

# DEMAM BERDARAH DENGUE ( DBD ) DAN NS1 ANTIGEN UNTUK DETEKSI DINI INFEKSI AKUT VIRUS DENGUE

Meddy Setiawan\*

## Abstrak

Demam Berdarah Dengue (DBD) atau Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) disebabkan oleh infeksi virus dengue. Virus dengue merupakan virus RNA yang termasuk dalam famili flaviviridae, genus flavivirus dan ada 4 serotipe yang berbeda yaitu DEN1, DEN 2, DEN 3, dan DEN 4. Keempat serotipe terdapat di Indonesia dengan dominasi DEN 3 dan DEN 2. Dengue ini telah menjangkiti lebih dari 100 negara, di daerah tropik maupun subtropik. WHO memperkirakan sekitar 50-100 juta kasus infeksi virus dengue terjadi setiap tahun dengan 24.000 kematian setiap tahunnya. Virus dengue ini dapat ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus* sebagai vektornya dengan masa inkubasi rata-rata 4-6 hari. Infeksi virus dengue dapat menyebabkan manifestasi klinis yang bervariasi mulai dari asimtomatik sampai manifestasi klinis yang berat yang mengakibatkan kematian. Demam dengue merupakan manifestasi klinis yang ringan, sedangkan DBD/DHF dan Dengue Shock Syndrome (DSS) merupakan manifestasi klinis yang berat. Berbagai teori menjelaskan patogenesis DBD dan DSS dan saling kontroversi. Saat ini teori yang banyak dianut adalah teori Antibody Dependent Enhancement (ADE). Menurut teori ini, infeksi sekunder yang disebabkan oleh virus dengue dengan serotipe yang berbeda dengan infeksi primer akan menimbulkan antibodi heterologous yang dibentuk pada infeksi pertama namun tidak bisa mengeliminasi virus dengue pada infeksi sekunder (bersifat subnetralisasi) bahkan antibodi tersebut bersifat opsonisasi sehingga sel target menjadi lebih mudah diinfeksi oleh virus dan menyebabkan manifestasi klinis yang lebih berat. Berbagai teknik pemeriksaan untuk mendeteksi infeksi virus dengue yaitu pemeriksaan kultur dan isolasi virus, RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), serologi (anti dengue IgG dan IgM) dan juga pemeriksaan hematologi rutin. Kultur virus atau PCR saat ini dianggap sebagai gold standard untuk mendeteksi virus dengue, namun memiliki keterbatasan dalam hal biaya dan teknis pengerjaannya. Pemeriksaan serologi anti dengue IgG dan IgM memiliki keterbatasan yaitu tidak dapat mendeteksi infeksi dengan lebih awal. Saat ini dikembangkan pemeriksaan baru terhadap antigen non struktural-1 dengue (NS1) yang dapat mendeteksi infeksi virus dengue lebih awal bahkan pada hari pertama onset demam

Kata kunci : DHF, NS1, IgG/IgM.

## Respon Imun Pada Infeksi Virus Dengue

Infeksi virus dengue menyebabkan timbulnya respon imun baik respon imun bawaan maupun respon imun yang didapat (humoral dan seluler). Respon imun bawaan melibatkan berbagai sel dalam sistem imun bawaan misalnya monosit, lekosit polimorfonuklear, *natural killer cell*. Respon imun humoral diperankan oleh antibodi sedangkan respons imun selular diperankan oleh *MHC class II – restricted CD4 T cells* dan *MHC class I – restricted CD8 T cells*. (Hadinegoro SR. 1999)

## Respon Antibodi Pada infeksi Primer dan Sekunder

Antibodi yang terbentuk pada infeksi virus dengue adalah antibodi netralisasi, antihemaglutinin dan antikomplemen yang pada umumnya termasuk kelas IgG, selain itu dibentuk juga IgM. Antibodi IgM akan berada di dalam darah sekitar panas hari ke-5 meningkat pada minggu

pertama sampai dengan ketiga, dan menghilang setelah 60-90 hari. Pada infeksi primer antibodi IgG meningkat sekitar panas hari ke -14 sedangkan pada infeksi sekunder antibodi IgG telah meningkat pada hari ke-2. Oleh karena itu diagnosis dini infeksi primer hanya dapat ditegakkan dengan mendeteksi antibodi IgM setelah hari ke-5, sedangkan diagnosis infeksi sekunder dapat ditegakkan lebih dini dengan adanya peningkatan antibodi IgG yang cepat. (Hadinegoro SR. 1999)

