Diagnosis Molekuler Virus Dengue

Enny Nugraheni[1], Ike Sulistyowati[2]

[1.] Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Bengkulu

[2.]Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran dan Imu Kesehatan Universitas Bengkulu

Abstrak

Demam Dengue merupakan penyakit yang ditransmisikan oleh nyamuk yang meningkat secara dramatis dari tahun ke tahun selama beberapa dekade terakhir. Infeksi yang disebabkan oleh demam dengue dapat berupa infeksi primer dan sekunder. Infeksi sekunder dapat menyebabkan kejadian berbahaya yaitu Demam Berdarah Dengue atau Demam Shock Sindrom. Dengue adalah virus RNA positif genome sebanyak 11 kilobase terdiri dari prekursor 300 asam amino yang memproses kotranslasi dan posttranslasi oleh virus dan protease host. Protein terdiri dari protein struktural dan non struktural. Teori imunopatogenesis virus tidak diketahui secara lengkap. Manifestasi klinis terjadi akibat reaksi tubuh terhadap virus sehingga akan muncul gejala sistemik seperti demam, nyeri sendi, otot, lemas dan gejala lain. Terdapat 2 teori yang menyebabkan DBD dan Sindrom Shock Dengue yang belum diketahui secara pasti. Diperkirakan karena adanya antibodi yang heterolog dari serotipe yang berbeda namun tidak dapat dinetralisasi sehingga dapat menimbulkan Infeksi dengue yang berat. Diagnostik molekular virus dengue diperlukan karena diagnostik ini dapat menentukan jenis serotipe virus sehingga dapat mencegah komplikasi yang lebih berat. Tehnik yang sedang dikembangkan adalah RT-PCR dan Realtime RT-PCR kedua tehnik ini dapat mendiagnosis dengan cepat, pada stadium infeksi dini dengan mengetahui jenis serotipe pada virus dengue. Sehingga penatalaksanaan dapat dilakukan sedini mungkin sesuai dengan serotipe yang menginfeksi. Pemilihan pemeriksaan dengan diagnosis molekular virus dengue pada fase awal untuk mencegah kematian pada pasien, namun pemeriksaan tetap harus merujuk untuk apa pemeriksaan tersebut dilakukan dengan memperhatikan kelebihan dan kekurangannya. **[JK Unila. 2016; 1(2): 385-392]**

Kata kunci: dengue, diagnosis molekular, RT-PCR.

Molecular Diagnosis Dengue Virus

Abstract

Dengue Fever is a mosquito-borne disease. The incidence of Dengue Fever has been increased dramatically over recent decades. Dengue Fever can be either primary or secondary infection. Secondary infection can cause a fatal condition namely Dengue Hemorrhagic Fever or Dengue Shock Syndrome. Dengue is a positive-strand RNA virus. It has11kb genome, consists of 300 amino acid precursor which will undergo co- and post-translational processing by host and viral protease. Its protein consists of structural and non-structural viral proteins. Immunopathology of dengue viral infection has not been completely understood. Clinical manifestation caused by the body's reaction due to viral infection including systemic symptoms such as fever, joint pain, muscle weakness, etc. There are two theories that possibly related to Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome. It has been alleged that heterologue antibodies from different serotype can not be neutralized and subsequently lead to severe dengue infection. Molecular diagnostic of dengue virus is required because it can determine the serotype of virus in order to prevent more severe complications. Nowadays, RT-PCR and Realtime RT-PCR technique has being developed. These two modalities can determine serotype of dengue virus, make an appropriate earlier management of infection according to its serotype. Initial molecular diagnostic of dengue virus can be used to prevent death. Still it should be known for what purpose the examination is conducted, regarding its advantages and disadvantages. **[JK Unila. 2016; 1(2): 385-392]**

Keywords: dengue,molecular diagnostic, RT-PCR

Korespondensi: dr. Enny Nugraheni, M. Biomed, alamat Jln. WR Supratman Kelurahan Kandang Limun Kecamatan Muara Bangkahulu Kota Bengkulu, HP. 08153807621, e-mail: ennynugraheni@gmail.com

