyak 40 sampel yang dilakukan sekuens NS1 telah didapatkan 40 sekuens gen NS1.

5.2 Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini didapatkan sampel penelitian sebanyak 361 sampel penderita infeksi Dengue yang didapatkan dari kegiatan surveilans sudah dilakukan di 8 kota yang masing-masing mewakili satu pulau di Indonesia. Berbagai kota tersebut adalah Denpasar, Jayapura, Surabaya, Jakarta, Kendari, Samarinda, Banjarmasin, Medan.

Tabel 1. Jumlah Sampel yang didapatkan dari 8 kota

No	KOTA	JUMLAH
1.	Surabaya	184
2.	Bali	32
3.	Jakarta	32
4.	Medan	22
5.	Kendari	24
6.	Samarinda	32
7.	Jayapura	20
8.	Banjarmasin	15
	Total	361

A. Pola serotype virus Dengue yang ada di Indonesia

Serotyping virus Dengue dilakukan menggunakan metode RT-PCR sesuai protolol pada proposal penelitian. Serotyping di masing-masing daerah menunjukkan adanya variasi serotypng yang dominan pada masing-masing daerah. Pada daerah tertentu (Samarinda) hanya ditemukan satu serotype saja yaitu DEN-4. Hal ini dapat terjadi karena faktor geografis daerah tersebut yang lebih terisolir dari daerah sekitar sehingga memperkecil transmisi vektor virus dari luar daerah. Hasil Serotype yang didapatkan pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 3. Serotype yang dominan di Indonesia adalah DEN-1, dan disusul Den-3, DEN-4, dan yang paling sedikit proporsinya adalah DEN-2.

Tabel 2. Pola Serotype

No	Daerah	Jumlah	Hasil PCR +	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
1	Jakarta	32	9 (33,3%)	1 (11,2%)	2 (22,2 %)	3 (33,3%)	3 (33,3 %)
2	Bali	32	13 (40,6%)	5 (38,5%)	0 (0%)	7 (53,8%)	1 (7,7 %)
3	Medan	22	6 (27,3%)	0 (0%)	2 (33,3%)	3 (50%)	1 (1,7 %)
4	Samarinda	32	7 (28 %)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)
5	Papua	20	1 (5,8 %)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
6	Kendari	24	1 (4 %)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)
7	Surabaya	184	80 (43,5%)	46 (57,5%)	10 (12,5%)	13 (16,25%)	11 (13,75%)
8	Banjarmasin	15	1 (6,6 %)	1 (6,6 %)	-	-	-
	Total	361	118 (32,7%)	53 (45%)	14 (11,8%)	28 (23,7%)	23 (19,5%)

A. Hasil Kultur Sampel Infeksi Virus Dengue

Sampel dengan hasil RT-PCR positif dilanjutkan dikultur pada sel C6/36 dengan media RPMI. Hasil pertumbuhan kultur dapat dilihat pada tabel 3. Sampel dengan hasil kultur virus Dengue positif akan dilanjutkan untuk dilakukan sekuensing gen NS1.

Tabel 3. Rekapitulasi hasil pertumbuhan virus Dengue 8 kota

Tabel 3. Rekapitulasi hasil pertumbuhan virus Dengue 8 kota

No	Daerah	Kultur Positif	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
1	Jakarta	8	2	2	3	1
2	Bali	5	4	0	1	0
3	Medan	4	0	2	1	1
4	Samarinda	0	0	0	0	0
5	Papua	1	0	0	1	0
6	Kendari	1	0	0	1	0
7	Surabaya	34	17	3	12	5
8	Banjarmasin	0	0	0	0	0
	Total	56	23	7	19	7

B. Sekuensing gen NS1 virus Dengue

Bahan isolat virus Dengue positif dipakai sebagai bahan untuk sekuensing gen NS1. Langkah-langkah sekuensing sesuai protokol penelitian yang dicantumkan pada bab metode penelitian. Rekapitulasi sampel yang sudah disekuensing gen NS1 dapat dilihat pada tabel 4.

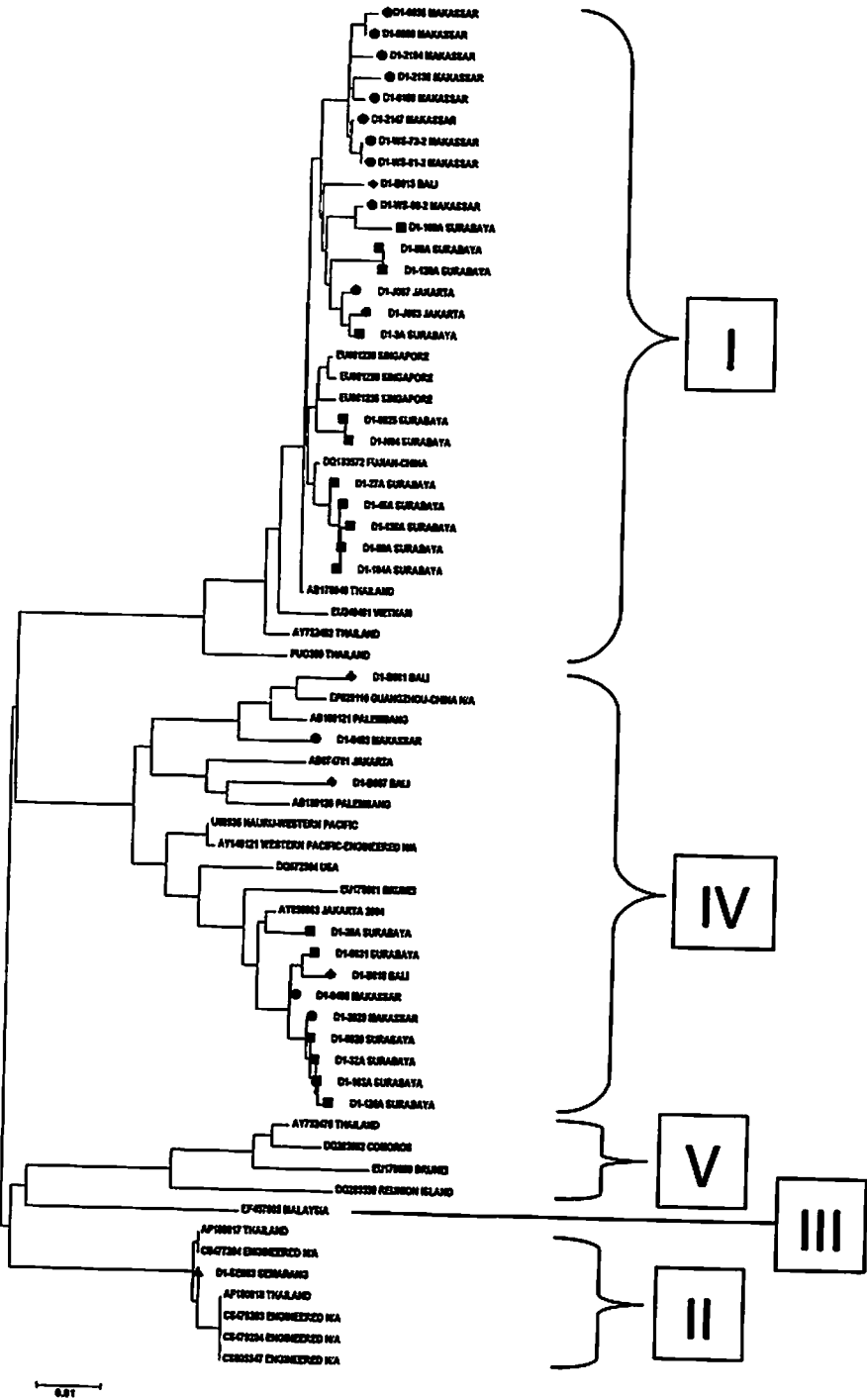
Tabel 4. Proporsi hasil sekuensing gen NS1 virus Dengue Indonesia

No	Serotype Dengue	Jumlah
1	DEN-1	16
2	DEN-2	5
3	DEN-3	15
4	DEN-4	4
	Total	40

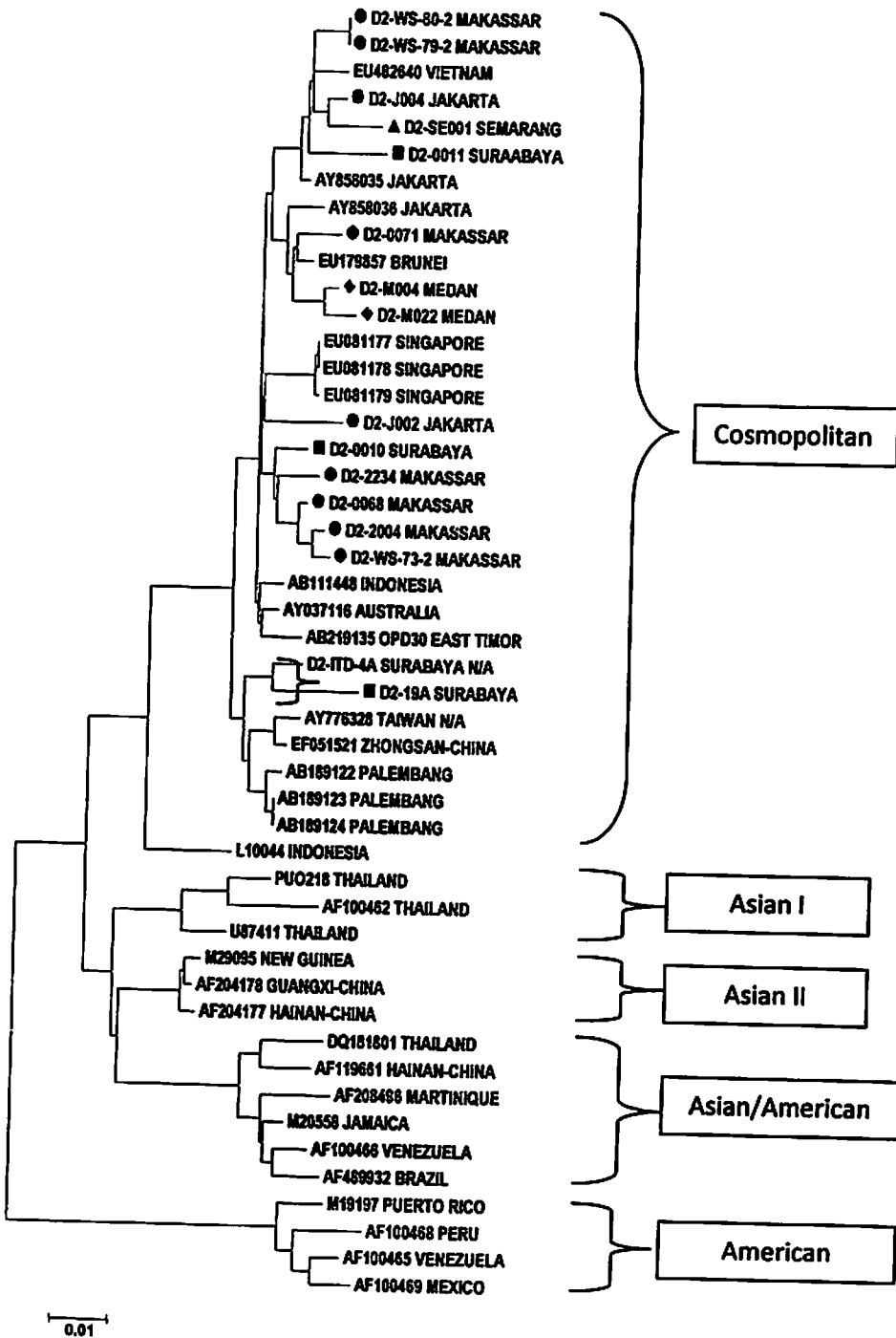
Berdasarkan sekuens gen E dilakukan analisis filogenetik pada virus Dengue isolat Indonesia. Rekapitulasi hasil genotipe dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Rekapitulasi jenis genotip virus Dengue di Indonesia