## Pemeriksaan Laboratorium Infeksi Virus Dengue

Pemeriksaan laboratorium untuk infeksi virus dengue ada yang bersifat spesifik dan non-spesifik. Pemeriksaan yang bersifat spesifik diantaranya isolasi virus / identifikasi virus dan pemeriksaan serologi (uji hambatan hemaglutinasi (HAI), anti dengue IgM dan IgG (ELISA). Pemeriksaan yang bersifat non-spesifik misalnya pemeriksaan hematologi dan radiologi. Saat ini telah dikembangkan suatu pemeriksaan baru terhadap antigen non struktural-1 dengue (NS1) yang dapat mendeteksi infeksi virus dengue dengan lebih awal bahkan pada hari pertama onset demam. (Kaniawati M, 1996)

\* Staff Akademik Pada Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang

## Struktur genom dan replikasi virus dengue

Virus dengue merupakan virus RNA rantai tunggal (*single stranded / ssRNA*) yang termasuk ke dalam famili flaviviridae, genus flavivirus dan terdapat 4 serotipe yang berbeda yaitu DEN 1, DEN 2, DEN 3, dan DEN 4. Keempat serotipe tersebut didapati di Indonesia. Virus dengue memiliki genom 11 kb. Genom tersebut mengkode 10 macam protein virus yaitu 3 protein struktural (*C/protein Core, M/protein Membrane, E/protein Envelope*) dan 7 protein non struktural (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4b, dan NS5). Pada saat virus masuk ke sel melalui proses endositosis yang diperantarai reseptor, genom virus yang terdiri dari ssRNA akan dilepaskan ke dalam sitoplasma dan digunakan sebagai cetakan / *template* untuk proses translasi menjadi prekursor protein yang besar. Pemotongan pada bagian terminal dari poliprotein ini oleh enzim-enzim sel inang / *host* (signalase, furin) akan menghasilkan protein-protein struktural yang membentuk partikel virus yang berselubung. Poliprotein yang tersisa dibutuhkan untuk menghasilkan lebih banyak virus. Protein-protein non struktural virus tersebut diduga bersama-sama dengan protein-protein *host* yang belum diketahui, membentuk mesin replikasi di dalam sitoplasma sel-sel yang terinfeksi yang mengkatalisis perbanyakannya RNA. Sebagai contoh NS3 dan NS5 memiliki aktivitas *protease, helicase, polymerase* yang sangat berperan pada proses replikasi. NS3 hanya akan aktif bila berikatan dengan NS2b di mana NS2b juga berperan pada protein *folding*. RNA yang baru dihasilkan kemudian digunakan kembali untuk proses translasi dan menghasilkan kembali protein-protein virus, untuk sintesis lebih banyak RNA virus atau untuk enkapsidasi ke dalam partikel virus. Pada akhirnya virion meninggalkan sel dengan proses eksositosis yang sering menyebabkan kematian sel. (Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, 2002)

### Protein non structural-1 (NS1 dengue)

NS1 adalah glikoprotein non struktural dengan berat molekul 46-50 kD dan merupakan glikoprotein yang sangat *conserved*. Pada mulanya NS1 digambarkan sebagai suatu antigen *Soluble Complement Fixing* (SCF) pada kultur sel yang terinfeksi. NS1 diperlukan untuk kelangsungan hidup virus namun tidak diketahui dengan pasti aktivitas biologisnya. Dari bukti yang sudah ada menunjukkan bahwa NS1 terlibat dalam proses replikasi virus. NS1 dihasilkan dalam 2 bentuk yaitu *membrane associated* (mNS1) dan *secreted form* (sNS1). NS1 pada mulanya ditranslokasikan ke retikulum endoplasma melalui sekuens *signal hidrofobik* yang dikode di bagian C terminal E, dan secara cepat didimerisasi di dalam organel-organel intrasel, kemudian ditransfer ke membran sitoplasma. NS1 dilepaskan dalam bentuk *hexameric solubilized* (sNS1),

yang dibentuk dari 3 sub unit dimerik yang heksamerdihubungkan secara kovalen. Selama infeksi sel, NS1 ditemukan berkaitan dengan organel-organel intrasel atau ditransfer melalui jalur sekresi ke permukaan sel (membran sitoplasma). Bentuk yang larut dilepaskan dari sel mamalia yang terinfeksi. NS1 bukan bagian dari struktur virus tetapi diekspresikan pada permukaan sel yang terinfeksi dan memiliki determinan-determinan dan spesifik grup dan tipe. NS1 flavivirus telah dikenal sebagai imunogen yang penting dan menunjukkan peran dalam proteksi terhadap penyakit. Namun, peran NS1 dalam imunopatogenitas juga telah dikemukakan berdasarkan temuan anti-SCF antibodies dalam serum pasien-pasien dengan infeksi sekunder tetapi tidak pada infeksi primer. (Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, 2002)

