

PROFIL ANTIGEN NS1 DENGAN HARI SAKIT (LOS) PADA ANAK DENGAN INFEKSI VIRUS DENGUE

*(The Relationship of NS1 Antigen Profile and Days of Illness in Children
with Dengue Virus Infection)*

Dwiyanti Puspitasari*, Saraswati Dewi*, Aryati**

*Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

**Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

E-mail: yanti@dr.com

ABSTRAK

Pendahuluan: Deteksi atau kuantifikasi antigen NS1 Dengue (NS1 Ag) telah menjadi alat diagnostik yang spesifik untuk infeksi virus dengue, tetapi memiliki sensitivitas variabel. Penelitian sebelumnya melaporkan tingkat NS1 Ag dapat dideteksi sampai dengan tanggal 7–10 hari demam, penelitian lain menyatakan bahwa sensitivitas menurun setelah empat hari demam. Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis NS1 Ag profil dan hubungannya dengan hari sakit. **Metode:** Penelitian ini merupakan studi kohort prospektif pada 39 anak dirawat di Dr. Soetomo Surabaya bulan November 2009 sampai Mei 2010. Kriteria inklusi adalah demam akut kurang dari 72 jam, perdarahan setidaknya dengan uji tourniquet positif, umur antara 1–14 tahun, dan positif Dengue IgM/IgG pada hari ke-5 demam. Penelitian ini dilakukan setiap hari Dengue NS1 Ag tes kuantitatif sampai hari penurunan suhu badan sampai normal, dan hubungannya dengan hari penyakit dianalisis. **Hasil:** NS1 Ag positif pada 19/39 sampel. Infeksi sekunder terjadi pada 14/19 kasus dan 17/20 kasus. Kepositifan NS1Ag lebih tinggi pada primer (6/8 kasus) dibandingkan dengan infeksi sekunder (12/31 kasus). Berarti tingkat NS1 Ag tertinggi pada hari ke-2, setelah itu menurun dan tidak terdeteksi pada hari ke-5 demam. Ada hubungan yang signifikan antara NS1 Ag positif ($P=0,037$, $rs=-0.9$) dan tingkat ($P<0,001$, $rs=-1$) dengan hari sakit. **Diskusi:** Dengue NS1 Ag positif dan tingkat yang tertinggi selama fase akut demam dan menurun setelahnya.

Kata kunci: Dengue NS1 Ag, positif, hari sakit, infeksi virus dengue, anak

ABSTRACT

Introduction: Dengue NS1 Antigen (NS1 Ag) detection or quantification has become a specific diagnostic tool for dengue virus infection, but has variable sensitivity. Previous research reported NS1 Ag level can be detected up to the 7th–10th day of fever, others stated the sensitivity was decreased after four days of fever. We performed this research to analyze the NS1 Ag profile and its relationship with the day of illness. **Methods:** This study was a prospective cohort study on 39 children hospitalized at Dr. Soetomo Hospital Surabaya since November 2009 to May 2010. Inclusion criteria were acute fever less than 72 hours, bleeding tendency denoted at least by positive tourniquet test, age between 1–14 years, and confirmed by positive dengue IgM/IgG on the 5th day of fever. We performed daily quantitative dengue NS1 Ag tests until defervescence day, and its relationship with the day of illness were analyzed. **Results:** NS1 Ag was positive in 19/39 samples. Secondary infection occurred in 14/19 of Dengue Fever and 17/20 of Dengue Hemorrhagic Fever cases. Positivity of NS1Ag was higher in primary (6/8 cases) than secondary infection (12/31 cases). Mean level of NS1 Ag was highest on the 2nd day, decreased afterwards and undetected on the 5th day of fever. There was significant relationship between NS1 Ag positivity ($P=0.037$, $rs=-0.9$) and level ($P<0.001$, $rs=-1$) with the day of illness. **Discussions:** Dengue NS1 Ag positivity and level were highest during the acute phase of fever and decreased afterwards.