Serotype	Genotype	Daerah	Jumlah
DEN-1	I	Denpasar Bali(1), Jakarta(2), Surabaya (10)	13
	IV	Denpasar Bali (2), Surabaya (6)	8
DEN-2	Cosmopolitan	Jakarta (2), Medan (2), Surabaya (3)	7
DEN-3	I	Surabaya (9), Jakarta (2), Denpasar Bali (3), Medan (1), Kendari (1), Papua (1)	17
	IV	Surabaya (2)	2
DEN-4	II	Surabaya (4), Jakarta (1), Medan (1), Bali (1)	7
		Total	54

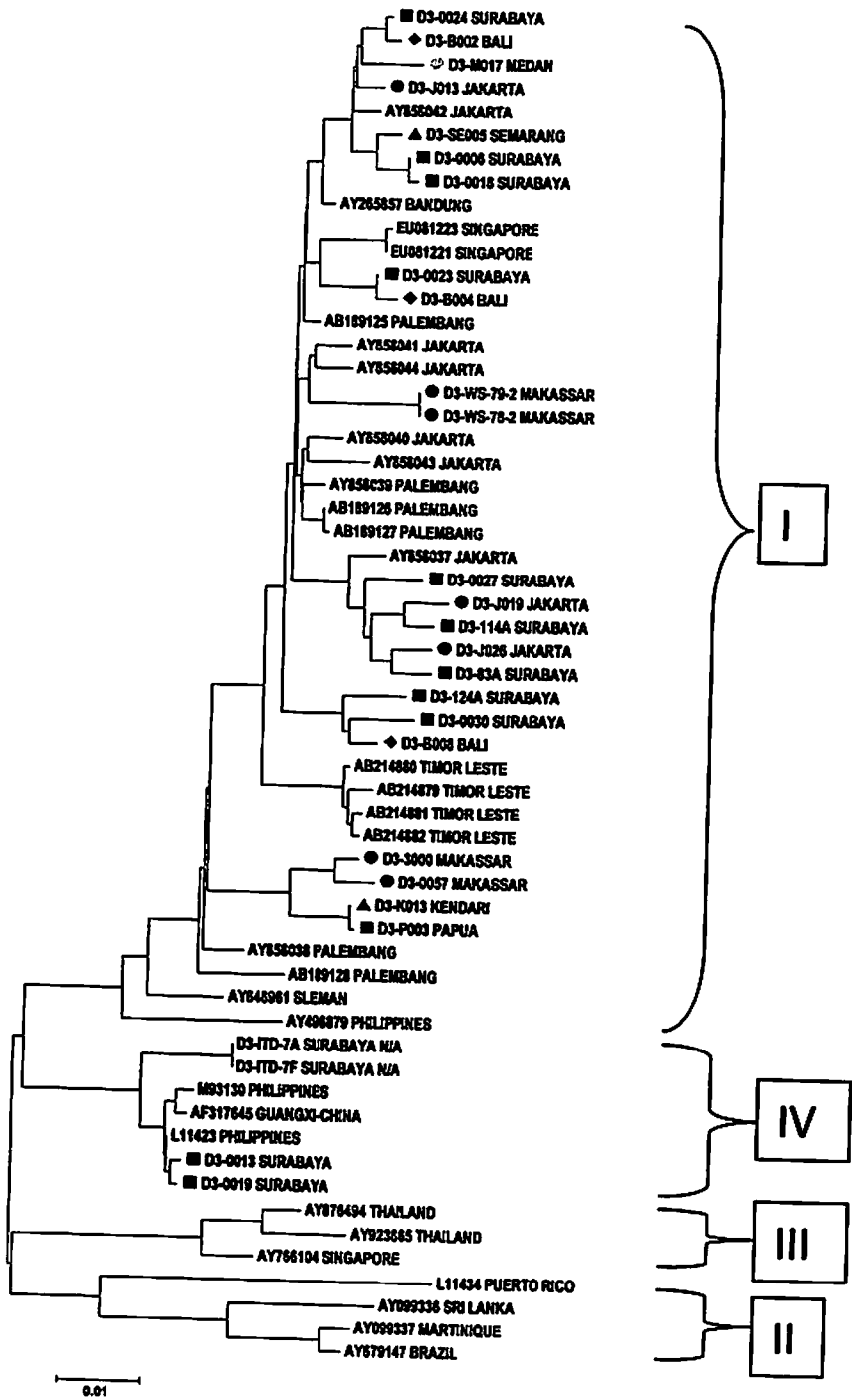


Gambar Pohon Filogenetik DEN-1
 Gambar pohon filogenetik berdasarkan sekuens gen E, menurut klasifikasi Goncalves



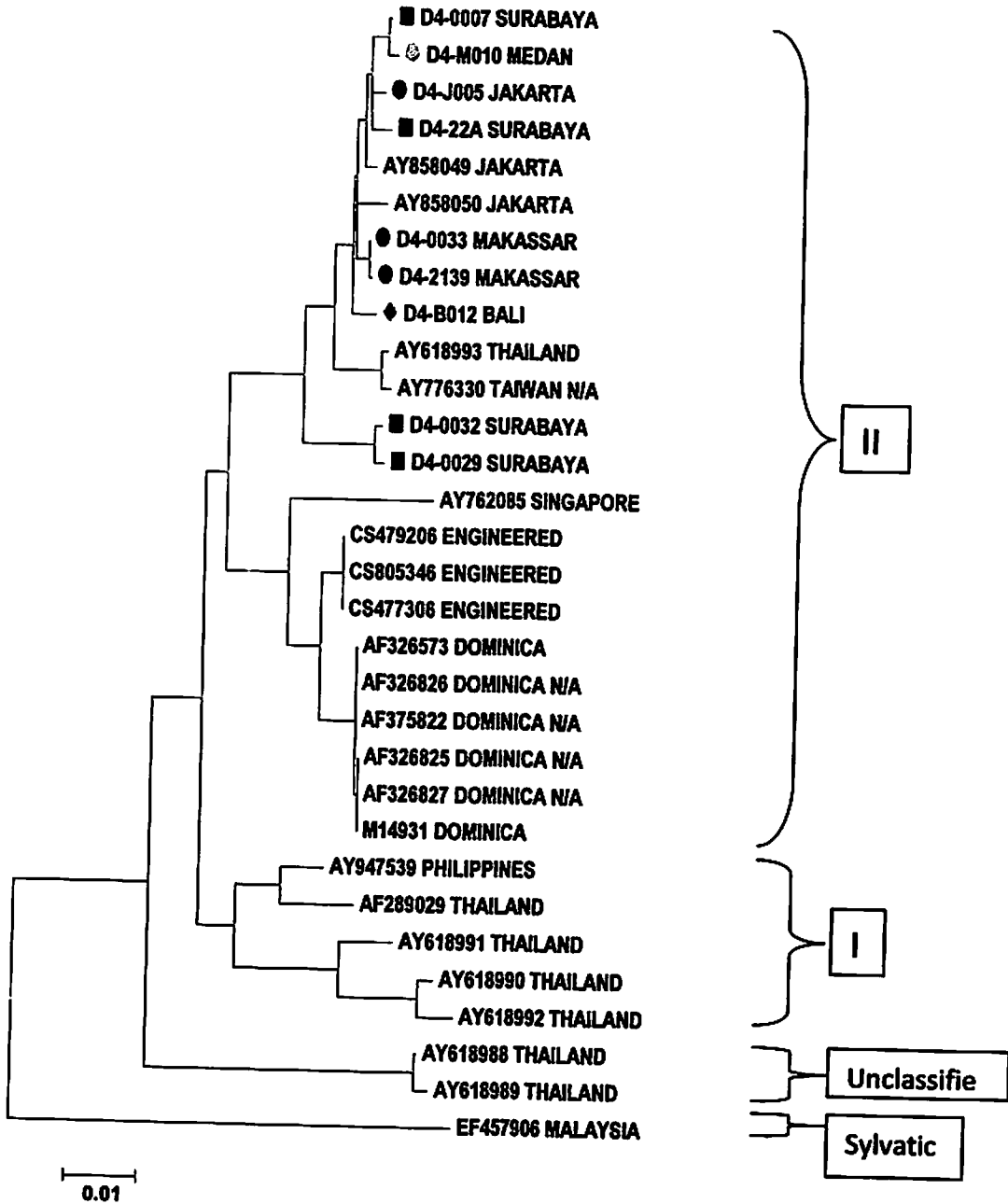
Gambar Pohon filogenetik DEN-2

Pohon filogenetik berdasarkan sekuens gen E dengan klasifikasi Twiddy



Gambar Pohon Filogenetik DEN-3

Pohon filogenetik berdasarkan gen E dengan klasifikasi Lanciotti



Gambar Pohon Filogenetik DEN-4

Pohon Filogenetik DEN-4 berdasarkan gen E dengan klasifikasi Lanciotti

Uji homologi sekuens gen NS1 virus Dengue

Berdasarkan uji homologi menggunakan program bioedit didapatkan hasil bahwa homologi antar serotipe DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 menunjukkan hasil antara 0,67-0,75. Uji homologi intra serotipe DEN-1 menunjukkan homologi 0,914-0,996. Homologi intra serotipe DEN-2 sebesar 0,972-0,980. Pada DEN-3 didapatkan hasil homologi sebesar 0,945-0,992. Analisis homologi intra serotipe DEN-4 menunjukkan hasil 0,965-0,995.

Dari hasil tersebut diatas menunjukkan bahwa virus Dengue DEN-1,2,3,4 perbedaannya sangat besar sehingga tidak mungkin untuk memilih satu serotipe mewakili serotipe yang lain untuk dilanjutkan pada tahapan kloning. Dari masing-masing serotipe akan dipilih virus Dengue dengan homologi tertinggi diantara serotipe yang sejenis. Hasil uji homologi gen NS1 virus Dengue dapat dilihat di lampiran.

Penentuan daerah Conserved NS1 virus Dengue

Program Bioedit digunakan sebagai sarana menentukan daerah yang conserved. Daerah conserved sangat beragam diantara serotipe virus DEN-1,2,3,4. Rekapitulasi gambaran daerah conserved dapat dilihat pada tabel 6. Dari rekapitulasi tersebut ditemukan bahwa daerah conserved masing-masing serotipe berbeda. DEN-1 memiliki 9 daerah, DEN-2 25 daerah, DEN-3 18 daerah, DEN-4 19 daerah. Panjang basa nukleotida masing masing daerah bervariasi. Jarak antara daerah conserved satu dengan yang lainnya nampaknya tidak terlalu jauh, sehingga dipikirkan gen yang akan dikloning merupakan gen NS1 secara keseluruhan dari masing-masing serotipe yang mewakili isolat yang homologinya tinggi.

Tabel 6. Daerah conserved NS1 virus Dengue isolat Indonesia

Serotipe	Jumlah daerah conserved	Posisi nukleotida	Jumlah basa nukleotida
DEN-1	9	133-155, 199-213, 319-335, 343-359, 400-434, 547-563, 585-611, 766-791, 880-896	17-35
DEN-2	25	1-20, 31-71, 76-112, 114-137, 145-170, 172-188, 197-222, 239-269, 271-305, 313-330, 332-348, 397-461, 463-488, 500-518, 535-554, 556-571, 592-641, 643-659, 661-734, 736-779, 814-830, 832-848, 850-929, 982-1004, 1006-1003	16-74
DEN-3	18	4-20, 22-38, 70-95, 140-146, 236-257, 325-341, 435-473, 478-494, 529-596, 565-587, 589-623, 672-692, 715-736, 802-827, 835-854, 856-884, 919-944, 988-1010	17-39
DEN-4	19	1-36, 38-92, 103-195,	15-98

		197-221, 223-261, 263-278, 283-380, 401-458, 460-482, 496-650, 652-683, 685-779, 795-809, 811-839, 850-870, 877-891, 931-970, 972-986, 1015-1052	
--	--	---	--

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Jenis serotipe yang didapatkan bervariasi antar kota. Pada kota Surabaya jumlah sampel terbanyak didapatkan jenis serotipe yang mendominasi adalah DEN-1 yang berkebalikan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan DEN-3 yang mendominasi. Di daerah Medan jenis serotipe yang mendominasi adalah DEN-3 diikuti DEN-2 dan DEN-1. Serotipe yang ada di Jakarta didominasi oleh DEN-3 diikuti DEN-4,2,1. Pada daerah Denpasar Bali didapatkan serotipe yang mendominasi DEN-3, diikuti DEN-1 dan DEN-4. Serotipe yang terdeteksi di Samarinda hanyalah DEN-4 sedangkan dari daerah Jayapura dan Kendari hanya didapatkan satu sampel yang positif PCR yaitu DEN-3. Penelitian ini sudah berhasil mendapatkan 56 isolat kultur dari beberapa daerah di Indonesia yang dipakai sebagai bahan sekuensing gen NS1. Homologi gen NS1 berbagai isolat di Indonesia bervariasi, untuk DEN-1 antara 0,914-0,996, DEN-2 0,972-0,980, DEN-3 0,945-0,992, DEN-4 0,965-0,995. Analisis daerah convert menunjukkan hasil yang bervariasi pada masing-masing serotipe.