Pendahuluan

Dengue merupakan suatu penyakit yang ditransmisikan oleh nyamuk yang hidup didaerah tropis dan subtropis. Pada beberapa tahun terakhir penyebarannya meningkat pada daerah perkotaan yang telah menjadi perhatian masalah kesehatan di dunia internasional.[1] Insiden terjadinya Demam Dengue dan Demam Berdarah Dengue meningkat secara dramatis didunia selama beberapa dekade terakhir, lebih dari 2,5 milyar jiwa atau lebih dari 40 % dari populasi dunia yang mempunyai resiko terserang demam dengue.[1] Dari data yang diperoleh, Asia Tenggara adalah wilayah yang memiliki jumlah tertinggi baik dari yang ringan sampai dengan yang berat.[2] Virus Dengue pertama kali di isolasi oleh Hotta dkk selama perang dunia kedua yang berhasil mengisolasi virus type 1 dan 2. Kemudian pada saat terjadi wabah

dengue di Manila ditemukan kembali DEN 3 dan DEN 4 oleh hammon dkk.[3] Dari keempat tipe serotipe tersebut secara epidemiologi sama namun terdapat perbedaan secara genetik dan antigen antara yang satu dan yang lain. Keempat serotipe tersebut dapat diklasifikasikan berdasarkan perbedaan genotipe berdasarkan variasi pada sekuens nukleotidanya.[4] Di Indonesia terdapat keempat serotipe tersebut berdasarkan penelitian Prastyowati dkk yang paling banyak di Jawa barat adalah serotipe 3.[5]

Virus dengue dapat menyebabkan dua tipe infeksi yaitu primer dan sekunder. Infeksi primer terjadi jika demam akut yang dikenal sebagai demam dengue (dengue fever) yang akan hilang setelah kira-kira tujuh hari setelah terbentuk respon immun komplek. Infeksi sekunder lebih berat dan menyebabkan demam berdarah dengue (DBD) atau sindrom syok dengue (DSS).[6]

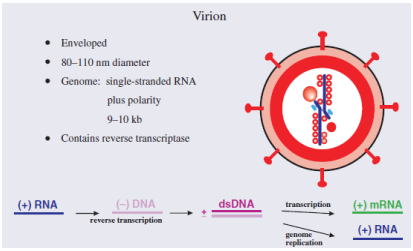
Demam berdarah dengue ataupun Sindrom Syok Dengue dapat berbahaya bagi penderita.[7] Sampai saat ini belum ditemukan vaksin yang mungkin untuk menimbulkan kekebalan untuk 4 serotype dengue sekaligus, karena itu perkembangan vaksin dan diagnostik

Karakteristik serotipe virus tersebut perlu diketahui secara dini karena kita dapat mengetahui apakah seroipe virus dengue yang menginfeksi tersebut apakah termasuk varians yang mempunyai faktor resiko terjadinya Demam Berdarah Dengue dan Sindrom Syok Dengue. Dengan menggunakan metode real time dapat mengetahui serotipe dengue dan dapat mengetahui perubahan epidemiologi dari infeksi yang terjadi.[5]

ISI

Struktur dan genome virus dengue

Virus dengue adalah virus RNA strain positif yang memiliki genom 11 kilobase. Genome virus dengue terdiri dari *large open reading frame encodes* sebuah prekursor polyprotein yang kira-kira terdiri 300 asam amino yang memproses kotranslasi dan posttranlasi oleh virus dan protease host.



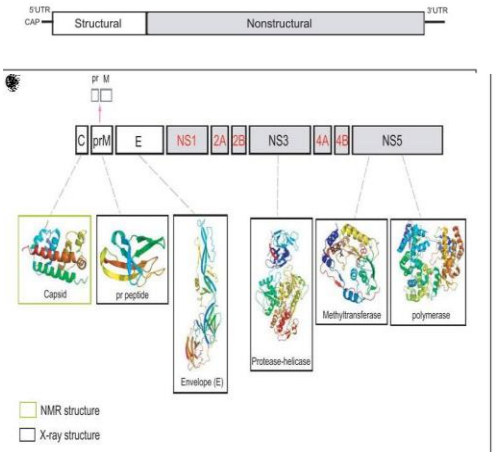
Gambar 1. Struktur virus

yang cepat dan tepat sangat dibutuhkan untuk mencegah kematian yang disebabkan virus Dengue.