Keywords: Dengue NS1 Ag, positivity, days of illness, dengue virus infection, child

PENDAHULUAN

Manifestasi klinis infeksi virus dengue sangat bervariasi mulai dari asimtomatis hingga demam berdarah dengue dengan sindrom renjatan yang berakhir dengan kematian (WHO, 1997). Pada awal sakit tidak mudah membedakan infeksi virus dengue dengan penyebab demam akut lain. Deteksi trombositopenia, Immunoglobulin M (IgM), dan G (IgG) anti dengue umumnya baru tampak setelah demam hari ke-4, yang terkadang sudah terlambat. Saat ini, deteksi maupun kuantifikasi Antigen Non-Struktural 1 (Ag NS1) dengue yang beredar bebas di sirkulasi pada fase akut telah menjadi diagnosis spesifik untuk virus dengue, tetapi memiliki sensitivitas yang bervariasi (Alcon, 2002, Libraty 2002, Kumarasany, 2007).

Penelitian terdahulu mempunyai positivitas Ag NS1 Dengue yang berbeda-beda berdasar hari sakit. Ag NS1 terdeteksi pada fase akut sampai dengan hari ke-10 dari serum penderita infeksi virus dengue. Kadarnya berkorelasi dengan titer infeksius virus dengue (Hang, 2009). Positivitas dan kadar Ag NS1 tinggi pada hari ke-0 sampai ke-4 demam, dan menurun setelah hari ke-5 demam (Dussart, 2006). Penelitian lain mendapatkan sensitivitas Ag NS1 tetap tinggi (81,8%-91,9%) pada penderita infeksi virus dengue hingga hari ke-7 sakit (Hu, 2011).

Tujuan penelitian ini dilakukan untuk menganalisis hubungan profil Ag NS1 dengan hari sakit pada anak dengan infeksi virus dengue, sehingga dapat memberikan petunjuk pada klinisi kapan sebaiknya melakukan pemeriksaan ini.

BAHAN DAN METODE

Penelitian yang kami lakukan adalah kohort prospektif yang bersifat analitik observasional. Pengambilan sampel dilakukan di Instalasi Rawat Jalan, Rawat Darurat, dan Rawat Inap Anak RSUD Dr. Soetomo Surabaya, mulai bulan November 2009 sampai dengan Mei 2010, dan telah disetujui oleh panitia etik penelitian kesehatan RSUD Dr. Soetomo. Sampel dipilih dengan cara *consecutive sampling*, secara statistik penghitungan besar

sampel menggunakan rumus penghitungan besar sampel untuk analisis korelasi, dengan $r=0,5$ dari penelitian terdahulu (Libraty, 2002) didapatkan besar sampel minimal (n total) adalah 29 penderita. Kriteria inklusi adalah penderita demam pendek (≤ 72 jam), usia 12 bulan–14 tahun, terdapat tanda perdarahan, minimal uji tourniquet positif, tidak jelas terdapat fokus infeksi lain, orang tua bersedia dilibatkan dalam penelitian dan dilakukan rawat inap dengan menandatangani *inform consent*. Penderita dengan kelainan hematologi, penyakit jantung, paru, penderita imunokompromis (HIV, SLE, keganasan, gizi buruk), serta penderita dengan pengobatan asam salisilat atau aspirin, yang dapat mempengaruhi kadar serologis/NS1 dan tampilan klinis infeksi virus dengue dieksklusi dari sampel. Variabel yang kami teliti adalah kadar Ag NS1 dengue serial, IgM/IgG anti dengue, jenis infeksi dengue (primer/sekunder) dan hari sakit.