### NS1 dan infeksi dengue

NS1 dengue disekresikan ke dalam sistem darah pada individu-individu yang terinfeksi dengan virus dengue. NS1 bersirkulasi pada konsentrasi yang tinggi di dalam serum pasien dengan infeksi primer maupun sekunder selama fase klinik sakit (*clinical phase of illness*) dan hari-hari pertama fase konvalesens (pemulihan). Dari penelitian juga ditunjukkan bahwa deteksi NS1 dapat memberikan diagnosis spesifik infeksi dengue. (Rothman AL, 2004)

### Hasil penelitian NS1

Dussart dkk melakukan penelitian terhadap 299 sampel serum dari pasien dengan dengue disease yang terdiri dari 42 kasus DEN-1, 43 kasus DEN-2, 109 kasus DEN-3, 49 kasus DEN-4 dan 56 tidak diketahui serotipenya (5 sampel serum fase akut onset hari ke 3-4, 51 fase konvalesens onset hari ke 5-10). Dussart juga menambahkan 50 sampel serum fase akut hari 1-4 pasien yang menunjukkan *dengue like syndrome* (tapi bukan dengue) dan 20 sampel serum *yellow fever*. Sampel serum yang terinfeksi dengue dibagi 2 yaitu serum fase akut (hari ke 0-4) dan *early convalescence* (hari ke 5-10). Semua sampel kemudian diperiksa MAC ELISA (*IgM antibody Captured ELISA*) dan NS1 dengue. Dari penelitian tersebut diperoleh hasil sensitivitas NS1 terhadap PCR sebesar 85% dan terhadap kultur virus 94,1%, dengan sensitivitas total terhadap semua jenis serotype 88,7%. Sensitivitas pemeriksaan NS1 optimal antara hari ke 0-4, sementara pemeriksaan serologi dengan MAC ELISA sensitivitasnya hanya sebesar 8,6% pada waktu tersebut. Spesifisitas NS1 dengue diperoleh sebesar 100%. Kombinasi pemeriksaan NS1 dengue pada fase akut dan MAC ELISA pada fase konvalesens akan meningkatkan sensitivitas dari 88,7% menjadi 91,9%. (Dussart P, Labeau B, Lagathu G, 2006)

Penelitian lain dilakukan Kumarasamy dkk yang menggunakan sampel pasien yang sudah dikonfirmasi dengan RT-PCR dan atau isolasi virus. Dari penelitian tersebut diperoleh hasil bahwa sensitivitas reagen komersial dengue NS1 *antigen capture* ELISA untuk infeksi virus dengue akut sebesar 93,4% dan spesifitasnya 100%. Sensitivitas untuk dengue primer akut sebesar 97,3% dan untuk dengue akut sekunder sebesar 70%. Nilai ramal positif dan negative masing-masing sebesar 100% dan 97,3%. *Positive isolation rate* isolasi virus secara keseluruhan adalah sebesar 68% (73,9 % untuk dengue primer akut dan 31% untuk dengue sekunder akut), sedangkan *positive detection rate* RT-PCR secara keseluruhan adalah 66,7% (65,2% untuk dengue primer akut dan 75,9% untuk dengue sekunder akut). Dari hasil penelitian tersebut, Kumarasamy menyimpulkan bahwa reagen komersial dengue NS1 *antigen capture* ELISA dapat lebih *superior* dibandingkan isolasi virus dan RT-PCR untuk diagnosis laboratorium infeksi dengue akut berdasarkan sampel tunggal. (Kumarasamy V, Abdul Wahab AH, Chua SK, 2007)

### Pemeriksaan dengue NS1 antigen

Saat ini telah tersedia reagen-reagen komersial untuk pemeriksaan dengue NS1 antigen. Reagen tersebut ada yang dibuat dalam format ELISA (*Enzym Linked Immunosorbent Assay*) dan ada juga yang dalam format imunokromatografi (*rapid strip test*) dengan sensitivitas dan spesifitas yang berbeda. Format imunokromatografi memiliki sensitivitas dan spesifitas sedikit dibawah reagen dengan format ELISA. Jenis sampel yang dapat digunakan untuk pemeriksaan dengue NS1 antigen adalah serum atau plasma. (Kaniawati M, 1996)