Pada umumnya diagnosis penyakit dengue sulit ditegakkan pada beberapa hari pertama sakit karena gejala yang muncul tidak spesifik dan sulit dibedakan dengan penyakit lainnya.[8]

Saat ini telah dikembangkan metode diagnostik yang lebih kompleks yaitu tehnik molekular dan metode serologi yang digunakan pada sebagian besar laboratorium dengan mendeteksi adanya virus dengue. Setelah terjadinya onset penyakit, virus dapat dideteksi selama minggu pertama pada serum, plasma, sirkulasi sel darah merah, dan oragan lainnya. Selama fase awal tehnik yang umum dilakukan untuk melakukan diagnosis adanya infeksi virus dengue dengan cara isolasi virus, deteksi asam nukleat virus, dan deteksi antigen viral. Pemeriksaan antibodi anti-Virus dengue adalah yang paling sering dilakukan selama 7 hari pertama. Kekurangan dari pemeriksaan serologi adalah ketidakmampuan untuk membedakan serotipe virus dengue yang menginfeksi dan antibodi yang potensial untuk terjadinya reaksi silang dengan flavivirus.[4]

Virus dengue adalah virus RNA strain positif yang memiliki genom 11 kilobase. Genome virus dengue terdiri dari *large open reading frame encodes* sebuah prekursor polyprotein yang kira-kira terdiri 300 asam amino yang memproses kotranslasi dan posttranlasi oleh virus dan protease host.



Gambar 2. Skema diagram genom virus dengue dan lipoprotein[8]

Protein Virus Dengue

Virus dengue memiliki 3 protein struktural yaitu : Protein Kapsid (C), Protein terkait membran (M), dan Protein Amplop (E). Setiap protein memiliki struktur tersendiri dalam membentuk virus.[1]

Protein kapsid (C) merupakan protein dasar yang sangat responsif terhadap penempelan nukleokapsid yang terus berinteraksi dengan RNA tetapi hanya sedikit yang mengetahui tentang protein C. Struktur ptotein C memperlihatkan suatu struktur dimer yang mempunyai beban tertinggi dan mempunyai distribusi yang asimetris di residu dasar diatas protein permukaan. Protein terkait membran (M) merupakan protein yang berhubungan dengan membran yang merupakan membran glikoprotein yang merupakan bagian dari nukleokapsid dan membantu protein amplop untuk mencapai bentuk mature virion virus. Protein M dapat digunakan untuk membedakan respon antibodi terhadap antivirus. Protein Amplop (E) merupakan protein yang terdapat dipermukaan virus dan tentu saja yang menenetukan penempelan virus pada sel host sepanjang reseptor sel seperti heparin sulfate DC-SIGN. Ini merupakan protein penting untuk virus masuk ke dalam host. Protein ini mempunyai 3 domain, domain I (domain struktural), domain II (dimmers) dan domain III (domain ikatan). Domain dimmer berhubungan dengan domain struktural dan domain ikatan. Perubahan konformasi ini menginduksi adanya fusi antara virus dan membran sel host.[1]

Genom virus dengue mengkode tujuh virus nonstruktural diantaranya NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b dan NS5. Protein nonstruktural tersebut berperan pada replikasi virus dan fungsi lainnya. Protein NS1 merupakan suatu glikoprotein yang diskresikan sebagai komplek hexameric soluble selama terjadi kasus natural infeksi. Berdasarkan beberapa kejadian memperlihatkan bahwa sekret yang dikeluarkan oleh NS1 merupakan penanda yang baik untuk proses imun dan pengaturan selama infeksi.[9] NS1 diekspresikan pada permukaan sel yang terinfeksi dan merupakan target respon antibodi pada virus dengue.[10] NS1 antigen akan terdeteksi pada hari pertama infeksi sampai dengan hari ke-9 infeksi dan akan tetap terdeteksi walaupun RNA virus negatif pada pemeriksaan RT PCR.[1] Protein NS2A merupakan protein small hidrofobik yang terikat membran.[11] Protein ini yang paling berperan pada proses replikasi virus RNA dan perakitan virus. Mutasi dari NS2A akan mengakibatkan terganggunya relikasi virus RNA.[1] Protein NS2B bekerja sebagai kofaktor pada NS2B-NS3 serine protease. Penelitian yang dilakukan oleh Falgou dkk menyebutkan bahwa terdapat 40 asam amino segmen pada NS2B essensial untuk aktivitas protease.[1]

Protein NS3 Protein NS3 dari DEN-2 adalah protein nonstruktural kedua terbesar yang mempunyai serine protease pada N-terminus dan NTPase helicase RNA Triphosphat (RTP-ase) pada C terminus-end. NS3 juga berperan pada replikasi RNA dan membantu regulasi proses menjadi poli protein.[1] Protein NS4A mempunyai rantai C-terminus end yang sangat hidrofilik dan akan memberikan sinyal untuk translokasi NS4B ke retikulum endoplasma.[1] Protein NS4A akan membentuk struktur membran yang merupakan tempat terbentuknya kompleks replikasi virus yang akan menyatu/terlokalisasi dengan dsRNA dan protein E.[11] NS4A berperan pada replikasi virus, pengaturan membran dan regulasinya.[1]