Penderita diperiksa Ag NS1 kuantitatif serial tiap hari mulai saat masuk rumah sakit (MRS) sampai dengan hari *defervescence*, menggunakan platelia dengue NS1 *Quantification Assay Bio Rad*. Dinyatakan positif bila Ag NS1 mencapai titer 150 BRU/mL. Pada penelitian Dussart 2006, didapatkan sensitivitasnya 88,7% (95%CI 84–92,4%) dan spesifisitas 100% (95% CI 84,9–100%) (Dussart, 2006). Konfirmasi infeksi virus dengue dilakukan melalui pemeriksaan antibodi anti dengue IgM/IgG captured ELISA Panbio pada hari sakit ke-5. Digolongkan infeksi primer dengue bila didapatkan perbandingan titer IgM/IgG $>1,2$, dan infeksi sekunder bila rasionya $<1,2$. Luaran yang dilihat adalah profil Ag NS1 dengue, hari sakit dan jenis infeksi virus dengue. Analisis positivitas dan kadar Ag NS1 dihubungkan dengan hari sakit pada anak dengan infeksi virus dengue. Hari sakit diperoleh dari anamnesis, hari sakit ke-1 adalah hari pertama penderita mengalami demam, hari sakit ke-2 adalah hari kedua penderita demam, demikian seterusnya. Hari *defervescence* adalah hari di mana suhu badan kembali normal tanpa pemberian antipiretik. Diagnosis akhir penderita dengue dibuat berdasarkan kriteria WHO 1997, dibedakan

menjadi demam dengue dan demam berdarah dengue (derajat I, II, III, IV). Uji statistik yang kami gunakan adalah uji t2 sampel bebas dan korelasi spearman dengan program SPSS ver.15.0, dan tingkat kemaknaan (α) sebesar $<0,05$.

HASIL

Selama periode penelitian ini didapatkan 45 sampel yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Selanjutnya, 6 sampel tidak dianalisis oleh karena pemeriksaan serologi IgM dan IgG dengue sebagai konfirmasi infeksi virus dengue hasilnya negatif.

Umur rerata subjek penelitian adalah 7,5 tahun, dengan rentang 1–13 tahun. Perbandingan anak laki-laki dibanding perempuan 1:1,05.

Hasil pemeriksaan Ag NS1 positif pada 19/39 sampel, meliputi demam dengue 8/18 sampel, 11/20 sampel demam berdarah dengue. Positivitas Ag NS1 tertinggi pada hari sakit ke-2, menurun menjelang dan bersamaan dengan *defervescence*. Hasil uji korelasi Spearman didapatkan hubungan yang bermakna antara positivitas Ag NS1 dengan hari sakit ($p=0,037$, $r_s=-0,9$), dengan interpretasi semakin meningkat hari sakit positivitas Ag NS1 semakin menurun. Rerata kadar Ag NS1 juga tertinggi pada hari sakit ke 2, menurun menjelang dan bersamaan dengan *defervescence*. Pada hari sakit ke-5 saat hari *defervescence* terbanyak, rerata kadar menjadi negatif. Semakin meningkat hari sakit kadar Ag NS1 semakin menurun ($p<0,001$, $r_s=-1$). (Tabel 1)

Infeksi sekunder pada penelitian ini terjadi pada 14/19 demam dengue dan 17/20 kasus demam berdarah dengue. Pada infeksi primer, 6/8 sampel memiliki Ag NS1

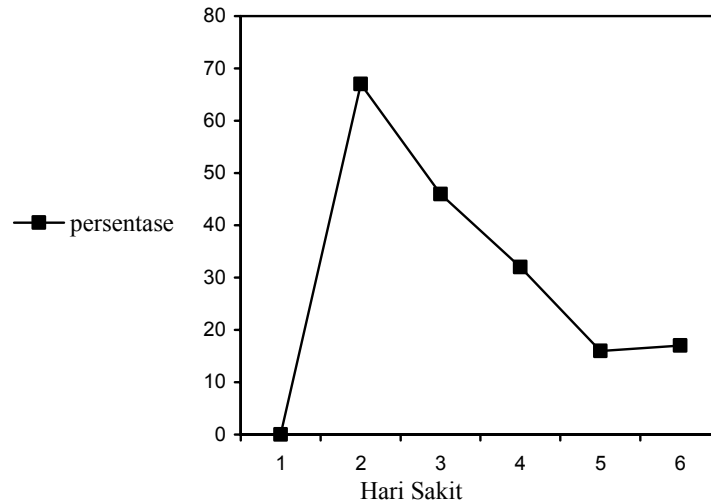
positif, sedangkan hanya 12/31 sampel infeksi sekunder memiliki Ag NS1 positif. Rerata (SD) kadar Ag NS1 pada infeksi primer 620 (385) BRU/mL, lebih tinggi daripada infeksi sekunder (252 (335) BRU/mL) dengan $p=0,011$, 95%CI -645 sampai -91. Pola rerata kadar Ag NS1 serial menurut hari sakit berdasarkan jenis infeksi ditunjukkan pada grafik 2.

