

# Pemeriksaan diagnostik infeksi Dengue

Patologi Klinik

# Pendahuluan

- Demam Dengue disebabkan → virus Dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) suatu Arbovirus (family Flaviviridae)
- Kebanyakan asimptomatik, dengan gejala klinis yg bervariasi dari ringan sampai berat (DHF dan DSS)
- Vasculopathy pada DHF ditandai dengan kebocoran pembuluh kapiler dan kelainan regulasi hematologis dan pada DSS terjadi shock hipovolemik

- Virus Dengue tdd:
  - protein struktural yaitu
    1. Protein core (C)
    2. Protein membrane(M)
    3. Protein envelope (E)
      - 7 protein nonstructural (NS)
- Protein envelope (glycoprotein) berhubungan dengan aktivitas hemaglutinasi dan aktivitas netralisasi

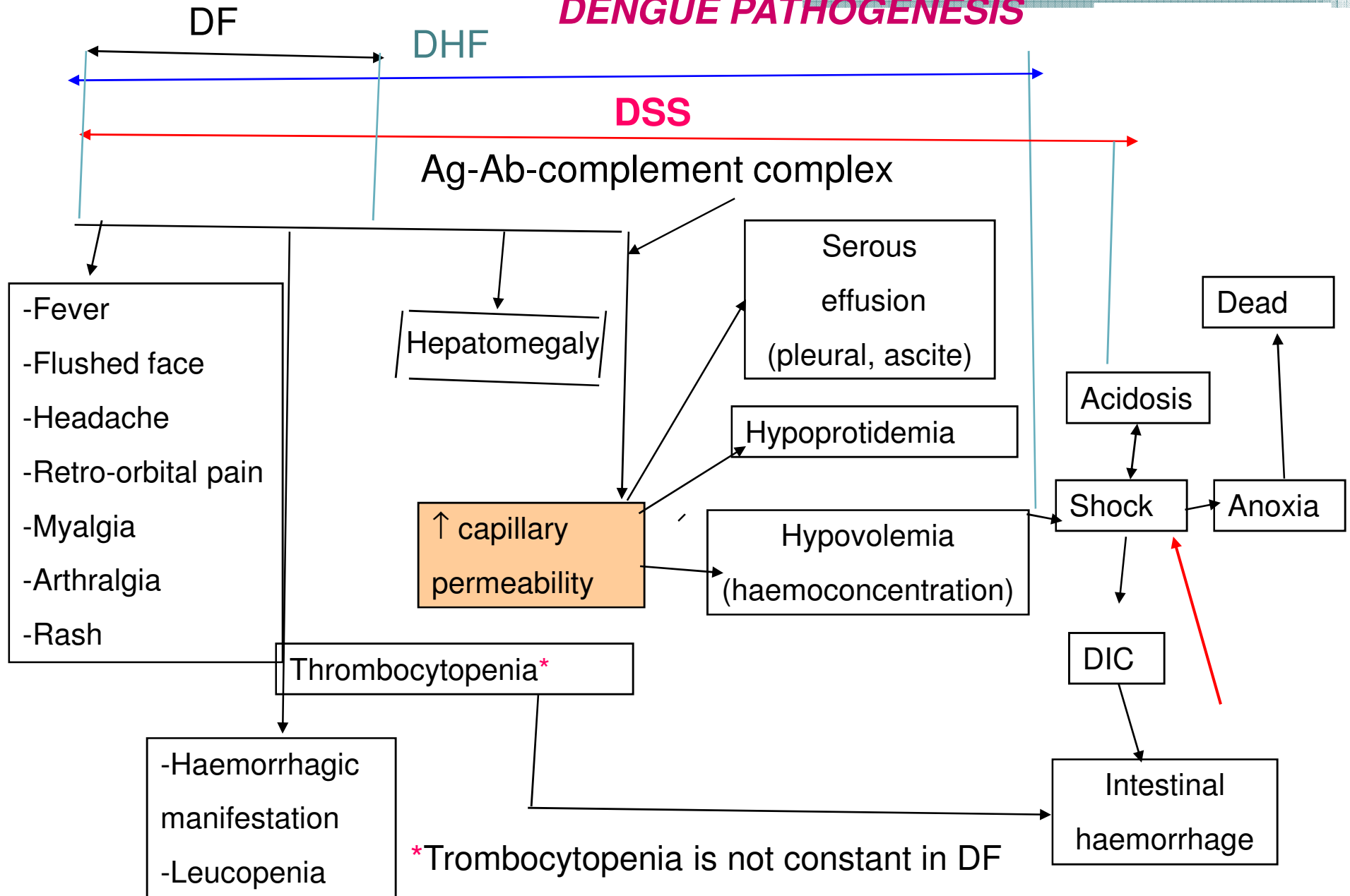
- Pemeriksaan diagnostik yg sensitif, spesifik dan cepat mempermudah penatalaksanaan thd pasien Dengue
- Masa inkubasi 3 – 14 hari (rata-rata 4 – 6 hari), fase akut infeksi selama 5 – 7 hari
- Pada manusia virus tsb bersirkulasi dalam darah selama 7 – 10 hari setelah infeksi
- Virus Dengue dalam darah dapat ditularkan oleh nyamuk 1 hari sebelum onset demam dan tetap infeksius sampai 6-7 hari