6.2 Saran

1. Kloning gen NS1 sebaiknya merupakan whole gen NS1 dan bukan merupakan potongan dari daerah convert.
2. Dipilih beberapa isolat yang mewakili berbagai daerah di Indonesia untuk dilakukan kloning gen NS1

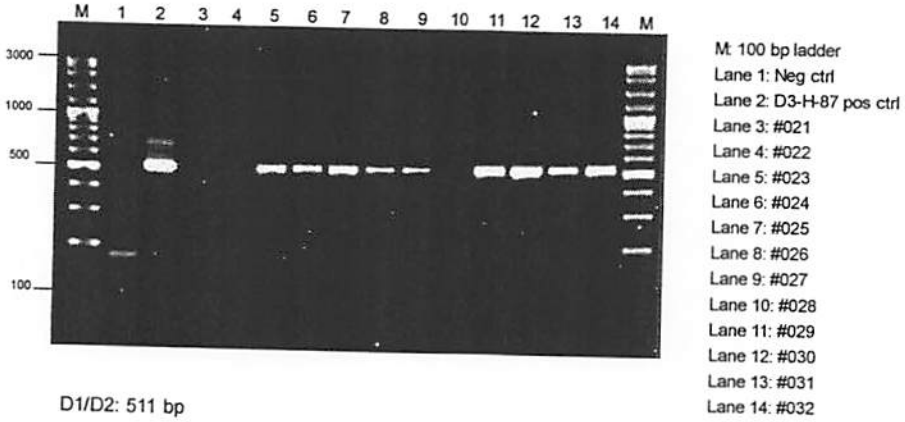
DAFTAR PUSTAKA

- Ananda R. R, Sathyamangalam Swaminathan S, Sirimali Fernando S, Jana AM, Khanna N. Recombinant Multiepitope Protein for Early Detection of Dengue Infections. *Clinical and Vaccine Immunology* 13:1;. 159–67
- Ashihara Y, Kasahara Y, Nakamura RM in McPherson RA, Pincus MR, 2007. Immunoassay and Immunochemistry in Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods., Saunders 21st Ed, USA p: 812-815.
- 6
- Blacksell SD, Mammen MP Jr, Thongpaseuth S, Gibbons RV, Jarman RG, Jenjaroen K, Nisalak A, Phetsouvanh R, Newton PN, Day NPJ, 2008. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 60: 1. : 43-49.
- Chao Dy, King CC, Wang WK, Chen WJ, Wu HL, Chang GJ, 2005. Strategically examining the full-genome of dengue virus type 3 in clinical isolates reveals its mutation spectra (research). *Virology Journal* 2:72 ; 1-10.
- Dos Santos FB, Miagostovich MP, Nogueira RMR, Edgil D, Schatzmayr HG, Riley LW, Harris E, 2002. Complete Nucleotide Sequence Analysis of a Brazilian Dengue Virus type 2 Strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 97(7) : 991-5. Harlow E and D. Lane, 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab, New York.
- Kementerian Negara Riset dan Teknologi Republik Indonesia , 2006. *Buku Putih. Penelitian Pengembangan dan Penerapan IPTEK Bidang Kesehatan dan Obat tahun 2005-2025*. Jakarta, 2006 :16-19.
- Kuno G, 1991. *A manual of reagents with the emphasis on dengue diagnosis*. Center for Disease Control Dengue Branch, San Juan Lab, Puerto Rico.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndame AV 1992 . Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30 (3) : 545-551.
- Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW , 1994 . Molecular evolution and epidemiology of dengue - 3 viruses. *J Gen Virol* ; 75 : 65 – 75.
- Leitmeyer KC , 1999 . Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of Virology*, 73 (6) : 4738 – 4747.
- Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM , 2003 . Emergence and Global Spread of a Dengue Serotype 3, Subtype III Virus. *Emerg Infect Dis* (serial online) . <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no7/03-0038.htm> 3 November 2004.

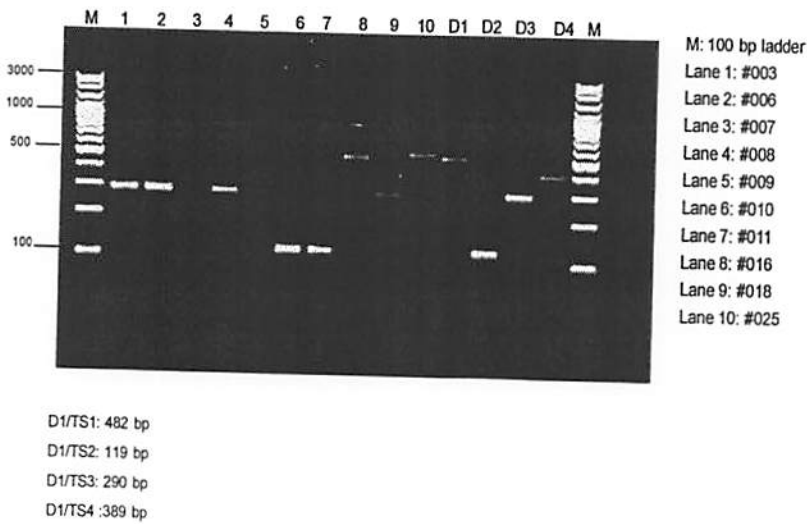
Perez JGR, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV, 1998. Seminar : Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet* , 352 : 971-977.
Riley RS, Anderson FP, 2002 in McClatchey KD. *Basic Principles in Immunodiagnosis in Clinical Laboratory Medicine*. Lippincot Williamm and Wilkin, Phladelphia 2nd Ed, p 1348-1350.

Lampiran 1. Gambar gel deteksi dan serotyping

PCR Detection results



PCR Typing results



PCR Detection Surabaya Samples

03 May 2012



(+): Positive control

PCR Detection Surabaya Samples

07 May 2012

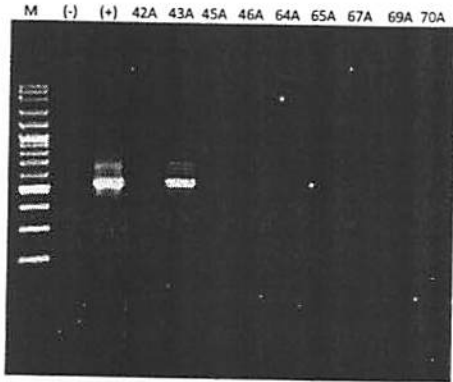


(+): Positive control
(-): Negative control
SE: Semarang sample



PCR Detection Surabaya

08 May 2012



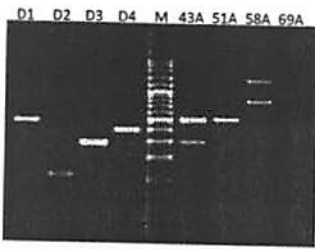
(+): Positive control
(-): Negative control

PCR Serotyping Surabaya Samples

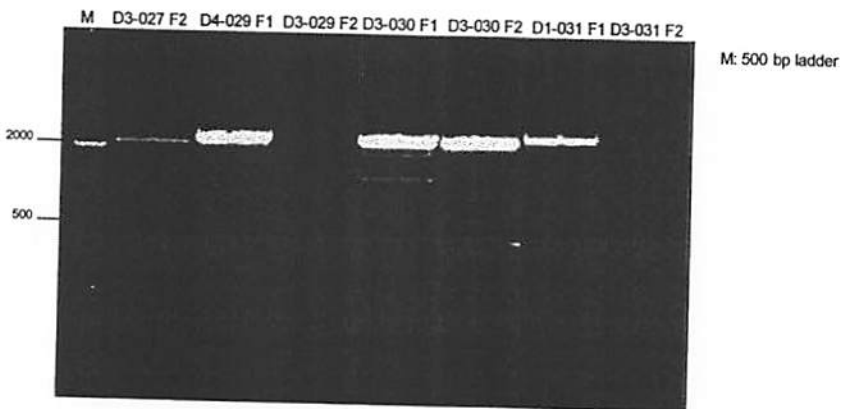
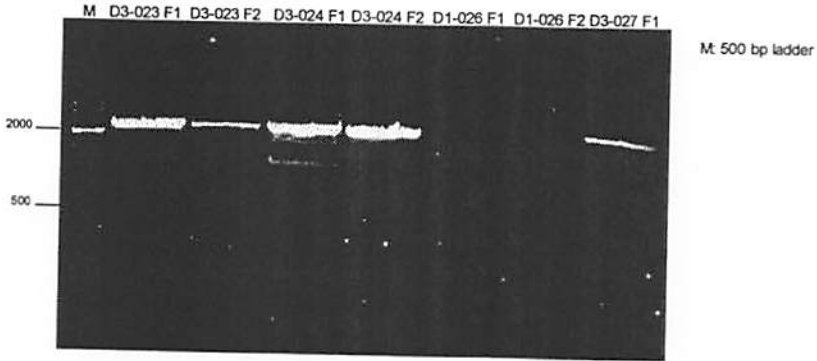
09 May 2012



D1: DEN-1 control
D2: DEN-2 control
D3: DEN-3 control
D4: DEN-4 control
(-): Negative control



Lampiran 2. Hasil ELP sekuensing NS1



Lampiran3. Hasil Alignment virus Dengue

Alignment: D:\Alignment Dengue\DEN-1 NS1-Surabaya samples_aligned fasta.fas

	10 20 30 40 50
DEN-1 Refs	GACTCGGGAT GTGTAATCAA CTGGAAAGGC AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-0025_ID	GATTCAGGAT GTGTAATTA TGGAAAGGT AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-0031_ID	GACTCGGGAT GTGTAATCAA CTGGAAAGGC AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-B001_ID	GACTCGGGAT GTGTAATTA TGGAAAGGT AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-J007_ID	GATTCAGGAT GTGTAATTA TGGAAAGGT AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-B007_ID	GACTCGGGAT GTGTAATCAA CTGGAAAGGC AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-B015_ID	GATTCAGGAT GTGTAATTA TGGAAAGGT AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-J003_ID	GATTCAGGAT GTGTAATTA TGGAAAGGT AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-3A_ID S	GATTCAGGAT GTGTAATTA TGGAAAGGT AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-26A_ID	GACTCGGGAT GTGTAATCAA CTGGAGAGGC AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-27A_ID	GATTCAGGAT GTGTAATTA TGGAAAGGT AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-32A_ID	GACTCGGGAT GTGTAATCAA CTGGAAAGGC AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-38A_ID	GATTCAGGAT GTGTAATTA TGGAAAGGT AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-48A_ID	GATTCAGGAT GTGTAATTA TGGAAAGGT AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-49A_ID	GACTCGGGAT GTGTAATCAA CTGGAAAGGC AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-117A_ID	GATTCAGGAT GTGTAATTA TGGAAAGGT AGAGAACTCA AATGTGGAAG
D1-141A_ID	GATTCAGGAT GTGTAATTA TGGAAAGGT AGAGAACTCA AATGTGGAAG