Protein NS4B Protein NS4B berinteraksi dengan NS3 untuk regulasi replikasi RNA.[1] NS4B juga akan bergabung dengan dsRNA dan Protein E untuk membentuk RNA komplek replikasi.[16] Protein pada NS4A dapat menginduksi terjadinya autofagi pada sel epitel dan melindungi dari kematian selama infeksi.[17] Protein NS5 merupakan protein yang mengkode RNA Guanyl transferase, ametiltransferase (MTase) dan RNA dependent RNA polimerase (RdRp).[11] MTase terletak pada domain N-terminus end dan polymerase terletak pada C-terminus end. NS5 berperan pada proses replikasi RNA yang terletak pada peran RNA dependent RNA polimerase.yang juga terlibat secara denovo inisiasi dari sintesis RNA.[1]

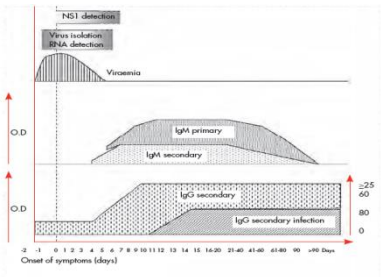
Immunopatogenesis Virus Dengue

Patogenesis dan patofisiologi infeksi demam berdarah dengue tidak diketahui secara lengkap. Terdapat beberapa teori baru yang menjelaskan secara observasi klinis dan studi seroepidemiologi. Beberapa yang lebih baru lebih fokus pada respon immun seluler virus dengue dan berdasarkan serotipe virus. Manifestasi klinis demam berdarah dengue terjadi akibat reaksi tubuh terhadap virus. Pada saat terjadi viremia, virus akan berkembang didalam peredaran darah dan akan ditangkap oleh sel makrofage. Peran sel makrofage adalah sebagai APC (Antigen Presenting Cell) kepada limfosit. Limfosit (T-helper) akan teraktifasi dan menarik makrofage

lain untuk mengfagosit lebih banyak virus. Disamping itu juga, akan mengaktifasi sel T-sitotoksik (T-cytotoxic cell) yang akan melisis makrofage dan mengaktifkan sel B (B-cell limfocyte) untuk memproduksi dan melepas antibodi. Ada 3 jenis antibodi yang telah dikenal yaitu : antibodi netralisasi, antibodi hemaglutinasi, antibodi fiksasi komplemen, sehingga menyebabkan terlepasnya berbagai mediator yang merangsang terjadinya gejala sistemik seperti demam, nyeri sendi, otot, malaise dan gejala lain.[18]

Terdapat dua teori yang menjelaskan terjadinya DBD dan SSD yaitu hipotesis infeksi sekunder dan hipotesis antibodi dependent enhancement (ADE). Teori infeksi sekunder menyebutkan apabila seseorang mendapatkan infeksi dari salah satu virus akan terjadi proses kekebalan terhadap infeksi dari jenis tersebut untuk jangka waktu yang lama. Seseorang yang pernah mendapat infeksi primer virus dengue akan mempunyai antibodi yang menetralisasi virus yang sama (homologous). Namun jika terjadi infeksi sekunder dari jenis virus yang berbeda (heterolog) maka terjadi infeksi yang berat. Karena pada infeksi selanjutnya antibodi heterologous yang telah terbentuk pada infeksi primer akan membentuk Antigen antibodi kompleks dengan infeksi virus dengue dengan serotipe berbeda namun tidak dapat dinetralisasi bahkan membentuk kompleks yang infeksius. Karena adanya non neutralizing antibodi maka partikel kompleks antigen antibodi (Virus dengue-IgG) akan berikatan dengan reseptor Fc gama pada sel makrofag yang lain, oleh karena antibodi yang ada tidak dapat mengaktivasi sel virus sehingga dengan mudah akan masuk ke sel-sel makrofage yang lain oleh karena antibodi yang ada tidak dapat meninaktivasi virus. Kemudian makrofage akan menmproduksi IL-1, IL-6, dan TNF alfa dan juga "*Platelet Activating Factor*" (PAF) yang selanjutnya akan menyebabkan kebocoran dinding pembuluh darah, merembesnya cairan plasma ke jaringan tubuh yang disebabkan kerusakan endotel pembuluh darah yang mekanismenya belum jelas dimana hal tersebut akan mengakibatkan syok.[18]