PEMBAHASAN

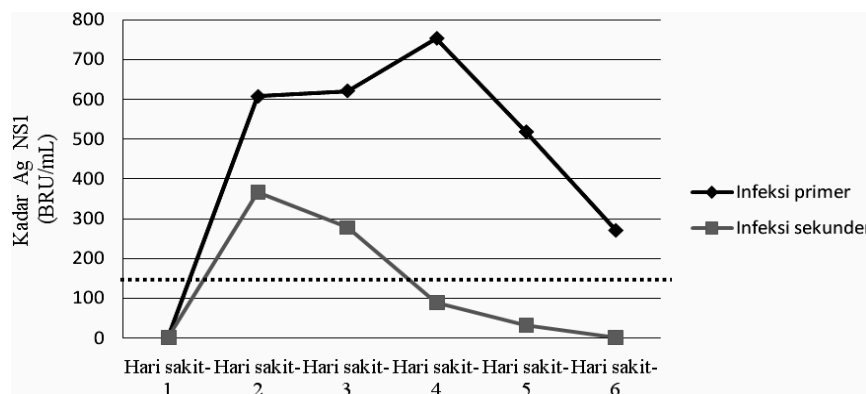
Pemeriksaan Ag NS1 dengue mempunyai positivitas beragam. Penelitian kami mendapatkan positivitas Ag NS1 48,7%. Penelitian- penelitian terdahulu mendapatkan sensitivitas dari pemeriksaan Ag NS1 menggunakan kit yang sama berkisar 37–93,4% (Kumarasany, 2007; Bessof, 2010; Osorio, 2010). Penelitian Kumarasany dengan sensitivitas Ag NS1 yang tinggi (93,4%) mempunyai sampel infeksi primer lebih besar (86,4%), dengan positivitas Ag NS1 lebih besar (97,3%) pada infeksi primer dibandingkan infeksi sekunder (Kumarasany, 2007). Penelitian lain juga mendapatkan Ag NS1 terdeteksi lebih banyak pada infeksi primer dibandingkan infeksi sekunder dengue (Kumarasany, 2007; Chuansumrit, 2008; Hang, 2009). Tricou di Vietnam mendapatkan positivitas Ag NS1 sebesar 61,6%, dengan jumlah sampel infeksi primer (26,9%) lebih sedikit dibanding sekunder (71,8%), dan positivitas lebih tinggi pada infeksi dengue primer (80,3%) dibanding sekunder (55,1%). Menurut Tricou, infeksi sekunder merupakan salah satu faktor yang menyebabkan Ag NS1 ditemukan negatif pada sampel (Tricou, 2010). Pada penelitian kami positivitas NS1 Ag pada infeksi dengue primer lebih tinggi, yaitu 6/8 (75%) kasus. Sebagian besar (79,5%) sampel kami merupakan infeksi sekunder

Tabel 1. Hasil pemeriksaan Ag NS1 berdasarkan hari sakit

	Hari sakit-1 (n=1)	Hari sakit-2 (n=6)	Hari sakit-3 (n=39)	Hari sakit-4 (n=38)	Hari sakit-5 (n=32)	Hari sakit-6 (n=6)	Uji Spearman
Ag NS1 positif (jumlah)	0	4	18	12	5	1	$p = 0,037$ $r_s = -0,9$
Rerata kadar Ag NS1 (SD) (BRU/mL)	0 (0)	526,8 (411,2)	356,6 (380,8)	215,8 (336,5)	95,3 (233,4)	90,2 (220,8)	$p < 0,001$ $r_s = -1$