	60 70 80 90 100
DEN-1 Refs	CGGCATTTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC CTGGACAGAG CAATATAAAT
D1-0025_ID	TGGCATTTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC TTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-0031_ID	CGGCATCTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC CTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-B001_ID	CGGCATTTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC CTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-J007_ID	TGGCATTTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC TTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-B007_ID	CGGCATTTTT GTTACCAATG AAGTCCACAC CTGGACAGAG CAGTACAAAT
D1-B015_ID	TGGCATTTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC TTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-J003_ID	TGGCATTTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC TTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-3A_ID S	TGGCATTTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC TTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-26A_ID	CGGCATTTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC TTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-27A_ID	TGGCATTTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC TTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-32A_ID	CGGCATCTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC CTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-38A_ID	TGGCATTTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC TTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-48A_ID	TGGCATTTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC TTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-49A_ID	CGGCATCTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC CTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-117A_ID	TGGCATTTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC TTGGACAGAG CAATACAAAT
D1-141A_ID	TGGCATTTTT GTCACCAATG AAGTCCACAC TTGGACAGAG CAATACAAAT

	110 120 130 140 150
DEN-1 Refs	TCCAGGCCGA CTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-0025_ID	TTCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-0031_ID	TCCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-B001_ID	TCCAGGCCGA CTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-J007_ID	TTCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-B007_ID	TCCAGGCCGA CTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-B015_ID	TTCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-J003_ID	TTCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-3A_ID S	TTCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-26A_ID	TTCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-27A_ID	TTCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-32A_ID	TTCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-38A_ID	TTCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-48A_ID	TTCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-49A_ID	TTCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-117A_ID	TTCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG
D1-141A_ID	TTCAGCTGA TTCGCCAAG AGACTATCAG CAGCCATTGG GAAGGCATGG

	160 170 180 190 200
DEN-1 Refs	GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCC ACTCGTCTCG AGAACATCAT
D1-0025_ID	GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCA ACTCGTCTCG AGAACATCAT
D1-0031_ID	GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCC ACTCGCCTCG AAAACATTAT
D1-B001_ID	GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCC ACTCGTCTCG AAAACATCAT

D1-J007_ID GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCA ACTCGTCTCG AGAACATCAT
 D1-B007_ID GAGGAAGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCC ACTCGTCTCG AGAACATCAT
 D1-B015_ID GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCA ACTCGTCTCG AGAACATCAT
 D1-J003_ID GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCA ACTCGTCTCG AGAACATCAT
 D1-3A_ID S GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCA ACTCGTCTCG AGAACATCAT
 D1-26A_ID GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCC ACTCGCCTCG AGAACATTAT
 D1-27A_ID GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCA ACTCGTCTCG AGAACATCAT
 D1-32A_ID GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT CCGATCAGCC ACTCGCCTCG AAAACATTAT
 D1-38A_ID GAGGAGGGTG TGTGTGGGAT TCGATCAGCA ACTCGTCTCG AGAACATCAT
 D1-48A_ID GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCA ACTCGTCTCG AGAACATCAT
 D1-49A_ID GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT CCGATCAGCC ACTCGCCTCG AAAACATTAT
 D1-117A_ID GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCA ACTCGTCTCG AGAACATCAT
 D1-141A_ID GAGGAGGGTG TGTGTGGAAT TCGATCAGCA ACTCGTCTCG AGAACATCAT

....|....||....||....||....||....|
 210 220 230 240 250

DEN-1 Refs GTGGAAGCAA ATATCAAATG AATTAAACCA CATCTTACTT GAAAATGACA
 D1-0025_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AATTGAACCA CATCTTGCTT GAAAATGACA
 D1-0031_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AACTAAACCA CATCTTGCTT GAAAATGACA
 D1-B001_ID GTGGAAGCAA ATAGCAAATG AATTAAACCA CATCTTGCTT GAAAATGACA
 D1-J007_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AATTGAACCA CATCTTACTT GAAAATGACA
 D1-B007_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AATTAAACCA CATCTTACTT GAAAATGACA
 D1-B015_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AATTGAACCA CATCTTACTT GAAAATGACA
 D1-J003_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AATTGAACCA CATCTTACTT GAAAATGACA
 D1-3A_ID S GTGGAAGCAA ATATCAAATG AATTGAACCA CATCTTACTT GAAAATGACA
 D1-26A_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AACTAAACCA CATCTTACTT GAAAATGACA
 D1-27A_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AATTGAACCA CATCTTGCTC GAAAATGACA
 D1-32A_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AACTAAACCA CATCTTACTT GAAAATGACA
 D1-38A_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AATTGAACCA CATCTTGCTT GAAAATGACA
 D1-48A_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AATTGAACCA CATCTTGCTT GAAAATGACA
 D1-49A_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AACTAAACCA CATCTTGCTT GAAAATGGCA
 D1-117A_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AATTGAACCA CATCTTGCTT GAAAATGACA
 D1-141A_ID GTGGAAGCAA ATATCAAATG AATTGAACCA CATCTTGCTT GAAAATGACA

....|....||....||....||....||....|
 260 270 280 290 300

DEN-1 Refs TGAATTTAC AGTGGTCGTA GGAGACGTTA GTGGAATCTT GGCCCAAGGA
 D1-0025_ID TGAATTCAC AGTGGTTGTA GGAGATGTTG CTGGGATCTT GGCTCAAGGA
 D1-0031_ID TGAATTTAC AGTGGTCGTA GGAGAAGTTA ATGGAATCTT GGCCCAAGGA
 D1-B001_ID TGAATTCAC AGTGGTTGTA GGAGATGTC A GTGGATCTT GGCCCAAGGA
 D1-J007_ID TGAATTTAC AGTGGTCGTA GGAGATGTTG CTGGGATCTT GGCTCAAGGG
 D1-B007_ID TGAATTTAC AGTGGTCGTA GGAGACGTTA GTGGAATCTT GGCCCAAGGA
 D1-B015_ID TGAATTCAC AGTGGTTGTA GGAGATGTTG CTGGGATCTT GACTCAAGGA
 D1-J003_ID TGAATTCAC AGTGGTCGTA GGAGATGTTG CTGGGATCTT GGCTCAAGGA
 D1-3A_ID S TGAATTTAC AGTGGTCGTA GGAGATGTTG CTGGGATCTT GGCTCAAGGG
 D1-26A_ID TGAATTTAC AGTGGTCGTA GGAGAAGTTA ATGGAATCTT GGCCCAAGGA
 D1-27A_ID TGAATTCAC AGTGGTTGTA GGAGATGTTG CTGGGATCTT GGCTCAAGGA
 D1-32A_ID TGAATTTAC AGTGGTCGTA GGAGAAGTTA ATGGAATCTT GGCCCAAGGA
 D1-38A_ID TGAATTCAC AGTGGTTGTA GGAGATGTTG CTGGGATCTT GGCTCAAGGA
 D1-48A_ID TGAATTCAC AGTGGTTGTA GGAGATGTTG CTGGGATCTT GGCTCAAGGG
 D1-49A_ID TGAATTTAC AGTGGTCGTA GGAGAAGTTA ATGGAATCTT GGCCCAAGGA
 D1-117A_ID TGAATTCAC AGTGGTTGTA GGAGATGTTG CTGGGATCTT GGCTCAAGGA
 D1-141A_ID TGAATTCAC AGTGGTTGTA GGAGATGTTG CTGGGATCTT GGCTCAAGGA

....|....||....||....||....||....|
 310 320 330 340 350

DEN-1 Refs AAGAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATACT CGTGAAAAAG
 D1-0025_ID AAAAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATACT CGTGAAAAAG
 D1-0031_ID AAGAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATATT CGTGAAAAAG
 D1-B001_ID AAGAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATACT CATGAAAAAG
 D1-J007_ID AAAAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATACT CGTGAAAAAG
 D1-B007_ID AAGAAATCGA TTAGGCCGCA ACCCATGGAA CACAAATACT CGTGAAAAAG
 D1-B015_ID AAAAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATACT CGTGAAAAAG
 D1-J003_ID AAAAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATACT CGTGAAAAAG
 D1-3A_ID S AAAAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATACT CGTGAAAAAG
 D1-26A_ID AAGAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATATT CGTGAAAAAG
 D1-27A_ID AAAAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATACT CGTGAAAAAG
 D1-32A_ID AAGAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATATT CGTGAAAAAG
 D1-38A_ID AAAAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATACT CGTGAAAAAG
 D1-48A_ID AAAAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAGCACT CGTGAAAAAG

D1-49A_ID_ AAGAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATATT CGTGGAAAAG
 D1-117A_ID_ AAAAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATACT CGTGGAAAAG
 D1-141A_ID_ AAAAAAATGA TTAGGCCACA ACCCATGGAA CACAAATACT CGTGGAAAAG

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 360 370 380 390 400

DEN-1 Refs CTGGGGAAAA GCCAAAATCA TAGGAGCAGA TGTACAGAAT ACCACCTTCA
 D1-0025_ID CTGGGGAAAAG GCTAAAATCA TAGGGGCAGA TGTGCAGAAC ACCACCTTCA
 D1-0031_ID CTGGGGAAAA GCCAAAAGTCA TAGGAGCAGA TGTACAGAAT ACCACCTTCA
 D1-B001_ID CTGGGGAAAA GCCAAGATCA TAGGAGCAGA TGTACAGAAC ACCACCTTCA
 D1-J007_ID CTGGGGAAAAG GCTAAAATCA TAGGGGCAGA TGTACAGAAC ACCACCTTTA
 D1-B007_ID CTGGGGAAAA GCCAAAATTA TTGGAGCAGA TGTCCAGAAC ACTACTTTCA
 D1-B015_ID CTGGGGAAAAG GCTAAAATCA TAGGGGCAGA TGTACAGAAC ACCACCTTTA
 D1-J003_ID CTGGGGAAAAG GCTAAAATCA TAGGGGCAGA TGTACAGAAC ACCACCTTTA
 D1-3A_ID_S CTGGGGAAAAG GCTAAAATCA TAGGAGCAGA TGTACAGAAC ACCACCTTTA
 D1-26A_ID CTGGGGAAAA GCCAAAAGTCA TAGGAGCAGA TGTACAGAAT GCCACTTTCA
 D1-27A_ID CTGGGGAAAAG GCTAAAATCA TAGGGGCAGA TGTACAGAAC ACCACCTTTA
 D1-32A_ID CTGGGGAAAA GCCAAAAGTCA TAGGAGCAGA TGTACAGAAT ACCACCTTCA
 D1-38A_ID CTGGGGAAAAG GCTAAAATCA TAGGGGCAGA TGTGCAGAAC ACCACCTTCA
 D1-48A_ID CTGGGGAAAAG GCTAAAATCA TAGGGGCAGA TGTACAGAAC ACCACCTTTA
 D1-49A_ID CTGGGGAAAA GCCAAAAGTCA TAGGAGCAGA TGTACAGAAT ACCACCTTCA
 D1-117A_ID CTGGGGAAAAG GCTAAAATCA TAGGGGCAGA TGTACAGAAC ACCACCTTTA
 D1-141A_ID CTGGGGAAAAG GCTAAAATCA TAGGGGCAGA TGTGCAGAAC ACCACCTTCA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 410 420 430 440 450

DEN-1 Refs TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATAACCA AAGAGCATGG
 D1-0025_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATGATCA AAGAGCATGG
 D1-0031_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATGATCA AAGAGCATGG
 D1-B001_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATAACCA AAGAGCATGG
 D1-J007_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATGATCA AAGAGCATGG
 D1-B007_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATGATCA AAGAGCATGG
 D1-B015_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATGATCA AAGAGCATGG
 D1-J003_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATGATCA AAGAGCATGG
 D1-3A_ID_S TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATGATCA AAGAGCATGG
 D1-26A_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATAATCA AAGAGCATGG
 D1-27A_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATGATCA AAGAGCATGG
 D1-32A_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATAATCA AAGAGCATGG
 D1-38A_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATGATCA AAGAGCATGG
 D1-48A_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATGATCA AAGAGCATGG
 D1-49A_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATGATCA AAGAGCATGG
 D1-117A_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATGATCA AAGAGCATGG
 D1-141A_ID TCATCGACGG CCCAAACACC CCAGAATGCC CTGATGATCA AAGAGCATGG