- *Aedes aegypti* betina menghisap darah pasien terinfeksi (viremia) dan kelenjar ludah nyamuk menjadi infeksius dalam 8 – 10 hari
- Daya jangkau nyamuk *Aedes* meliputi radius 200 m
- Diagnosa yg tepat dapat memfasilitasi aktivitas “vector control” untuk memutuskan rantai penularan

# Patogenesis infeksi Dengue


- Belum jelas
- Pengamatan awal bayi < 12 bulan yg terinfeksi beresiko tinggi terjadi DHF jika ada antibodi maternal karena terjadinya DHF disebabkan oleh infeksi virus yg dipermudah oleh adanya antibodi (antibody enhancement)
- Dilaporkan Antibodi maternal yg secara transplacenta akan menghilang pada bayi usia 6 bln untuk RSV, 10-12 bln untuk varicella zooster dan 4 bln untuk HIV

# DENGUE PATHOGENESIS



- Jadi kemudahan multifikasi tsb bisa secara transplasenta / infeksi dengue sebelumnya
- Antibodi akan berikatan dengan virus dan melalui reseptor Fc berikatan dengan sel makrofag & sel dendrit → aktivasi sistem imun yg mengakibatkan kerusakan jaringan dan kebocoran plasma
- Secara patologi anatomi kelainan pembuluh darah meliputi pembengkakan endothel, edema perivascular dan infiltrasi sel mononuklear



- 
- Perubahan melalui 2 mekanisme :  
permeabilitas vascular meningkat terjadi kebocoran yg selektif yang menimbulkan hipovolemia
  - Kelainan hemostasis karena vasculopathy dan coagulopathy dengan trombositopenia mengakibatkan manifestasi perdarahan
  - Ada isotipe subclass Dengue baik pada protein struktural maupun non struktural

- Subclass IgG Dengue untuk menentukan beratnya penyakit karena IgG1 dan IgG3 terlibat dalam terjadinya aktivasi komplemen sedangkan IgG4 menghambat aktivasi tersebut
- NS1 merupakan glikoprotein (55 kDa) yang disekresi oleh sel yg terinfeksi DENV baik in vivo maupun in vitro
- Peran NS1 dalam replikasi virus belum jelas tetapi penting sebagai bahan senyawa kompleks replikasi thd membran endoplasmic reticulum


## NS1 dan patogenesis infeksi Dengue

- Pada Anak peningkatan NS1 plasma pada awal infeksi berhubungan dengan keparahan penyakit dan kemungkinan berkorelasi dgn tingginya derajat viremia
- Kadar NS1 plasma yg tinggi mungkin mengaktivasi komplemen dan atau secara langsung berikatan dengan sel endotel dan membentuk kompleks imun → mengaktivasi komplemen, kerusakan sel endotel dan kebocoran kapiler

# Respon Imun pada infeksi Dengue

- Pada infeksi Dengue dijumpai penurunan sel T CD4+, CD8+ dan sel NK. Dan semakin menurun pada saat timbul Shock. Sedangkan sel B tidak dipengaruhi
- Respon imun oleh adanya virus Dengue akan terbentuk Antibodi IgM dan IgG Dengue terhadap protein envelope virus
- Respon imun bervariasi tergantung apakah individu tersebut mendapatkan infeksi primer atau infeksi sekunder