Respon antibodi terhadap infeksi tergantung pada status immun host. Ketika infeksi dengue menyerang seseorang yang tidak pernah terinfeksi sebelumnya oleh flavivirus atau oleh vaksin dari flavivirus, pada pasien akan terbentuk antibodi primer yang merupakan antibodi spesifik yang meningkat secara lambat. Antibodi IgM adalah isotipe imunoglobulin yang pertama kali muncul. Antibodi tersebut ditemukan pada 50 % pasien pada hari 3-5 setelah onset penyakit.[2,7] Meningkat menjadi 80 % pada hari ke-5 dan 99 % pada hari ke 10 (Gambar.4). Level IgM Akan mencapai puncaknya pada 2 minggu setelah onset gejala penyakit dan kemudian secara umum tidak terdeteksi setelah 2-3 bulan. Serum anti-dengue IgG secara umum terdeteksi pada titer rendah pada akhir minggu pertama penyakit, meningkat perlahan setelahnya, sehingga serum IgG akan tetap terdeteksi setelah beberapa bulan dan mungkin selama hidup.[2]



Gambar 3. Time line infeksi primer dan sekunder virus dengue dan metode diagnostik yang dapat digunakan[2]

Selama infeksi sekunder titer antibodi meningkat cepat dan bereaksi terhadap semua jenis flavivirus. Isotipe Immunogobulin yang paling dominan adalah IgG yang titernya terdeteksi paling tinggi meskipun pada fase akut dan dapat bertahan sampai dengan 10 bulan kemudian. Stadium konvalesen level IgM jauh lebih rendah pada infeksi sekunder dari pada level IgM pada infeksi sekunder bahkan pada beberapa kasus tidak terlihat. Untuk mengetahui apakah merupakan infeksi primer atau sekunder, perbandingan antara IgM dan IgG harus diketahui dan secara umum menggunakan tes inhibisi hemaglutinasi (haemagglutination-inhibition test).[2]

Diagnostik Molekular Virus Dengue

Diagnostik sangat penting untuk pencegahan, penanganan dan kontrol terhadap adanya bahaya dan sebagai data epidemiologi yang akurat.[19] Diagnosis laboratorium virus dengue dapat dilakukan pada bagian virus, antigen virus, sekuen genom dan atau antibodi. Pemeriksaan IgM dengan ELISA, isolasi virus pada sel nyamuk dan nyamuk hisup, pemeriksaan antibodi monoklonal spesifik dengue, dan pemeriksaan RNA virus dengan amplifikasi asam nukleat.[1] Diagnostik yang ideal adalah

pemeriksaan yang seawal mungkin dan cepat untuk mengetahui kelainan pada sistem tubuh, mudah digunakan, dan perfomance yang mudah diterapkan.[2]

Satu dari empat serotipe virus memberikan respon terhadap infeksi sebagian pada serotipe virus dan dapat diukur dengan pengukuran konvensional termasuk netralisasi reduksi dilution-plaque, komplemen fiksasi dan Hemagglutition Inhibition (HI). Pengukuran dilakukan pada antibodi yang terbentuk dari serotipe tertentu. Namun dalam pengukurannya spesific diagnosis tidak mungkin karena adanya reaksi silang yang ekstensif antar antibodi flavivirus terutama antar virus dengue.[19]

Pada beberapa tahun terakhir pemeriksaan molekular berbasis genomic virus RNA dengan menggunakan *Reverse Transcription* PCR (RT PCR), modifikasi RT-PCR, real time PCR dan metode amplifikasi isothermal yang telah berperan penting untuk menegakkan diagnosis virus dengue selama stadium akut. Dibandingkan dengan metode isolasi virus dan metode serologi, tehnik molekular lebih cepat, lebih sensitif dan spesifik dan dapat membedakan bermacam-macam serotipe virus dengue dan dapat memberikan data epidemiology pada distribusi serotipe virus.[4]

Berikut merupakan macam-macam metode diagnostik yang paling terbaru berdasarkan beberapa studi:

a. RT-PCR (*Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction*)

Pemeriksaan ini mulai dikembangkan tahun 1990-an. Pemeriksaan ini lebih sensitif daripada isolasi virus yang membutuhkan banyak waktu. Pemeriksaan ini memiliki tiga langkah dasar yaitu : ekstraksi asam nukleat, purifikasi dan amplifikasi asam nukelat. Kemudian dilakukan deteksi dan karakterisasi produk amplifikasi.[2]

Banyak laboratorium yang menggunakan pemeriksaan dengan nested RT-PCR dengan menggunakan primer dengan target pada protein C atau protein M pada genom yang merupakan inisial reverse tranrcription dan tahap amplifikasi yang kemudian diikuti pemisahan serotipe virus yang spesifik.[2]