### Pemeriksaan-Pemeriksaan Laboratorium Lain Untuk Infeksi Virus Dengue

#### Isolasi Virus

Merupakan cara yang paling baik untuk diagnosis laboratorium adanya infeksi dengue karena langsung mengetahui jenis virus penyebab. Namun banyak kendala untuk isolasi virus ini karena dibutuhkan jumlah virus yang banyak pada sampel darah, dimana hal ini terjadi pada saat viremia yang berlangsung singkat hanya beberapa hari. Selain itu dibutuhkan waktu yang lama dalam pengerjakannya serta memerlukan peralatan yang khusus dan mahal termasuk untuk identifikasi virusnya. (Kaniawati M, 1996)

Tabel 1. Beberapa Metode Teknik Pemeriksaan Untuk Mendeteksi Infeksi Virus Dengue.

Metode	Keterbatasan
Kultur dan isolasi virus	Mahal. Membutuhkan peralatan yang khusus. Sulit dilakukan pada skala yang besar.
RT-PCR	Mahal Membutuhkan peralatan yang khusus. Sulit dilakukan pada skala yang besar.
Pemeriksaan serologi	Tidak dapat memberikan hasil yang cukup awal (IgM tidak diproduksi sampai hari ke-3 setelah onset gejala klinis)
Pemeriksaan hematologi (CBC, uji bendung)	Digunakan sebagai alat bantu diagnosis. Bukan merupakan metode diagnostik yang definitif (tidak spesifik).

Sumber : Kaniawati M, 1996

### Uji Hambatan Hemaglutinasi / Haemagglutination-Inhibiton (HAI)

Uji HAI merupakan gold standard bagi uji serologi yang lain. Namun memiliki keterbatasan dimana dibutuhkan 2 spesimen darah atau serum yaitu darah yang diambil pada saat penyakitnya masih akut dan darah konvalesen yang diambil paling sedikit 7 hari setelah pengambilan spesimen pertama. Adanya peningkatan titer sebanyak > 4 kali menunjukkan adanya infeksi, walaupun titer HAI  $\geq$  1:2560 untuk spesimen akut didefinisikan sebagai adanya infeksi sekunder dari flavivirus.

Selain membutuhkan waktu pemeriksaan yang lama, variasi antar laboratorium karena kemampuan hemaglutinin yang dibuat di laboratorium yang berbeda menyebabkan keraguan untuk aplikasi klasifikasi kasus dengue secara umum berdasarkan hambatan hemaglutinasi ini. (Hadinegoro SR. 1999)

### Anti Dengue IgM dan IgG (ELISA)

Berdasarkan IgM dan IgG yang timbul pada waktu infeksi dengue, maka dikembangkan uji laboratorium untuk mengukur konsentrasi anti dengue IgM dan IgG tersebut menggunakan metode ELISA. Metode ELISA ini merupakan suatu alternatif dari pemeriksaan hemaglutinasi inihibisi yang mempunyai kendala teknis dalam pengerjaannya. Metode ELISA memiliki sensitivitas dan spesifitas yang tinggi namun membutuhkan waktu pemeriksaan yang cukup lama (beberapa jam). (Hadinegoro SR. 1999)

### Anti Dengue IgM dan IgG Rapid Test

Saat ini telah banyak dikembangkan reagen untuk pemeriksaan anti dengue IgM dan IgG dengan metode pemeriksaan yang cepat (*rapid test*). Metode yang digunakan adalah imunokromatografi di mana pengerjaannya sangat sederhana dan hanya membutuhkan

waktu 15 menit sehingga hasil pemeriksaan dapat diperoleh dengan cepat. Reagen ini dapat mendeteksi antibodi terhadap keempat serotipe virus dengue dan dapat membedakan antara infeksi primer dengan infeksi sekunder. (Kaniawati M, 1996)