- Perbedaan berdasarkan pengenalan thd respon IgM dan IgG yg berbeda dengan pengambilan sampel dua kali saat akut dan saat penyembuhan
- Infeksi primer ditandai respon antibodi yg rendah dan lambat, pertama muncul IgM dan IgG muncul pada akhir minggu pertama demam
- Infeksi sekunder (individu dgn infeksi Dengue atau flavivirus lain sebelumnya) ditandai respon yg meningkat cepat secara ekstrim dan antibodi bereaksi thd



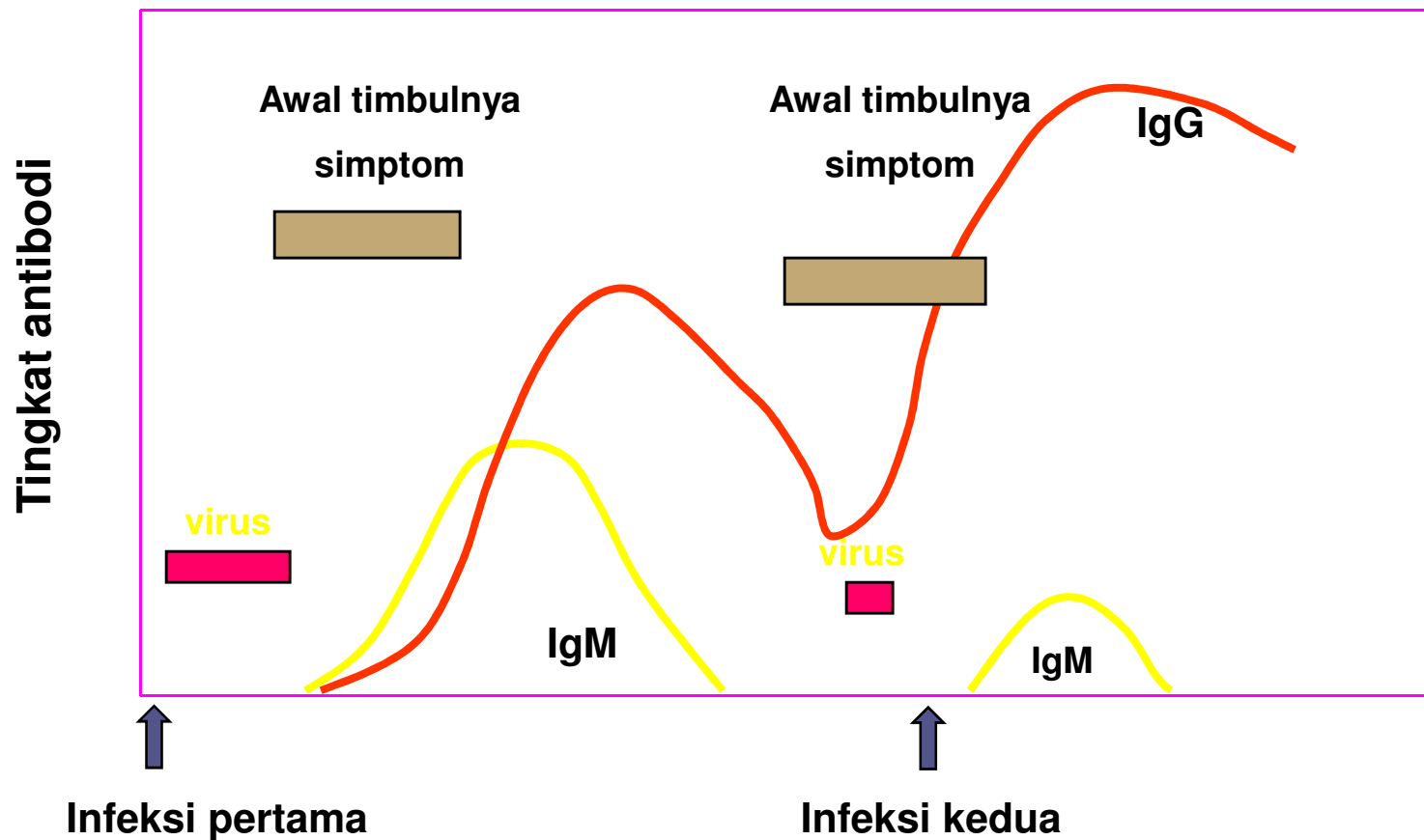
beberapa flavivirus. Tingginya IgG dapat dideteksi pada fase akut dan meningkat secara dramatis dalam 2 minggu