Pemeriksaan ini tergantung pada target genome yang digunakan oleh primer, sehingga produk amplifikasinya terdeteksi dengan baik. Produk amplifikasi tersebut dapat dideteksi dengan nested PCR, blot hybridization dengan probe. Restriksi pada site spesifik PCR, sekuens analisis dan lain-lain.[2]

RT-PCR terbagi atas *one step* and *two step* RT-PCR. One step lebih menguntungkan karena lebih cepat, simpel, dan resiko kontaminasinya rendah dari pada two step RT-PCR.[4]

Tahap RT PCR terdiri dari :

1. Manajemen sampel : Sampel dapat diperoleh dari hasil isolasi virus ataupun dari serum pasien akut. Virus yang akan langsung diperiksa disimpan pada suhu -4^{o}C atau -8^{o}C untuk pemeriksaan kurang dari 24 jam. Namun jika lebih dari 24 jam dilakukan penyimpanan sampel -70^{o}C.
2. Ekstraksi RNA : RNA dipisahkan dari dari sampel serum atau isolasi virus dengan menggunakan suatu kit yang mempunyai carrier dan dapat mengikat RNA sehingga hasil ekstraksi RNA tersebut dapat digunakan. Ekstraksi RNA yang telah direhidrasi dapat disimpan pada suhu -70^{o}C.
3. RT-PCR : Pemeriksaan ini diawali dengan mengubah RNA membentuk cDNA dengan enzim reverse transkriptase. Terdapat beberapa jenis enzim reverse transkriptase yang diketahui. Setelah terbentuk cDNA dilakukan PCR dengan langkah denaturasi, annealing primer dan elongasi. Dari RNA menjadi cDNA dilakukan pada suhu 50^{o}C selama 30 menit. Sedangkan denaturasi pada suhu 94^{o}C selama 15 menit dilanjutkan dengan anneling pada suhu 58^{o}C 1 menit dan elongasi 58^{o}C selama 1 menit.
4. Deteksi dan karakterisasi : Untuk mengetahui hasil amplifikasi dilakukan elektroforesis pada gel agarose 2% dengan menggunakan ethidium bromida dan diperiksa di UV transluminator untuk dibandingkan dengan marker.[20]

b. Real Time RT-PCR

Real Time RT-PCR merupakan satu langkah pemeriksaan yang menggunakan sistem kuantitatif RNA virus dengan menggunakan primer pasangannya dan probe yang spesifik pada setiap serotipe dengue virus. Dengan menggunakan probe fuorosense mampu mendeteksi produksi pada saat tersebut produk PCR langsung saat tersebut pada mesin khusus PCR tanpa membutuhkan

elektroforesis. Pada pemeriksaan ini terjadi akumulasi terus menerus dari cahaya fluorosense dari satu atau lebih reaksi pada PCR selama siklusnya yang kemudian dikonversikan menjadi nilai numerik pada setiap sampel.[21]

Teknik pemeriksaan ini diawali dengan membuat cDNA (*complementary DNA*) oleh *reverse transkriptase*.[21] *Reverse transkriptase*) tersebut akan berfungsi untuk merubah RNA menjadi DNA meskipun tanpa primer yang spesifik yang mempunyai banyak fungsi termasuk untuk membentuk cDNA dan sebagai RT-PCR.[22] Terdapat dua jenis enzim *Reverse transkriptase* yang tersedia yaitu AMV dan MMLV. AMV adalah protein dimer yang didapatkan dari avian myeoblastosis virus. Sedangkan MMLV didapatkan dari Moloney murine Leukemia Virus dan merupakan protein monomer. Kedua enzim tersebut mempunyai aktivitas RNAase H yang mampu mendegradasi RNA pada saat terjadi hibrid RNA-DNA.[21] Banyak *real-time* RT-PCR yang telah dikembangkan diantaranya TaqMan atau teknologi SYBR Green. TaqMan real-time RT-PCR lebih spesifik pada sekuen spesifik terhibridisasi dari probe. Namun, primer dan probe dilaporkan tidak dapat mendeteksi semua jenis strain virus dimana sensitivitas primer dan probe tergantung pada homology dengan target sekuen gen yang akan dianalisis. *Sedangkan SYBR green real-time RT-PCR* mempunyai keuntungan yang lebih simpel pada desain primer dan menggunakan protokol RT-PCR yang umum dan secara teoritis kurang spesifik.[2]