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 460 470 480 490 500

DEN-1 Refs AACATTTGGG AAGTTGAAGA CTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-0025_ID AACATTTGGG AAGTTGAGGA TTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-0031_ID AACATCTGGG AAGTCAAGA CTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-B001_ID AACATCTGGG AAGTTGAAGA CTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-J007_ID AACATTTGGG AAGTTGAGGA TTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-B007_ID AACATCTGGG AAGTTGAAGA CTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-B015_ID AACATTTGGG AAGTTGAGGA TTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-J003_ID AACATTTGGG AAGTTGAGGA TTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-3A_ID_S AACATTTGGG AAGTTGAGGA TTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-26A_ID AACATCTGGG AAGTCAAGA CTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-27A_ID AACATTTGGG AAGTTGAGGA TTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-32A_ID AACATCTGGG AAGTCAAGA CTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-38A_ID AACATTTGGG AAGTTGAGGA TTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-48A_ID AACATTTGGG AAGTTGAGGA TTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-49A_ID AACATCTGGG AAGTCAAGA CTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-117A_ID AACATTTGGG AAGTTGAGGA TTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT
 D1-141A_ID AACATTTGGG AAGTTGAGGA TTATGGATT GGAATTTTCA CGACAAACAT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 510 520 530 540 550

DEN-1 Refs ATGGTTGAAA TTGCGTGACT CCTACACTCA AGTGTGTGAC CACCGGCTAA
 D1-0025_ID ATGGCTGAAA TTGCGTGACT CCTACACCCA AGTGTGTGAC CACCGGCTAA
 D1-0031_ID ATGGTTGAAA CTGCGTGACT CCTACACTCA AGTGTGTGAC CACCGGCTAA

D1-48A_ID CATAGAAGTC AAAACGTGTA TCTGGCCAAA ATCTCACACT CTATGGAGCA
 D1-49A_ID CATAGAAGTT AAGACATGCA TCTGGCCAAA ATCCCATACC TTATGGAGCA
 D1-117A_ID CATAGAAGTC AAAACGTGTA TCTGGCCAAA ATCTCACACT CTATGGAGCA
 D1-141A_ID CATAGAAGTC AAAACATGTA TCTGGCCAAA ATCTCACACT CTATGGAGCA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 710 720 730 740 750

DEN-1 Refs ATGGAGTCTT GGAAAGTGAG ATGATAATCC CAAAGATATA TGGAGGACCA
 D1-0025_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAA ATGATAATTC CAAAGATCTA TGGAGGACCA
 D1-0031_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAA ATGATAATCC CAAAATATA TGGAGGACCA
 D1-B001_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAG ATGATAATCC CAAAGATATA TGGAGGACCA
 D1-J007_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAA ATGATAATTC CAAAGATCTA TGGAGGACCA
 D1-B007_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAG ATGATAATCC CAAAGATATA TGGAGGACCA
 D1-B015_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAA ATGATAATTC CGAAGATCTA TGGAGGACCA
 D1-J003_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAA ATGATAATTC CAAAGATCTA TGGAGGACCA
 D1-3A_ID S ATGGAGTCTT GGAAAGTGAA ATGATAATTC CAAAGATTTA TGGAGGACCA
 D1-26A_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAG ATGATAATCC CAAAATATA TGGAGGACCA
 D1-27A_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAA ATGATAATTC CAAAGATCTA TGGAGGACCA
 D1-32A_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAA ATGATAATCC CAAAATATA TGGAGGACCA
 D1-38A_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAA ATGATAATTC CAAAGATCTA TGGAGGACCA
 D1-48A_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAA ATGATAATTC CAAAGATCTA TGGAGGACCA
 D1-49A_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAA ATGATAATCC CAAAATATA TGGAGGACCA
 D1-117A_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAA ATGATAATTC CAAAGATCTA TGGAGGACCA
 D1-141A_ID ATGGAGTCTT GGAAAGTGAA ATGATAATTC CAAAGATCTA TGGAGGACCA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 760 770 780 790 800

DEN-1 Refs ATATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-0025_ID ATATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-0031_ID ATATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-B001_ID GTATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-J007_ID ATATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-B007_ID ATATCTCAGC ATAATTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-B015_ID ATATCCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-J003_ID ATATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-3A_ID S ATATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-26A_ID ATATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-27A_ID ATATCTCAGC ACAATTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-32A_ID ATATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-38A_ID ATATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-48A_ID ATATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-49A_ID ATATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-117A_ID ATATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC
 D1-141A_ID ATATCTCAGC ACAACTACAG ACCAGGATAT TTCACACAAA CAGCAGGGCC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 810 820 830 840 850

DEN-1 Refs GTGGCACTTG GGCAAGTTAG AACTAGATT TGATTTATGT GAAGGTACCA
 D1-0025_ID GTGGCACCTA GGCAAGTTGG AACTGGATT TGATTTGTGT GAGGGTACCA
 D1-0031_ID GTGGCACTTG GGCAAGTTAG AACTGGATT TGAGTTGTGT GAAGGTACCA
 D1-B001_ID ATGGCACTTA GGTAAGTTGG AACTAGATT TGATTTGTGT GAAGGTACCA
 D1-J007_ID GTGGCACCTA GGCAAGCTGG AACTGGATT TGATTTGTGT GAGGGTACCA
 D1-B007_ID GTGGCATTTA GGCAAGCTGG AACTAGATT TGATTTATGT GAAGGTACCA
 D1-B015_ID GTGGCACCTA GGCAAGCTAG AACTGGATT TGATTTGTGT GAGGGTACCA
 D1-J003_ID GTGGCACCTA GGCAAGCTGG AACTGGATT TGATTTGTGT GAGGGTACCA
 D1-3A_ID S GTGGCACCTA GGCAAGCTGG AACTGGATT TGATTTGTGT GAGGGTACCA
 D1-26A_ID GTGGCACTTG GGCAAGTTAG AACTGGATT TGATTTATGT GAAGGTACCA
 D1-27A_ID GTGGCACCTA GGCAAGTTGG AACTGGATT TGATTTGTGT GAGGGTACCA
 D1-32A_ID GTGGCACTTG GGCAAGTTAG AACTGGATT TGATTTGTGT GAAGGTACCA
 D1-38A_ID GTGGCACCTA GGCAAGTTGG AACTGGATT TGATTTGTGT GAGGGTACCA
 D1-48A_ID GTGGCACCTA GGCAAGTTGG AACTGGATT TAATTTTRGT GAGGGTACCA
 D1-49A_ID GTGGCACTTG GGCAAGTTAG AACTGGATT TGAGTTGTGT GAAGGTACCA
 D1-117A_ID GTGGCACCTA GGCAAGTTGG AACTGGATT TAATTTGTGT GAGGGTACCA
 D1-141A_ID GTGGCACCTA GGCAAGTTGG AACTGGATT TGATTTGTGT GAGGGTACCA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 860 870 880 890 900

DEN-1 Refs CTGTTGTTGT GGATGAACAT TGTGGAATC GAGGACCATC TCTTAGAACC
 D1-0025_ID CCGTTGTTGT GGATGAACAT TGTGGAACC GAGGACCATC TCTTAGAACC

D1-0031_ID CCGTTGTTGT GGATGAACAT TGTGAAATC GAGGACCATC TCTTAGAACC
 D1-B001_ID CAGTTGTTGT GGATGAAAT TGTGAAATC GAGGACCATC TCTTAGAACC
 D1-J007_ID CCGTTGTTGT GGATGAACAT TGTGAAATC GAGGACCATC TCTTAGGACC
 D1-B007_ID CAGTTGTTGT GGATGAACAC TGTGAAATC GAGGACCATC TCTTAGAACC
 D1-B015_ID CCGTTGTTGT GGATGAACAT TGTGAAATC GAGGACCATC TCTTAGGACC
 D1-J003_ID CCGTTGTTGT GGATGAACAT TGTGAAATC GAGGACCATC TCTTAGGACC
 D1-3A_ID 8 CCGTTGTTGT GGATGAACAT TGTGAAATC GAGGACCATC TCTTAGGACC
 D1-26A_ID CCGTTGTTGT GGATGAACAT TGTGAAATC GAGGACCATC TCTTAGAACC
 D1-27A_ID CCGTTGTTGT GGATGAACAT TGTGAAATC GAGGACCATC TCTTAGGACC
 D1-32A_ID CCGTTGTTGT GGATGAACAA TGTGAAATC GAGGACCATC TCTTAGGACC
 D1-38A_ID CCGTTGTTGT GGATGAACAT TGTGAAACC GAGGACCATC TCTTAGAACC
 D1-48A_ID CCGTTGTTGT GGATGAACAT TGTGAAATC GAGGACCATC TCTTAGGACC
 D1-49A_ID CCGTTGTTGT GGATGAACAT TGTGAAATC GAGGACCATC TCTTAGAACC
 D1-117A_ID CCGTTGTTGT GGATGGACAT TGTGAAATC GAGGACCATC TCTTAGGACC
 D1-141A_ID CCGTTGTTGT GAATGAACAT TGTGAAACC GAGGACCATC TCTTAGGACC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 910 920 930 940 950

DEN-1 Refs ACAACAGTCA CAGGAAAGAC AATCCATGAA TGGTGCTGTA GATCTTGCAC
 D1-0025_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGTTGCA GATCTTGTAC
 D1-0031_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGCTGCA GATCTTGCAC
 D1-B001_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAC AATCCATGAA TGGTGCTGTA GATCTTGCAC
 D1-J007_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGTTGCA GATCTTGTAC
 D1-B007_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGCTGCA GATCTTGCAC
 D1-B015_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGTTGCA GATCTTGTAC
 D1-J003_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGTTGCA GATCTTGTAC
 D1-3A_ID 8 ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGTTGCA GATCTTGTAC
 D1-26A_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGCTGTA GATCTTGCAC
 D1-27A_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGTTGCA GATCTTGTAC
 D1-32A_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGCTGCA GATCTTGCAC
 D1-38A_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGTTGCA GATCTTGTAC
 D1-48A_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGTTGCA GATCTTGTAC
 D1-49A_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGTTGCA GATCTTGTAC
 D1-117A_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGTTGCA GATCTTGTAC
 D1-141A_ID ACAACAGTCA CAGGAAAGAT AATCCATGAA TGGTGTTGCA GATCTTGTAC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 960 970 980 990 1000

DEN-1 Refs GTTACCCCCC CTACGTTTCA AAGGAGAAGA CGGGTGCTGG TACGGCATGG
 D1-0025_ID GTTACCCACC TTACGTTTCA GAGGAGAAGA TGGGTGCTGG TACGGAATGG
 D1-0031_ID GTTACCCCCC CTACGTTTCA AAGGAGAAGA CGGGTGCTGG TACGGTATGG
 D1-B001_ID GTTACCCCCCT CTACGTTTCA AAGGGGAAGA CGGGTGCTGG TACGGCATGG
 D1-J007_ID GTTACCCACC TTACGTTTCA GAGGAGAAGA TGGGTGCTGG TACGGTATGG
 D1-B007_ID GTTACCCCCC CTACGTTTCA AAGGAGAAGA CGGGTGCTGG TACGGTATGG
 D1-B015_ID GTTACCCACC TTACGTTTCA GAGGAGAAGA TGGGTGCTGG TACGGTATGG
 D1-J003_ID GTTACCCACC TTACGTTTCA GAGGAGAAGA TGGGTGCTGG TACGGTATGG
 D1-3A_ID 8 GTTACCCACC TTACGTTTCA GAGGAGAAGA TGGGTGCTGG TACGGTATGG
 D1-26A_ID GTTACCCCCC CTACGTTTCA AAGGGGAAGA CGGGTGCTGG TACGGTATGG
 D1-27A_ID GTTACCCACC TTACGTTTCA GAGGAGAAGA TGGGTGCTGG TACGGTATGG
 D1-32A_ID GTTACCCCCC CTACGTTTCA AAGGAGAAGA CGGGTGCTGG TACGGTATGG
 D1-38A_ID GTTACCCACC TTACGTTTCA GAGGAGAAGA TGGGTGCTGG TACGGTATGG
 D1-48A_ID GTTACCCACC TTACGTTTCA GAGGAGAAGA TGGGTGCTGG TACGGAATGG
 D1-49A_ID GTTACCCCCC CTACGTTTCA AAGGAGAAGA CGGGTGCTGG TACGGTATGG
 D1-117A_ID GTTACCCACC TTACGTTTCA GAGGAGAAGA TGGGTGCTGG TACGGTATGG
 D1-141A_ID GTTACCCACC TTACGTTTCA GAGGAGAAGA TGGGTGCTGG TACGGAATGG