## PRINSIP PENELITIAN

Apabila dalam serum terdapat antibodi terhadap dengue baik dari kelas IgM dan IgG, maka antibodi tersebut akan berikatan dengan *anti-human* IgM atau IgG yang diimbolisasi / dilekatkan pada 2 garis pada strip pemeriksaan. Anti flavivirus monoclonal yang berlabel koloidal emas akan membentuk kompleks dengan antigen dengue yang kemudian ditangkap oleh IgM atau IgG spesifik dalam serum. Kompleks ini kemudian divisualisasikan sebagai suatu garis berwarna merah muda / ungu yang sementaramenunjukkan bahwa anti dengue IgM atau IgG terdapat di dalam serum. Sensitivitas pemeriksaan telah diatur sedemikian rupa sehingga pasien-pasien dengan infeksi dengue primer akan memiliki hasil IgM positif dengan hasil IgG negatif, pasien-pasien dengan infeksi dengue sekunder akan memiliki hasil IgG positif dengan atau tanpa IgM positif. Pada infeksi awal dan beberapa infeksi sekunder, konsentrasi antibodi IgM yang dapat terdeteksi sangat rendah. Beberapa pasien mungkin tidak menghasilkan yang terdeteksi dalam 7-10 hari pertama setelah infeksi. Oleh karena itu, apabila hasil pemeriksaan pertama negatif namun gejala infeksi dengue ada, sebaliknya pasien diperiksa ulang 3-4 hari setelah spesimen pertama. Dari satu penelitian di luar negeri yang menggunakan sepasang serum, diperoleh hasil bahwa infeksi virus dengue dapat didiagnosis pada pemeriksaan spesimen serum yang pertama yaitu 76% untuk infeksi primer dan 88% untuk infeksi sekunder. Sensitivitas tersebut akan meningkat masing-masing menjadi 100% dan 94% bila pemeriksaan dilakukan terhadap spesimen yang kedua. Reaksi silang secara serologis diantara kelompok flavivirus memang sering terjadi misalnya di antara DEN 1, DEN 2, DEN 3, dan DEN 4, *virus Japanese encephalitis (JE)* dan *virus yellow fever*. Pada penelitian yang melibatkan pasien JE, malaria, leptospirosis, scrub typhus dan pasien-pasien dengan gejala dengue tapi tanpa bukti laboratorium adanya infeksi dengue, menunjukkan bahwa spesifisitas reagen ini adalah 88% untuk IgM dan 99% untuk IgG. Dari hasil evaluasi klinis di beberapa center yaitu di ADRIMS (Bangkok), SGH (Singapura) dan UM (Malaysia) diperoleh hasil bahwa sensitivitas dan spesifisitas reagen anti dengue IgM dan IgG Rapid Strip Test adalah 99% dan 92%. (Young PR, Hilditch PA, Bietchly C, 2000)

## Pemeriksaan Hematologi

Untuk menunjang diagnosis DBD, dapat digunakan parameter-parameter laboratorium yang lain yaitu

pemeriksaan hematologi rutin misalnya adanya trombositopenia dan hemokonsentrasi yang selalu ditemui pada DBD. Bahkan trombositopenia dan hemokonsentrasi ini merupakan kriteria laboratoris WHO yang digunakan dalam menegakkan diagnosis demam berdarah dengue. (Kaniawati M, 1996)

## PENUTUP

Diagnosis yang dini dan tepat sangat penting untuk pengelolaan pasien DBD. Hal ini dapat dilakukan dengan melakukan pemeriksaan laboratorium yaitu pemeriksaan anti dengue IgM dan IgG rapid test yang dapat memberikan hasil yang cepat dan juga pemeriksaan hematologi rutin dalam membantu mengakkan diagnosis DBD tersebut. Pemeriksaan dengue NS1 antigen dapat mendeteksi infeksi akut lebih awal dibandingkan pemeriksaan *antibody dengue*. Deteksi lebih awal adanya infeksi dengue sangat penting karena kita dapat melakukan terapi suportif dan pemantauan pasien dengan segera dan hal ini tentu akan mengurangi resiko komplikasi seperti demam berdarah dengue dan *Degue Shock Syndrome*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, et al, 2002, Enzyme-linked Immunoassay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of the disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (2), pp 376-381.
- Dussart P, Labeau B, Lagathu G, et al, 2006, Evaluation of an Enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13 (11), pp 1185-1189
- Hadinegoro SR. 1999. *Demam Berdarah Dengue. Naskah Lengkap Pelatihan bagi Pelatih Dokter Spesialis Anak dan Dokter Spesialis Penyakit Dalam Tatalaksana Kasus DBD*. FKUI.
- Kaniawati M, 1996, Panel Pemeriksaan Laboratorik Untuk Demam. *Forum Diagnosticum*, 4.
- Kumarasamy V, Abdul Wahab AH, Chua SK, et al, 2007, Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *J.Virol.Method*, 140, pp 75-79

Rothman AL. 2004. Dengue : defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 113, pp 346-951.

Young PR, Hilditch PA, Bietchly C, et al, 2000, An Antigen capture enzyme linked immunosorbent assay reveal high level of the dengue virus protein nS1 in the sera of infected patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (3), pp 1053-1057