Pengukuran ini dapat dilakukan pada fase akut.[4] Sehingga dapat mengetahui patogenesis viremia oleh infeksi dengue. Metode real time RT-PCR yang dilakukan baru-baru ini dengan menggunakan probe fluorosen mempunyai lebih banyak keuntungan dapat mengukur secara kuantitatif, kontaminasi yang rendah, lebih sensitif, lebih spesifik dan mudah standarisasinya.[21] Yang lebih penting lagi bahwa pemeriksaan ini untuk surveilan populasi vektor demam berdarah dan mendeteksi virus dengue pada nyamuk.[19] Sehingga saat ini real-time RT-PCR merupakan gold standar menggantikan RT-PCR yang konvensional.

Baik PCR konvensional atau Real time RT-PCR lebih banyak digunakan yang one step, karena pada sekali pemeriksaan dapat digunakan untuk mendeteksi 4 jenis serotipe virus dengue. Selain itu metode ini lebih spesifik dan tidak terjadi reaksi silang antara sesama flavivirus ataupun dengan alfaviridae.[4]

Perbandingan dengan pemeriksaan Lainnya

Pemeriksaan Serologi Virus

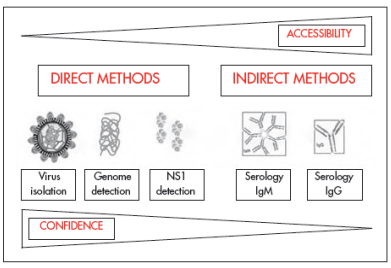
Pemeriksaan ini ditujukan untuk deteksi antibodi spesifik terhadap virus dengue. Dapat dilakukan sampai hari ketujuh gejala muncul.[4] Kelebihan dari pemeriksaan ini adalah waktu untuk penyimpaan sampel lebih fleksibel daripada isolasi virus atau deteksi RNA karena respon antibodi dapat diukur dengan membandingkan sampel yang diperoleh pada fase akut dengan sampel yang diperoleh pada beberapa minggu atau bulan sebelumnya. Hasil test dapat diketahui 1 jam setelah pemeriksaan.[2]

Kelemahan dari pemeriksaan ini adalah tidak spesifik karena tidak mampu untuk membedakan serotipe virus dengue dan tidak dapat mengetahui terjadinya reaksi silang antibodi dengan flavivirus yang lain.[2,4] Selain itu pemeriksaan ini cukup mahal dan kurang akurat.[2]

Isolasi Virus

Virus harus dikumpulkan secepatnya setelah terjadi infeksi selama periode viremia (sebelum 5 hari). Dapat diperoleh dari serum, plasma, atau sel mononuklear dalam darah atau juga dari jaringan hasil otopsi. Kultur sel adalah yang paling sering untuk isolasi virus dengue. Sel nyamuk line C6/36 merupakan host yang rutin dipilih untuk isolasi virus dengue.[2] Keuntungan dari pemeriksaan ini adalah dapat dilakukan pada fase akut, dan spesifik untuk mengetahui serotip tertentu.[2]

Kelemahannya adalah harus dilakukan di laboratorium standar khusus RNA (BSL-2/BSL-3) dan SDM yang handal. Sampel darah harus dijaga pada suhu dingin dan beku untuk menjaga kestabilannya selama dibawa dari pasien ke laboratorium. Pemeriksaan ini butuh waktu yang lebih lama, 1-2 minggu.[2]



Gambar 4. Perbandingan metode diagnostik berdasarkan kemudahan dan kepercayaan[2].

Pada beberapa tahun terakhir tehnik molekular dengan mendeteksi genom viral RNA dengan RT-PCR, metode modikasi RT-PCR, real time RT-PCR dan amplifikasi isotermal yang memberikan peran penting pada diagnosis virus pada stadium akut. Dengan digabungkan dengan metode isolasi virus RNA dan serologi dengan tehnik molekular yang cepat, sangat spesifik dan sensitive akan memberikan data yang berguna untuk data epidemiologi dan distribusi serotipe virus.[4]

Ringkasan

Pemilihan metode deteksi virus dengue sangat diperlukan untuk melakukan deteksi dini pasien dengan infeksi denue. Pemeriksan yang awal dan cepat akan mencegah komplikasi lanjut infeksi dengue.