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 1010 1020 1030 1040 1050

DEN-1 Refs AAATCAGACC AGTCAAGGAG AAGGAAGAGA ACCTAGTTAA GTCAATGGTC
 D1-0025_ID AAATCAGACC GGTCAAGGAA AAGGAAGAGA ATCTAGTCAA ATCAATGGTC
 D1-0031_ID AAATCAGACC AGTCAAGGAG AAGGAAGAGA ACCTAGTTAA ATCAATGGTC
 D1-B001_ID AAATCAGACC AGTCAAGGAG AAAGAAGAGA ACCTAGTTAA ATCAATGGTC
 D1-J007_ID AAATCAGACC AGTCAAGGAA AAGGAAGAGA ATCTAGTCAA ATCAATGGTC
 D1-B007_ID AAATCAGACC AGTCAAGGAG AAGGAAGAGA ACCTAGTTAA ATCAATGGTC
 D1-B015_ID AAATCAGACC AGTCAAGGAA AAGGAAGAGA ATCTAGTCAA ATCAATGGTC
 D1-J003_ID AAATCAGACC AGTCAAGGAA AAGGAAGAGA ATCTAGTCAA ATCAATGGTC
 D1-3A_ID 8 AAATCAGACC AGTCAAGGAA AAGGAAGAGA ATCTAGTCAA ATCAATGGTC
 D1-26A_ID AAATCAGACC AGTCAAGGAG AAGGAAGAGA ACCTAGTTAA ATCAATGGTC
 D1-27A_ID AAATCAGACC AGTCAAGGAG AAGGAAGAGA ATCTAGTCAA ATCAATGGTC
 D1-32A_ID AAATCAGACC AGTCAAGGAG AAGGAAGAGA ACCTAGTTAA ATCAATGGTC

D1-38A_ID_ AAATCAGACC AGTCAAGGAA AAGGAAGAGA ATCTAGTCAA ATCAATGGTC
 D1-48A_ID_ AAATCAGACC AGTCAAGGAA AAAGAAGAGA ATCTAGTCAA ATCAATGGTC
 D1-49A_ID_ AAATCAGACC AGTCAAGGAG AAGGAAGAGA ACCTAGTTAA ATCAATGGTC
 D1-117A_ID_ AAATCAGACC AGTCAAGGAA AAAGAAGAGA ATCTAGTCAA ATCAATGGTC
 D1-141A_ID_ AAATCAGACC AGTCAAGGAA AAGGAAGAGA ATCTAGTCAA ATCAATGGTC

....|.

DEN-1 Refs TCTGCA
 D1-0025_ID TCTGCA
 D1-0031_ID TCCGCA
 D1-B001_ID TCTGCA
 D1-J007_ID TCTGCA
 D1-B007_ID TCTGCA
 D1-B015_ID TCCGCA
 D1-J003_ID TCTGCA
 D1-3A_ID_S TCTGCA
 D1-26A_ID_ TCTGCA
 D1-27A_ID_ TCTGCA
 D1-32A_ID_ TCTGCA
 D1-38A_ID_ TCTGCA
 D1-48A_ID_ TCTGCA
 D1-49A_ID_ TCTGCA
 D1-117A_ID TCTGCA
 D1-141A_ID TCTGCA

Sequence Identity Matrix

Input Alignment File: D:\Alignment Dengue\DEN-1 NS1-Surabaya samples_aligned.fas

D1-27A	D1-0025	D1-0031	D1-B001	D1-J007	D1-B007	D1-B015	D1-J003	D1-3A	D1-26A
D1-0025_ID SURABAYA	D1-32A ID	D1-38A 0,982	D1-48A 0,980	D1-49A 1,000	DEN-1 RefSeq 0,991	0,994	1,000	1,000	0,980
0,994	0,977	0,997	0,991	0,982	0,988				
D1-0031_ID SURABAYA	0,982	ID 0,982	ID 0,971	0,982	0,982	0,977	0,982	0,982	0,985
0,982	0,988	0,980	0,977	0,994	0,980				
D1-B001_ID BALI	0,980	0,971	ID 0,980	0,980	0,982	0,974	0,980	0,980	0,974
0,974	0,974	0,977	0,971	0,971	0,991				
D1-J007_ID JAKARTA	1,000	0,982	0,980	ID 0,982	0,991	0,994	1,000	1,000	0,980
0,994	0,977	0,997	0,991	0,982	0,988				
D1-B007_ID BALI	0,991	0,982	0,982	0,991	ID 0,985	0,991	0,991	0,991	0,980
0,985	0,977	0,988	0,982	0,991					
D1-B015_ID BALI	0,994	0,977	0,974	0,994	0,985	ID 0,994	0,994	0,974	
0,988	0,971	0,991	0,985	0,977	0,982				
D1-J003_ID JAKARTA	1,000	0,982	0,980	1,000	0,991	0,994	ID 1,000	0,980	
0,994	0,977	0,997	0,991	0,982	0,988				
D1-3A_ID SURABAYA	1,000	0,982	0,980	1,000	0,991	0,994	1,000	ID 0,980	
0,994	0,977	0,997	0,991	0,982	0,988				
D1-26A_ID SURABAYA	0,980	0,985	0,974	0,980	0,980	0,974	0,980	0,980	ID
0,985	0,985	0,977	0,971	0,985	0,982				
D1-27A_ID SURABAYA	0,994	0,982	0,974	0,994	0,985	0,988	0,994	0,994	0,985
ID 0,977	0,991	0,985	0,982	0,982					
D1-32A_ID SURABAYA	0,977	0,988	0,974	0,977	0,977	0,971	0,977	0,977	0,985
0,977	ID 0,974	0,971	0,988	0,980					
D1-38A_ID SURABAYA	0,991	0,980	0,977	0,997	0,988	0,991	0,997	0,997	0,977
0,991	0,974	ID 0,988	0,980	0,985					
D1-48A_ID SURABAYA	0,991	0,977	0,971	0,991	0,982	0,985	0,991	0,991	0,971
0,985	0,971	0,988	ID 0,977	0,980					
D1-49A_ID SURABAYA	0,982	0,994	0,971	0,982	0,982	0,977	0,982	0,982	0,985
0,982	0,988	0,980	0,977	ID 0,980					
DEN-1 RefSeq NS1	0,988	0,980	0,991	0,988	0,991	0,982	0,988	0,988	0,982
0,982	0,980	0,985	0,980	0,980	ID				

Alignment: D:\Alignment Dengue\DEN-2 NS1-Surabaya samples_aligned.fas

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50          60
D2-0011_ID  GATAGTGGTT GCGTTGTGAG TTGGAAAAAC AAAGAACTGA AATGTGGCAG TGGGATTTTT
D2-M004_ID  GATAGTGGTT GCGTTGTGAG CTGGAAAAAT AAAGAACTGA AATGTGGCAG TGGGATTTTT
D2-J004_ID  GATAGTGGTT GCGTTGTGAG TTGGAAAAAC AAAGAACTGA AATGTGGCAG TGGGATTTTT
D2-M022_ID  GATAGTGGTT GCGTTGTGAG CTGGAAAAAC AAAGAACTGA AATGTGGCAG TGGGATTTTT
D2-J002_ID  GATAGTGGTT GCGTTGTGAG TTGGAAAAAC AAAGAACTGA AATGTGGCAG TGGGATTTTT
DEN-2_NS1_  GATAGTGGTT GCGTTGTGAG CTGGAAAAAC AAAGAACTGA AATGTGGCAG TGGGATTTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          70          80          90          100         110         120
D2-0011_ID  ATCACAGACA ACGTACACAC ATGGACAGAA CAATACAAAT TCCAACCAGA ATCCCTTCA
D2-M004_ID  ATCACAGACA ACGTGCACAC ATGGACAGAA CAATACAAAT TCCAACCAGA ATGCCCTTCA
D2-J004_ID  ATCACAGACA ACGTACACAC ATGGACAGAA CAATACAAAT TCCAACCAGA ATCCCTTCA
D2-M022_ID  ATCACAGACA ACGTGCACAC ATGGACAGAA CAATACAAAT TCCAACCAGA ATCCCTTCA
D2-J002_ID  ATCACAGACA ATGTGCACAC ATGGACAGAA CAATACAAAT TCCAACCAGA ATCCCTTCA
DEN-2_NS1_  ATCACAGACA ACGTGCACAC ATGGACAGAA CAATACAAGT TCCAACCAGA ATCCCTTCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          130         140         150         160         170         180
D2-0011_ID  AAGCTGGCTT CAGCTATCCA GAAGGCTCAT GAAGAAGGCA TTTGTGGAAT CCGCTCAGTA
D2-M004_ID  AAGCTGGCTT CAGCTATCCA GAAGGCTCAT GAAGAAGGCA TTTGTGGAAT CCGCTCAGTA
D2-J004_ID  AAGCTGGCTT CAGCTATCCA GAAGGCTCAT GAAGAAGGCA TTTGTGGAAT CCGCTCAGTA
D2-M022_ID  AAGCTGGCTT CAGCTATCCA GAAGGCTCAT GAAGAAGGCA TTTGTGGAAT CCGCTCAGTA
D2-J002_ID  AAGCTGGCTT CAGCTATCCA GAAGGCTCAT GAAGAAGGCA TTTGTGGAAT TCGCTCAGTA
DEN-2_NS1_  AACTAGCTT  CAGCTATCCA GAAAGCCAT  GAAGAGGGCA TTTGTGGAAT CCGCTCAGTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          190         200         210         220         230         240
D2-0011_ID  ACAAGACTGG AGAATTTGAT GTGGAACAAA ATAACACCAG AATTGAATCA CATTCTATCA
D2-M004_ID  ACAAGACTGG AGAATTTGAT GTGGAACAAA ATAACACCAG AACTGAATCA CATTCTAACA
D2-J004_ID  ACAAGACTAG AGAATCTGAT GTGGAACAAA ATAACACCAG AACTGAATCA CATTCTATCA
D2-M022_ID  ACAAGACTGG AGAATCTGAT GTGGAACAAA ATAACACCAG AACTGAATCA CATTCTAACA
D2-J002_ID  ACAAGACTGG AGAATCTGAT GTGGAACAAA ATAACACCAG AACTGAATCA CATTCTATCA
DEN-2_NS1_  ACAAGACTGG AGAATCTGAT GTGGAACAAA ATAACACCAG AATTGAATCA CATTCTATCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          250         260         270         280         290         300
D2-0011_ID  GAAAATGAGG TAAAGTTGAC TATCATGACA GGAGACATTA AAGGAATCAT GCAGGCAGGA
D2-M004_ID  GAAAATGAGG TAAAGTTGAC TATCATGACA GGAGACATTA AAGGAATCAT GCAGGCAGGA
D2-J004_ID  GAAAATGAGG TAAAGTTGAC TATCATGACA GGAGACATTA AAGGAATCAT GCAGGCAGGA
D2-M022_ID  GAAAATGAGG TAAAGTTGAC TATCATGACG GGAGACATTA AAGGAATCAT GCAGGCAGGA
D2-J002_ID  GAAAATGAGG TAAAGTTGAC TATCATGACA GGAGACATTA AAGGAATCAT GCAGGCAGGA
DEN-2_NS1_  GAAAATGAGG TGAAGTTAAC TATTATGACA GGAGACATCA AAGGAATCAT GCAGGCAGGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310         320         330         340         350         360
D2-0011_ID  AAACGTTCCT TCGGGCCTCA ACCCACTGAG CTGAAGTACT CTTGGAAAAC ATGGGGCAAG
D2-M004_ID  AAACGATCCC TCGGGCCTCA ACCCACTGAG CTGAAGTACT CTTGGAAAAGC ATGGGGCAAAA
D2-J004_ID  AAACGATCCC TCGGGCCTCA ACCCACTGAG TTGAAGTACT CTTGGAAAAGC ATGGGGCAAAA
D2-M022_ID  AAACGATCCC TCGGGCCTCA ACCCACTGAG CTGAAGTACT CTTGGAAAAGC ATGGGGCAAAA
D2-J002_ID  AAACGATCCC TCGGGCCTCA ACCCACTGAG CTGAAGTACT CTTGGAAAAGC ATGGGGCAAG
DEN-2_NS1_  AAACGATCTC TCGGGCCTCA GCCCACTGAG CTGAAGTATT CATGGAAAAC ATGGGGCAAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          370         380         390         400         410         420
D2-0011_ID  GCGAAAATGC TCTCCACAGA ACTTCATAAC CACACCTTTC TCATTGATGG CCCCGBAAACA
D2-M004_ID  GCGAAAATGC TCTCCACAGA GCTTCATAAC CACACCTTTC TCATTGATGG CCCCGBAAACA
D2-J004_ID  GCGAAAATGC TCTCTACAGA GCTTCATAAC CACACCTTTC TCATTGATGG CCCCGBAAACA
D2-M022_ID  GCGAAAATGC TCTCCACAGA ACTTCATAAC CACACCTTTC TCATTGATGG CCCCGBAAACA
D2-J002_ID  GCGAAAATGC TCTCCACAGA GCTTCATAAC CACACCTTTC TCATTGATGG CCCCGBAAACA
DEN-2_NS1_  GCAAAAATGC TCTCTACAGA GTCTCATAAC CAGACCTTTC TCATTGATGG CCCCGBAAACA