- Karena kadar antibodi IgM rendah secara signifikan pada infeksi sekunder maka hasilnya sering false-negative
- Kadar antibodi IgM sering terdeteksi pada hari ke 5 demam ( 80% kasus) dan pada ke 6 – 10 demam mencapai 93–99% kasus dan tetap terdeteksi lebih dari 90 hari

- Dilaporkan bahwa sensitiviti dan spesifisiti IgM ELISA (setelah demam hari ke 5) bisa mencapai 90% dan 98% sehingga digunakan untuk pemeriksaan rutin
- Reaksi silang dengan flavivirus lain yaitu Japanese encephalitis, St Louis encephalitis dan yellow fever
- Infeksi oleh satu serotipe menimbulkan kekebalan protektif terhadap serotipe yang sama tetapi tidak terhadap serotipe lain

# Respon Primer dan Sekunder Infeksi Virus

## KADAR IgM + IgG.





## Pemeriksaan laboratorium

- Pemeriksaan darah lengkap (full blood count) →
  - Hematokrit meningkat  $\geq 20\%$  dari normal
  - Thrombocyte  $< 100.000/\text{mm}^3$
  - Leucopenia
- Peningkatan enzim Hati (SGOT, SGPT)
- Secara klinik DHF yang berat berhubungan dengan turunnya trombosit dan meningkatnya hemokonsentrasi

# Mekanisme trombotopenia

**sentral**

**Bone marrow suppression**

**perifer**

**↑ Utilization**  
- Excessive used for platelet aggregation  
- Consumptive coagulopathy

**↑ Platelet destruction**

- Hasil pemeriksaan laboratorium lain
  - hipoproteinemia
  - PT memanjang (Prolonged prothrombin time )
  - aPTT memanjang (Prolonged activated partial thromboplastin time )
  - Penurunan fibrinogen
  - Peningkatan FDP ( fibrin split product)

Menurut WHO:

Demam, torniquet positif / perdarahan spontan, trombositopenia

( $<100.000/mm^3$ ), Ht  $>20\%$  dari normal

- Isolasi virus untuk diagnosa definitif, serologi, PCR dan tes cepat (rapid test) untuk pemeriksaan diagnostik. Tidak ada tes tunggal untuk diagnosa pasien Dengue
- Tes lain Haemagglutination inhibition test, Compliment fixation test tetapi kurang spesifik dan Neutralizing test yang spesifik dan sensitif
- Teknik Isolasi virus pada stadium awal penyakit merupakan teknik deteksi infeksi yg sedang berlangsung (current infection)

- Demam Dengue sulit dibedakan dengan demam oleh karena sebab lain sehingga diperlukan pemeriksaan laboratorium untuk konfirmasi diagnosa
- Kualitas dan kegunaan pemeriksaan serologi didaerah endemis perlu dinilai mengingat potensi reaksi silang
- Sulit membedakan infeksi primer dari infeksi sekunder serta masalah tehnik pemeriksaan mengingat daerah endemis sbg sumber Ag yg buruk

## Metode Pemeriksaan

- Teknik ELISA untuk IgM dan IgG Dengue
- Teknik ELISA (rapid test) untuk NS1 pada infeksi akut Dengue
- RT-PCR untuk virus dengue dalam plasma (viral load) dan spesifik thd sub tipe Dengue
- Teknik immunofluorescence untuk Identifikasi virus Dengue dengan menggunakan Antibodi monoklonal pada sel yg terinfeksi

- Teknik ELISA untuk IgM/IgG Dengue cukup sensitif dan spesifik tetapi membedakannya dari flavivirus endemik sangat penting (Asia tenggara endemis virus Japanese encephalitis B) tetapi teknik ELISA tidak dapat membedakan ke empat sub tipe Dengue
- Teknik amplifikasi virus (PCR) thd sel terinfeksi atau dalam darah dan dilanjutkan dengan deteksi sub tipe dengan menggunakan antibodi monoklonal

- Sensitive mulai 2-3 hari sebelum infeksi sampai hari ke 4-5 demam (viremia yg singkat)
- Alat Flow cytometry dapat digunakan untuk identifikasi dengue virus 1 (DEN-1) dan deteksi lebih awal 10 jam dibanding teknik immunofluorescence menggunakan Antibodi nonstructural glycoprotein (NS1)
- Keterbatasan meliputi spesifisitas Antigen dan reaksi silang dgn flavivirus lain