Grafik 1. Positivitas Ag NS1 berdasarkan hari sakit



Grafik 2. Rerata kadar Ag NS1 serial sepanjang hari sakit berdasarkan jenis infeksi

yang mempunyai positivitas Ag NS1 rendah (38,7%). Rendahnya positivitas Ag NS1 pada infeksi sekunder oleh karena rendahnya kadar Ag NS1. Rendahnya kadar Ag NS1 pada infeksi sekunder diperkirakan oleh karena sejumlah besar Ag NS1 berikatan dengan antibodi pada fase akut dan terjadi *sequestered* kompleks imun (Libraty, 2002; Dussart, 2008; Hang, 2009) serta terjadinya ikatan Ag NS1 dengan sel endotel (Avirutnan, 2007). Dua hal tersebut menyebabkan berkurangnya Ag NS1 bebas di sirkulasi dan tidak tercapainya epitop target oleh monoklonal Ab pada pemeriksaan (Hang, 2009).

Pada penelitian kami, rerata kadar Ag NS1 tinggi pada awal sakit, tertinggi pada hari sakit ke-2, menurun menjelang dan bersamaan dengan *defervescence*. Pada infeksi primer, rerata kadar Ag NS1 tetap terdeteksi hingga

defervescence, bila dibandingkan dengan infeksi sekunder yang reratanya mulai tidak terdeteksi pada hari ke-4 demam. Pada penelitian Libraty, rerata kadar Ag NS1 paling tinggi pada awal sakit, baik pada demam dengue maupun demam berdarah dengue, kemudian mengalami penurunan (Libraty, 2002). Ag NS1 terdeteksi pada fase akut hingga tujuh (Kumarasany, 2007) sampai sepuluh (Avirutnan, 2007) hari kemudian. Chuansumrit pada penelitian infeksi virus dengue, menunjukkan penurunan positivitas dengan bertambahnya hari sakit, hari sakit ke-2 100%, hari sakit ke-3 92,3%, hari sakit-4 56,5%, hari sakit-5 56,6%, hari sakit ke-6 saat *defervescence* 43,1% dan hari sakit ke-7 29,8% (Chuansumrit, 2008). Alcon menemukan Ag NS1 berada di sirkulasi dan mencapai kadar puncak antara hari sakit ke-2 dan ke-4 dan

turun pada fase konvalesen (Alcon, 2002). Positivitas Ag NS1 tinggi pada awal sakit ini menunjukkan *secreted* Ag NS1 pada fase tersebut dan dapat digunakan sebagai petunjuk adanya infeksi virus dengue. Terjadinya penurunan kadar Ag NS1 menjelang dan bersamaan dengan *defervescence* oleh karena virus dengue yang beredar dalam darah selama 4–5 hari fase panas hilang saat *defervescence* (WHO, 2005; Avirutnam 2006). Pada infeksi sekunder, rerata kadar Ag NS1 menurun lebih cepat mungkin disebabkan adanya ikatan Ag NS1 dengan antibodi pada fase akut (Libraty, 2002; Dussart, 2008; Hang, 2009).

Rendahnya positivitas Ag NS1 juga mungkin dipengaruhi oleh serotipe virus dengue. Pada penelitian terdahulu disebutkan bahwa di Surabaya didominasi oleh serotipe DEN 2 (Soegijanto, 2010). Menurut penelitian Hang, deteksi Ag NS 1 pada DEN 2 (55%) lebih rendah daripada deteksi terhadap DEN 1 (98%) serta DEN 3 (96%). Penyebab rendahnya positivitas pada DEN 2 oleh karena terdapat kecenderungan banyaknya infeksi sekunder berhubungan dengan DEN2 (Hang, 2009). Hal yang sama ditemukan pada penelitian Bessoff, Ag NS1 positif pada DEN 2 (82,2%) dan DEN 4 (70,9%) lebih rendah daripada DEN 1 (92,9%) dan DEN 3 (86,5%), berhubungan dengan kejadian infeksi sekunder pada DEN 2 (88,9%), DEN 4 (89%) lebih tinggi daripada DEN 1 (53,6%) dan DEN 3 (59,6%) (Bessoff, 2010).