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      430      440      450      460      470      480
D2-0011_ID GCAGAAATGTC CCAACACAAA CAGAGCTTGG AACTCACTAG AAGTTGAAGA CTATGGCTTT
D2-M004_ID GCAGAAATGTC CCAACACAAA CAGAGCTTGG AACTCACTAG AAGTTGAAGA CTATGGCTTT
D2-J004_ID GCAGAAATGTC CCAACACAAA CAGAGCTTGG AACTCACTAG AAGTTGAAGA CTATGGCTTT
D2-M022_ID GCAGAAATGTC CCAACACAAA CAGAGCTTGG AACTCACTAG AAGTTGAAGA CTATGGCTTT
D2-J002_ID GCAGAAATGTC CCAACACAAA CAGAGCTTGG AACTCACTAG AAGTTGAAGA CTATGGCTTT
DEN-2_NS1_ GCAGAAATGCC CCAACACAAA TAGAGCTTGG AATTCGTTGG AAGTTGAAGA CTATGGCTTT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      490      500      510      520      530      540
D2-0011_ID GGAGTATTTA CCACCAACAT ATGGCTGAAA TTGAAAGAAA GGCAGGATGT ATTCTGTGAC
D2-M004_ID GGAGTATTCA CCACTAACAT ATGGCTGAAA TTGAAAGAAA GGCAGGATGT ATCTTGTGAC
D2-J004_ID GGAGTATTTA CCACCAACAT ATGGCTGAAA TTGAAAGAAA GGCAGGATGT ATTTTGTGAC
D2-M022_ID GGAGTATTCA CCACTAACAT ATGGCTGAAA TTGAAAGAAA GGCAGGATGT ATTTTGTGAC
D2-J002_ID GGAGTATTCA CCACCAACTT ATGGCTGAAA TTGAAAGAGA GGCAGGATGT ATTTTGTGAC
DEN-2_NS1_ GGAGTATTCA CCACCAATAT ATGGCTAAAA TTGAAAGAAA AACAGGATGT ATTCGTGCAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      550      560      570      580      590      600
D2-0011_ID TCAAAACTCA TGTCAGCAGC CATAAAAGAC AACAGAGCCA TCCACGCCGA TATGGGTTAT
D2-M004_ID TCAAAACTCA TGTCAGCAGC CATAAAAGAC AACAGAGCCG TCCACGCCGA CATGGGTTAT
D2-J004_ID TCAAAACTCA TGTCAGCAGC CATAAAAGAC AGCAGAGCCG TCCACGCCGA TATGGGTTAT
D2-M022_ID TCAAAACTCA TGTCAGCAGC CATAAAAGAC AACAGAGCCG TCCACGCCGA CATGGGTTAT
D2-J002_ID TCAAAACTCA TGTCGGCAGC CATAAAAGAC AACAGAGCCG TCCACGCCGA TATGGGTTAT
DEN-2_NS1_ TCAAAACTCA TGTCAGCGGC CATAAAAGAC AACAGAGCCG TCCATGCCGA TATGGGTTAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      610      620      630      640      650      660
D2-0011_ID TGGATAGAAA GCGCACTCAA TGACACATGG AAGATTGAGA AGGCCTCTTT TATTGAAGTT
D2-M004_ID TGGATAGAAA GCGCACTCAA TGACACATGG AAGATTGAGA AAGCCTCTTT TATTGAAGTT
D2-J004_ID TGGATAGAAA GCGCACTCAA TGACACATGG AAGATTGAGA AAGCCTCTTT TATTGAAGTT
D2-M022_ID TGGATAGAAA GCGCACTCAA TGACACATGG AAGATTGAGA AAGCCTCTTT TATTGAAGTT
D2-J002_ID TGGATAGAAA GCGCACTCAA TGACACATGG AAGATTGAGA AAGCCTCTTT TATTGAAGTT
DEN-2_NS1_ TGGATAGAAA GTGCACTCAA TGACACATGG AAGATAGAGA AAGCCTCTTT CATTGAAGTT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      670      680      690      700      710      720
D2-0011_ID AAAAGCTGCC ACTGGCCAAA GTCACACACT CTCTGGAGTA ATGGAGTGCT AGAAAGTGAG
D2-M004_ID AAAAGCTGCC ACTGGCCAAA GTCACACACT CTCTGGAGTA ATGGAGTGCT AGAAAGTGAG
D2-J004_ID AAAAGCTGCC ACTGGCCAAA GTCACACACT CTCTGGAGTA ATGGAGTGCT AGAAAGTGAG
D2-M022_ID AAAAGCTGCC ACTGGCCAAA GTCACACACT CTCTGGAGTA ATGGAGTGCT AGAAAGTGAG
D2-J002_ID AAAAGCTGCC ACTGGCCAAA GTCACACACT CTCTGGAGTA ATGGAGTGCT AGAAAGTGAG
DEN-2_NS1_ AAAAAGCTGCC ACTGGCCAAA ATCACACACC CTCTGGAGCA ATGGAGTGCT AGAAAGTGAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      730      740      750      760      770      780
D2-0011_ID ATGATAATTC CAAAAAATTT TGCAGGACCA GTGTCACAAC ACAATTACAG ACCAGGCTAT
D2-M004_ID ATGATAATTC CAAAGAATTT TGCAGGACCA GTGTCACAAC ACAATTACAG ACCAGGCTAC
D2-J004_ID ATGATAATTC CAAAGAATTT TGCAGGACCA GTGTCACAAC ACAATTACAG ACCAGGCTAT
D2-M022_ID ATGATAATTC CAAAGAATTT TGCAGGACCA GTGTCACAAC ACAATTACAG ACCAGGCTAC
D2-J002_ID ATGATAATTC CAAAGAATTT TGCAGGACCA GTGTCACAAC ACAATTACAG ACCAGGCTAT
DEN-2_NS1_ ATGATAATTC CAAAGAATCT CGTGGACCA GTGTCTCAAC ACAACTATAG ACCAGGCTAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      790      800      810      820      830      840
D2-0011_ID CATAACAAA CCGCAGGACC CTGGCATCTA GGCAGGCTTG AGATGGACTT CGATTCTGTC
D2-M004_ID CATAACAAA CCGCCGGACC CTGGCATTTA GGCAGGCTTG AGATGGACTT TGATTCTGTC
D2-J004_ID CATAACAAA CCGCAGGACC CTGGCATCTA GGCAGGCTTG AGATGGACTT CGATTCTGTC
D2-M022_ID CATAACAAA CCGCAGGACC CTGGCATCTA GGCAGGCTTG AGATGGACTT TGATTCTGTC
D2-J002_ID CATAACAAA CCGCAGGACC CTGGCATCTA GGTAGGCTTG AGATGGACTT TGATTCTGTC
DEN-2_NS1_ CATAACAAA TAACAGGACC ATGGCATCTA GGTAAGCTTG AGATGGACTT TGATTCTGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      850      860      870      880      890      900

```

```

D2-0011_ID GAAGGAACCA CAGTGGTGGT GACTGAGGAC TGTGGAATA GAGGACCCTC TTTAAGAACA
D2-M004_ID GAAGGAACCA CAGTGGTGGT GACTGAGGAC TGTGGAATA GAGGACCCTC TTTAAGAACA
D2-J004_ID GAAGGAACCA CAGTGGTGGT GACTGAGGAC TGTGGAATA GAGGACCCTC TTTAAGAACA
D2-M022_ID GAAGGAACCA CAGTGGTGGT GACTGAGGAC TGTGGAATA GAGGACCCTC TTTAAGAACA
D2-J002_ID GAAGGAACCA CAGTGGTGGT GACTGAGGAC TGTGGAATA GAGGACCCTC TTTAAGAACA
DEN-2_NS1_ GATGGAACAA CAGTGGTAGT GACTGAGGAC TGCGGAATA GAGGACCCTC TTTGAGAACA
    
```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          910      920      930      940      950      960
D2-0011_ID ACTACTGCTT CTGGAAAAC CATAACAGAG TGGTGCTGCC GATCTGCAC ATTACCACCG
D2-M004_ID ACTACTGCTT CTGGAAAAC CATAACAGAA TGGTGCTGCC GATCTGCAC ATTACCACCG
D2-J004_ID ACTACTGCTT CTGGAAAAC CATAACAGAG TGGTGCTGCC GATCTGCAC ATTACCACCG
D2-M022_ID ACTACTGCTT CTGGAAAAC CATAACAGAG TGGTGCTGCC GATCTGCAC ATTACCACCG
D2-J002_ID ACTACTGCTT CTGGAAAAC CATAACAGAG TGGTGCTGCC GATCTGCAC ATTACCACCG
DEN-2_NS1_ ACCACTGCCT CTGGAAAAC CATAACAGAA TGGTGCTGCC GATCTGCAC ATTACCACCG
    
```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          970      980      990      1000     1010     1020
D2-0011_ID CTAAGGTACA GAGGTGAGGA CGGATGCTGG TATGGAATGG AAATTAGACC ATTGAAAGAG
D2-M004_ID CTAAGATACA GAGGTGAGGA TGGATGCTGG TATGGAATGG AAATCAGACC ATTGAAAGAG
D2-J004_ID CTAAGGTACA GAGGTGAGGA TGGATGCTGG TATGGAATGG AAATTAGACC ATTGAAAGAG
D2-M022_ID CTAAGGTACA GAGGTGAGGA TGGATGCTGG TATGGAATGG AAATCAGACC ATTGAAAGAG
D2-J002_ID CTAAGGTACA GAGGTGAGGA TGGATGCTGG TATGGAATGG AAATCAGACC ATTGAAAGAG
DEN-2_NS1_ CTAAGATACA GAGGTGAGGA TGGGTGCTGG TACGGGATGG AAATCAGACC ATTGAAAGAG
    
```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1030     1040     1050
D2-0011_ID AAAGAAGAGA ACTTGGTCAA CTCCTTGGTC ACAGCC
D2-M004_ID AAAGAAGAGA ACTTGGTCAA CTCCTTGGTC ACAGCC
D2-J004_ID AAAGAAGAGA ACTTGGTCAA CTCCTTGGTC ACAGCC
D2-M022_ID AAAGAAGAGA ACTTGGTCAA CTCCTTGGTC ACAGCC
D2-J002_ID AAAGAAGAGA ACTTGGTCAA CTCCTTGGTC ACAGCC
DEN-2_NS1_ AAAGAAGAGA ATTTGGTCAA CTCCTTGGTC ACAGCT
    
```