- Deteksi IgM tidak untuk mendeteksi serotipe Dengue, bereaksi silang dgn Antibodi Dengue lain bahkan pada infeksi primer
- IgG ELISA untuk deteksi infeksi Dengue sebelumnya dan kurang spesifik
- IgG ELISA digunakan untuk menentukan apakah terjadi infeksi primer atau sekunder dan hasilnya lebih baik drpd pemeriksaan inhibisi hemaglutinasi (HI)

- Pada HI serum diekstraksi dengan acetone dan diabsorpsi dgn eritrosit angsa sebelum pemeriksaan
- Pemeriksaan NS1 ELISA  
Gen NS1 ada pada semua flaviviruses dan diperlukan untuk replikasi maupun viabilitas dari virus. Saat replikasi NS1 di organella sel dan protein tsb disekresi oleh sel yg terinfeksi


- Antigen NS1 muncul sehari setelah demam dan tidak terdeteksi setelah hari ke 5–6. Selain itu NS1 mrpk “complement-fixing antigen” dan merangsang respon humoral yg kuat
- Kadar NS1 mempunyai hubungan dgn tingkat keparahan penyakit tetapi tidak membedakan primer atau sekunder
- Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) dan real-time RT-PCR



Pemeriksaan nested RT-PCR oleh Lanciotti et al.

Reaksi PCR dengan 2 tahap:


1. Reverse transcription (RNA menjadi cDNA)
2. Amplification dengan primer universal dari gen virus (C-prM) dan dilanjutkan amplifikasi spesifik untuk identifikasi serotipe Dengue berdasarkan berat molekulnya

- 
- Penggunaan probe berfluorescen mampu mendeteksi hasil reaksi tanpa memerlukan elektroforesis
  - Pemeriksaan real-time RT-PCR kurang sensitif dibanding nested RT-PCR tetapi lebih cepat dan mampu menentukan jumlah virus untuk melihat tingkat keparahan infeksi Dengue

## Pengambilan dan penanganan sampel

- Sampel darah vena setelah beku diputar 1000 rpm selama 15 menit, selanjutnya serum dipisahkan untuk pemeriksaan jika ditunda simpan di Lemari Es.
- Untuk pemeriksaan NS1 pada infeksi sangat akut dan sensitivitasnya tergantung derajat viremia

- Deteksi NS1 lebih tinggi pada infeksi primer dari pada infeksi sekunder
- Derajat viremia secara signifikan lebih tinggi jika NS1 positive
- Sensitivitas NS1 yg menurun pada infeksi sekunder karena terjadi sequestrasi kompleks imun saat timbul IgG yg akan mengikat NS1 atau antigen lainnya

- 
- Deteksi NS1 sensitive pada infeksi DENV-1 dan DENV-3 tetapi kurang pada DENV-2 (oleh adanya respon IgG dan viremia yg rendah)
  - Untuk jumlah virus (cDNA) Dengue dengan real-time RT-PCR terdeteksi pada awal infeksi



## Interpretasi hasil pemeriksaan

- Respon serologi untuk infeksi primer dan sekunder tgt peningkatan yg tinggi dari IgG pada fase awal convalescent
- Infeksi sekunder jika ratio IgM dan IgG kurang dari satu, IgM negative dengan IgG yang positive (titer meningkat 4x dengan interval 1 minggu)
- Adanya IgG tanpa IgM bisa juga menunjukkan infeksi flavivirus lain karena adanya reaksi silang

- Deteksi IgM untuk diagnosa infeksi dengue akut lebih spesifik dibanding hanya IgG saja
- HI titer 1:10 dinyatakan seropositive thd satu serotipe dan negative jika titer < 1:10

# Kesimpulan

- Infeksi Dengue ditularkan melalui nyamuk *Aedes aegypti* dan menjadi masalah kesehatan
- Saat ini telah dikembangkan pemeriksaan untuk membantu diagnosa. Evaluasi alat diagnostik diperlukan untuk mengetahui sensitiviti maupun spesifisitasnya
- Tes NS1 sensitif untuk 3 hari pertama demam dan infeksi primer. Selain itu kadarnya mencerminkan jumlah virus yang tinggi dalam darah



Terima Kasih