Beberapa keterbatasan penelitian ini antara lain: pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan kultur virus sebagai standar baku emas diagnostik infeksi virus dengue, dan tidak memeriksa *viral load* yang dapat digunakan untuk menganalisis korelasi antara positivitas dan kadar Ag NS1 berdasarkan hari sakit dengan *viral load*.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Ada hubungan antara positivitas dan kadar Ag NS1 dengan hari sakit. Positivitas dan kadar Ag NS1 tertinggi pada hari-hari awal sakit dan akan menurun dengan bertambahnya hari sakit.

Saran

Pemeriksaan Ag NS1 sebagai alat bantu diagnosis infeksi virus dengue sebaiknya dilakukan pada hari-hari awal demam.

DAFTAR PUSTAKA

- Alcon, S., Talarmin, A. Debruyne, M., dkk., 2002. Enzyme linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*, 40, 376–81.
- Avirutnan, P., Zhang, L., Punyadee N., dkk., 2007. NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparin sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog.* (Online), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2092380/?tool=pubmed>, diakses tanggal 1 Maret 2012, jam 09.55 WIB).
- Bessoff, K., Phoutrides, E., Delorey, M., dkk., 2010. Utility of commercial nonstructural protein 1 antigen capture kit as a dengue virus diagnostic tool. *Clin Vaccine Immunol.*, 6, 943–53.
- Chuansumrit A., Chaiyaratana W, Pongthanapisith V, dkk., 2008. The use of dengue nonstructural protein 1 antigen for the early diagnosis during the febrile stage in patients with dengue infection. *Pediatr Infect Dis J.*, 27: 43–8.
- Dussart P., Labeau B., Lagathu GI, dkk., 2006. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vac Immunol.*, 13: 1185–9.
- Dussart, P., Petit, L., Labeau, B., dkk., 2008. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis.* (Online), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2500180/?tool=pubmed>, diakses pada 5 Maret 2012, jam 08.55 WIB).
- Hang, VT., Nguyet, NM., Trung, DT., dkk., 2009. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid test for dengue

- sensitivity, specificity and relationship to viremia and antibody response. *PLoS Negl Trop Dis* (Online), (<http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0000360>), diakses tanggal 3 Maret 2012, jam 14.00 WIB).
- Hu, D., Di, B., Ding, X., dkk., 2011. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. *Virol J* (online), (<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1743-422X-8-47.pdf>), diakses tanggal 4 Maret 2012, jam 11.23 WIB).
- Kumarasamy, V., Wahab, AHA., Chua, SK., dkk., 2007. Evaluation of commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *J Virol Methods*, 140: 75–9.
- Libraty, DH., Young, PR., Pickering, D., dkk., 2002. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*, 186: 1165–8.
- Osorio, L., Ramirez, M., Bonelo, A., dkk., 2010. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virol J* (online), (<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1743-422X-7-361.pdf>), diakses tanggal 3 Maret 2012, jam 20.00 WIB).
- Soegijanto, S., Darmowandowo, W., Ginting AP., dkk., 2010. Serotype and clinical performance of dengue virus infection on the year 2009. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*, 1: 55–9.
- Tricou, V., Vu, H., Quynh, N., dkk., 2010. Comparison of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. *BMC Infect Dis*. (Online), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2895602/?tool=pubmed>), diakses tanggal 16 Februari 2012, jam 09.00 WIB).
- WHO, 1997. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*. 2nd ed. Geneva: World Health Organization.
- WHO, 2005. *Dengue, dengue haemorrhagic fever and dengue shock syndrome in context of the integrated management of childhood illness*, (Online), (http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_FCH_CAH_05.13_eng.pdf), diakses pada 1 Maret 2012, jam 09.00 WIB).