Kesimpulan

Pemeriksaan virus dengue sangat diperlukan untuk mendeteksi virus dengue pada fase awal untuk mencegah terjadinya kematian pada pasien. Selain itu juga dapat bermanfaat untuk mengetahui penyebaran dan epidemiologi daerah tertentu. Pemilihan pemeriksaan pada infeksi virus dengue harus memperhatikan kepentingan test dilakukan, apakah untuk kepentingan diagnosis klinik, survey epidemiologi, pengembangan vaksin serta dengan mempertimbangkan fasilitas laboratorium dan sumber daya manusia yang tersedia, biaya serta sampel yang ada.

Metode diagnostik dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi membutuhkan teknologi tinggi yang lebih komplek dan tehnik pembacaan yang baik, meskipun metodenya cepat namun harus juga diperhatikan spesifisitas dan sensitifitas pada tingkat kesulitan pengerjaannya. Metode Isolasi virus dan Deteksi asam nukleat merupakan pemeriksaan yang intensif, akurat dan mahal namun lebih spesifik dibandingkan dengan deteksi antibodi dengan metode serologi.

Daftar Pustaka

1. Idrees S, Ashfaq UA. A Brief Review on Dengue Molecular Virology, Diagnosis, Treatment and Prevalence in Pakistan. Genetic Vaccine and Therapy. 2012. 10:1-6.
2. WHO. Dengue Guidelines For Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. WHO. 2009.
3. Stephen JT, Daniel S, David WV. Dengue Epidemiology : Virus Epidemiology, Ecology, and Emergence. Advanced In Virus Research. 2003.
4. Cristina D, Pranav P, Sonja L. Molecular Diagnosis of Flavivirruses. Future Virology. 2011; 6(9):1059-74.
5. Prasetyowati, Roy N. DHF Case Dominated by DEN-3 Serotipe in the west Java Province. Health Science Indonesia. 2012; 3 (1): 23-27.
6. Guzman MG, Kouri G. Dengue: Update. Lancet Infect Dis. 2002; 2: 33-42.
7. WHO. Dengue Haemorrhagiec Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. 2nd ed. WHO. Geneva; 1997.
8. Suwandono A, Nurhayati, Parwati I. Perbandingan Nilai Diagnostik Trombosit, Leukosit, Antigen NS1 dan Antibodi IgM Antidengue. J. Indon Med Assoc. 2011; 61(8): 326-32.
9. Domingo C, palacios G, Niedrig Cabrerizo M, Jabado O, Reyes N, Lipkin WI et al. A New Tool For Diagnosis and Molecular Sueveillance of Dengue Infections in Clinical Sample. Dengue Bulletin. 2004; 28.
10. Hottz Eugenio, Tolley Neal D, Zimmerman Guy A. Weyrich Andrew S. Bozza Fernando A. Haematology : Platelets in dengue infection. Summer 2011; 8 (1-2) p e33–e8.
11. Munoz Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of Interferon Signalling by dengue Virus. PNAS. November 2003; 100 (24).
12. Perera Rushika,Kuhn Richard C. Structure Proteomic of Dengue Virus. NIH Public Acces. Agustus 2008; 11 (4). 369-77.
13. DA Muller, MJ Landsberg, C Bletchly, L Waddington, B Hankamer, et al. Structure of the Dengue Virus Glycoprotein nonstructural protein 1 by electron microscopy and single-particle analysis. J Gen Virol. 2012; 93(4) : 771-9
14. Jacobs Michael G, Robinson Peter J, Bletchyl Cheryl. Mackenzie JM, PR Young. Dengue Virus Nonstruktural Protein 1 is Expressed in Glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of sigal transduction. Faseb Journal. 2000; 14.
15. Morrison Juliet, Aguirre Sebastian, Fernandez S Ana. Innate Immunity Evasion by Dengue Virus. 2012; 4.397-413.
16. McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakeri Z. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhanced virus replication. J Bio Chem. 2011; 286 (25): 22147-59.

17. Utami, B Sri. The Use antibody for Dengue Haemorrhagic Fever Diagnosis. Jurnal Ekologi Kesehatan. Desember 2008. 7 (3). 795-802.
18. Lanciotti Robert S, Calisher Charles H, Gubler Duane J. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. Journal of Clinical Microbiology, 1992. 545-51.
19. Dorak M Tevnik. Real-Time PCR. Taylor Francis Group. UK : 2006
20. Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA. Metodology : Development real time PCR for detection dan quantitation of Dengue Virus. Virology Jurnal. 2009. p6-10.
21. Shu Pei-Yun, Huang Jyh-Hsiung. Current Advances in Dengue Diagnosis. American Society for Microbiology. 2004; 11(4): 642-50.
22. Carter J, Saunders V. Virology Principle and applications. Wiley : 2007.