Alignment: D:\Alignment.Dengue\DEN-2 NS1-Surabaya samples_aligned.fas

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10      20      30      40      50
D2-0011_ID DSGCVVSWKN KELKCGSGIF ITDNVHTWTE QYKFQPEPSPS KLASAIQKAH
D2-M004_ID DSGCVVSWKN KELKCGSGIF ITDNVHTWTE QYKFQPECPSPS KLASAIQKAH
D2-J004_ID DSGCVVSWKN KELKCGSGIF ITDNVHTWTE QYKFQPEPSPS KLASAIQKAH
D2-M022_ID DSGCVVSWKN KELKCGSGIF ITDNVHTWTE QYKFQPEPSPS KLASAIQKAH
D2-J002_ID DSGCVVSWKN KELKCGSGIF ITDNVHTWTE QYKFQPEPSPS KLASAIQKAH
DEN-2_NS1_ DSGCVVSWKN KELKCGSGIF ITDNVHTWTE QYKFQPEPSPS KLASAIQKAH
    
```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60      70      80      90      100
D2-0011_ID EEGICGIRSV TRLENLMWKQ ITPELNHILS ENEVKLTIMT GDIKGIMQAG
D2-M004_ID EEGICGIRSV TRLENLMWKQ ITPELNHILT ENEVKLTIMT GDIKGIMQAG
D2-J004_ID EEGICGIRSV TRLENLMWKQ ITPELNHILS ENEVKLTIMT GDIKGIMQAG
D2-M022_ID EEGICGIRSV TRLENLMWKQ ITPELNHILT ENEVKLTIMT GDIKGIMQAG
D2-J002_ID EEGICGIRSV TRLENLMWKQ ITPELNHILS ENEVKLTIMT GDIKGIMQAG
DEN-2_NS1_ EEGICGIRSV TRLENLMWKQ ITPELNHILS ENEVKLTIMT GDIKGIMQAG
    
```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110     120     130     140     150
D2-0011_ID KRSLRPQPTL LKYSWKTWKG AKMLSTELHN HTFLIDGPET AECPNTNRAW
D2-M004_ID KRSLRPQPTL LKYSWKAWKG AKMLSTELHN HTFLIDGPET AECPNTNRAW
D2-J004_ID KRSLRPQPTL LKYSWKAWKG AKMLSTELHN HTFLIDGPET AECPNTNRAW
D2-M022_ID KRSLRPQPTL LKYSWKAWKG AKMLSTELHN HTFLIDGPET AECPNTNRAW
D2-J002_ID KRSLRPQPTL LKYSWKAWKG AKMLSTELHN HTFLIDGPET AECPNTNRAW
DEN-2_NS1_ KRSLRPQPTL LKYSWKTWKG AKMLSTESHN QTFLIDGPET AECPNTNRAW
    
```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160     170     180     190     200
    
```

```
D2-0011_ID NSLEVEDYGF GVFTTNIWLK LKERQDVFC SKLMSAAIKD NRAIHADMGY
D2-M004_ID NSLEVEDYGF GVFTTNIWLK LKERQDVSCD SKLMSAAIKD NRAVHADMGY
D2-J004_ID NSLEVEDYGF GVFTTNIWLK LKERQDVFC SKLMSAAIKD SRVHADMGY
D2-M022_ID NSLEVEDYGF GVFTTNIWLK LKERQDVFC SKLMSAAIKD NRAVHADMGY
D2-J002_ID NSLEVEDYGF GVFTTNIWLK LKERQDVFC SKLMSAAIKD NRAVHADMGY
DEN-2_NS1_ NSLEVEDYGF GVFTTNIWLK LKERQDVFC SKLMSAAIKD NRAVHADMGY
```

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210      220      230      240      250
D2-0011_ID WIESALNDTW KIEKASFIEV KSCHWPKSHT LWSNGVLESE MIIPKNFAGP
D2-M004_ID WIESALNDTW KIEKASFIEV KSCHWPKSHT LWSNGVLESE MIIPKNFAGP
D2-J004_ID WIESALNDTW KIEKASFIEV KSCHWPKSHT LWSNGVLESE MIIPKNFAGP
D2-M022_ID WIESALNDTW KIEKASFIEV KSCHWPKSHT LWSNGVLESE MIIPKNFAGP
D2-J002_ID WIESALNDTW KIEKASFIEV KSCHWPKSHT LWSNGVLESE MIIPKNFAGP
DEN-2_NS1_ WIESALNDTW KIEKASFIEV KNCHWPKSHT LWSNGVLESE MIIPKNLAGP
```

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      260      270      280      290      300
D2-0011_ID VSQHNYRPGY HTQTAGPWHL GRLEMDFDFC EGTTVVVTEG CGNRGPSLRT
D2-M004_ID VSQHNYRPGY HTQTAGPWHL GRLEMDFDFC EGTTVVVTEG CGNRGPSLRT
D2-J004_ID VSQHNYRPGY HTQTAGPWHL GRLEMDFDFC EGTTVVVTEG CGNRGPSLRT
D2-M022_ID VSQHNYRPGY HTQTAGPWHL GRLEMDFDFC EGTTVVVTEG CGNRGPSLRT
D2-J002_ID VSQHNYRPGY HTQTAGPWHL GRLEMDFDFC EGTTVVVTEG CGNRGPSLRT
DEN-2_NS1_ VSQHNYRPGY HTQITGPWHL GKLEMDFDFC DGTTVVVTEG CGNRGPSLRT
```

```
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310      320      330      340      350
D2-0011_ID TTASGKLITE WCCRCTLPP LRYRGEDGCW YGMEIRPLKE KEENLVNSLV
D2-M004_ID TTASGKLITE WCCRCTLPP LRYRGEDGCW YGMEIRPLKE KEENLVNSLV
D2-J004_ID TTASGKLITE WCCRCTLPP LRYRGEDGCW YGMEIRPLKE KEENLVNSLV
D2-M022_ID TTASGKLITE WCCRCTLPP LRYRGEDGCW YGMEIRPLKE KEENLVNSLV
D2-J002_ID TTASGKLITE WCCRCTLPP LRYRGEDGCW YGMEIRPLKE KEENLVNSLV
DEN-2_NS1_ TTASGKLITE WCCRCTLPP LRYRGEDGCW YGMEIRPLKE KEENLVNSLV
```

..

```
D2-0011_ID TA
D2-M004_ID TA
D2-J004_ID TA
D2-M022_ID TA
D2-J002_ID TA
DEN-2_NS1_ TA
```

Sequence Identity Matrix

Input Alignment File: D:\Alignment Dengue\DEN-2 NS1-Surabaya samples_aligned.fas

	D2-0011	D2-M004	D2-J004	D2-M022	D2-J002	DEN-2_NS1_RefSeq
D2-0011_ID_SURABAYA	ID	0,972	0,982	0,975	0,976	0,921
D2-M004_ID_MEDAN	0,972	ID	0,973	0,989	0,975	0,923
D2-J004_ID_JAKARTA	0,982	0,973	ID	0,978	0,977	0,920
D2-M022_ID_MEDAN	0,975	0,989	0,978	ID	0,980	0,926
D2-J002_ID_JAKARTA	0,976	0,975	0,977	0,980	ID	0,925
DEN-2_NS1_RefSeq	0,921	0,923	0,920	0,926	0,925	ID

Alignment: D:\Alignment Dengue\DEN-3 NS1-Surabaya samples_aligned.fas

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50
D3-0006_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-0019_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-0023_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-0024_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-0027_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-0030_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-B008_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-K013_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-M017_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-J013_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-J019_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-J026_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-83A_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-114A_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
D3-124A_ID DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW
DEN-3 NS1 DMGCVINWKG KELKCGSGIF VTNEVHTWTE QYKFQADSPK RLATAIAGAW

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60          70          80          90         100
D3-0006_ID ENGVCGIRST TRMENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGILEQG
D3-0019_ID ENGVCGIRST TRMENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGILEQG
D3-0023_ID ENGVCGIRST TRMENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGILEQG
D3-0024_ID ENGVCGIRST TRMENLLWRQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGILEQG
D3-0027_ID ENGVCGIRST TRLENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGVLEQG
D3-0030_ID ENGVCGIRST TRMENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGILEQG
D3-B008_ID ENGVCGIRST TRMENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGILEQG
D3-K013_ID EKGVCGIRST TRMENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDVIGVLEQG
D3-M017_ID ENGVCGIRST TRMENLLWKQ IVNELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGILEQG
D3-J013_ID ENGVCGIRST TRMENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGILEQG
D3-J019_ID ENGVCGIRST TRMENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGVLEQG
D3-J026_ID ENGVCGIRST TRMENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGVLEQG
D3-83A_ID ENGVCGIRST TRMENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGVLEQG
D3-114A_ID ENGVCGIRST TRMENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGVLEQG
D3-124A_ID ENGVCGIRST TRMENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDIIGILEQG
DEN-3 NS1 ENGVCGIRST TRMENLLWKQ IANELNYILW ENNIKLTVVV GDTLGVLEQG

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          110         120         130         140         150
D3-0006_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPNASRAW
D3-0019_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPNASRAW
D3-0023_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPNASRAW
D3-0024_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPNASRAW
D3-0027_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPNASRAW
D3-0030_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPNASRAW
D3-B008_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPNASRAW
D3-K013_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPSASRAW
D3-M017_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPNASRAW
D3-J013_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPNASRAW
D3-J019_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPNASRAW
D3-J026_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPNASRAW
D3-83A_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPNASRAW
D3-114A_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPNASRAW
D3-124A_ID KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPHASRAW
DEN-3 NS1 KRTLTPQPM LKYSWKTWKG AKIVTAETQN SSFIIDGPNTE PECPSASRAW

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160         170         180         190         200
D3-0006_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYSQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
D3-0019_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYSQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
D3-0023_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYSQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
D3-0024_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYSQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
D3-0027_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYSQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
D3-0030_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYSQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
D3-B008_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYSQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
D3-K013_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYSQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
D3-M017_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYSQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY

```

D3-J013_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYSQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
 D3-J019_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYTQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
 D3-J026_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYTQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
 D3-83A_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYTQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
 D3-114A_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYTQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
 D3-124A_ID NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYTQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY
 DEN-3 NS1 NVWEVEDYGF GVFTTNIWLK LREMYTQLCD HRLMSAAVKD ERAVHADMGY

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 210 220 230 240 250

D3-0006_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-0019_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-0023_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-0024_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-0027_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-0030_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-B008_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-K013_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-M017_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCIWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-J013_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-J019_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-J026_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-83A_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-114A_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 D3-124A_ID WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWSNGVLESD MIIPKSLAGP
 DEN-3 NS1 WIESQKNGSW KLEKASLIEV KTCTWPKSHT LWTNGVLESD MIIPKSLAGP

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 260 270 280 290 300

D3-0006_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-0019_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-0023_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-0024_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-0027_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-0030_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-B008_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-K013_ID VSQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-M017_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-J013_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-J019_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-J026_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-83A_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-114A_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 D3-124A_ID ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT
 DEN-3 NS1 ISQHNYPGY HTQTAGPWHL GKLELDFNYC EGTTVVITEN CGTRGPSLRT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 310 320 330 340 350

D3-0006_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVKSLV
 D3-0019_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE REENMVKSLV
 D3-0023_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVKSLV
 D3-0024_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVKSLV
 D3-0027_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVKSLV
 D3-0030_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE REENMVKSLV
 D3-B008_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVKSLV
 D3-K013_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVKSLV
 D3-M017_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVKSLV
 D3-J013_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVRSV
 D3-J019_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVKSLV
 D3-J026_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVKSLV
 D3-83A_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVKSLV
 D3-114A_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVKSLV
 D3-124A_ID TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE REENMVKSLV
 DEN-3 NS1 TTVSGKLIHE WCCRSTLPP LRYMGEDGCW YGMEIRPINE KEENMVKSLV

..

D3-0006_ID SA
 D3-0019_ID SA