

Vol. 18, No. 2 Maret 2012

ISSN 0854-4263

INDONESIAN JOURNAL OF
**Clinical Pathology and
Medical Laboratory**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

IJCP & ML (Maj. Pat. Klin. Indonesia & Lab. Med.)	Vol. 18	No. 2	Hal. 77-146	Surabaya Maret 2012	ISSN 0854-4263
---	---------	-------	-------------	------------------------	-------------------

Diterbitkan oleh Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

Published by Indonesian Association of Clinical Pathologists

Terakreditasi No: 66b/DIKTI/KEP/2011, Tanggal 9 September 2011

INDONESIAN JOURNAL OF
**CLINICAL PATHOLOGY AND
 MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

DAFTAR ISI

PENELITIAN

- Korelasi Kadar Crp, TNF- α dan Bone Mineral Density dengan Carboxyterminal Crosslinked Teloepptide Type I of Collagen di Penderita Arthritis Reumatoid
 (Correlation Between CRP, TNF- α and Bone Mineral Density with Carboxyterminal crosslinked Teloepptide Type I of Collagen in Rheumatoid Arthritis Patients)
Kusworini Handono, BP Putra Suryana, Sulistyorini 77-82
- Korelasi antara Kadar Interferon- γ Plasma dengan Jumlah Viral Load di Penderita HIV
 (Correlation of Plasma Interferon- γ and Viral Load in HIV Patients)
Hermi Indita, Endang Retnowati, Erwin Astha Triyono 83-86
- Keterkaitan Antigen NS1 Infeksi Virus Dengue dengan Serotipe Virus Dengue
 (NS1 Antigen Dengue Virus Infection Associated with Serotypes of Dengue Virus)
Roudhotul Ismaillya Noor, Aryati, Puspa Wardhani 87-91
- Nilai Rujukan Free Light Chain Serum dengan Imunoturbidimetri
 (The Reference Value of Serum Free Light Chain with Immunoturbidimetry)
Lidya Utami, Riadi Wirawan, Alida R Harahap, Abdul Muthalib, Harny Edward 92-96
- Acetosal, Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia L.*) dan Waktu Perdarahan
 (Acetosal, Noni Fruits Extract (*Morinda citrifolia L.*) and Bleeding Time)
I Wayan Putu Sutirta Yasa, Ketut Widayani Astuti, I Gusti Made Aman 97-104
- Analisis Pola Human Leukocyte Antigen (HLA) Kelas I pada Penderita Demam Berdarah Dengue Populasi Indonesia di Jawa Timur
 (Analysis of HLA Class I on Dengue Haemorrhagic Fever Indonesian Population in East Java)
EM. Judajana, Paulus Budiono, Indah Nuraini 105-110
- Analisis Filogenetik Dengue di Indonesia
 (Phylogenetic Analysis of Dengue Virus in Indonesia)
Aryati 111-116
- Diagnostic of C-reactive Protein in Febrile Children
 (Nilai Diagnostik C-Reactive Protein pada Anak Demam)
Johanis, Aryati, Dominicus Husada, Djoko Marsudi, M. Y. Probohoesodo 117-123
- Uji Diagnostik Metode Imunositokimia NS1 Virus Dengue, untuk Diagnosis Infeksi
 (Diagnostic Test Method for Immunocytochemical NS1 of Dengue Virus, for Infection Diagnosis)
Nafiandi, Ellyza Nasrul, Rismawati Yaswir 124-128
- Eksresi Koreseptor Human Immunodeficiency Virus CCR5 dan CXCR4 pada Subset Sel Limfosit T Serta Monosit
 (Human Immunodeficiency Virus Coreceptor CCR5 and CXCR4 Expression on Lymphocyte T Subset and Monocyte)
Agnes Rengga Indrati, Hinta Meijerink, Herry Garna, Bacht Alisjahbana, Ida Parwati, Reinout van Crevel, Andre van der Venn 129-133

TELAAH PUSTAKA

- Sindrom Hormon Antidiuretik Berlebih
 (Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone (SIADH))
Arleen N. Suryatenggara, Dalima A. W. Astrawinata 134-140

LAPORAN KASUS

Penderita Dengan Hemokromatosis Primer
(*Patient with Primary Hemochromatosis*)

Kadek Mulyantari, A.A.Wiradewi Lestari, A.A.N. Subawa, Tjokorda Gede Oka, Sudewa Djelantik..... 141-144

INFORMASI LABORATORIUM MEDIK TERBARU **145-146**

UJI DIAGNOSTIK METODE IMUNOSITOKIMIA NS1 VIRUS DENGUE, UNTUK DIAGNOSIS INFEKSI

(Diagnostic Test Method for Immunocytochemical NS1 of Dengue Virus, for Infection Diagnosis)

Nafiandi, Ellyza Nasrul, Rismawati Yaswir¹

ABSTRACT

NS1 protein is a nonstructural protein of dengue virus which are secreted into the blood. NS1 protein could be detected in blood up to nine days after the onset of illness that almost simultaneously with the occurrence of viremia. The purpose of this study is to know the result of diagnostic test method of immunocytochemical NS1 by RT-PCR on dengue virus infected patients which is diagnosed at Dr. M. Djamil hospital. Padang. The method of the research uses cross sectional analytically study with consecutive sampling of patients who diagnosed as infected with dengue virus and treated in the interne ward of Dr. M. Djamil General Hospital Padang from January up to August 2011. Patient 's venous blood was taken about 5 mL and then centrifuged 3500 rpm and then the serum is separated and stored at -20° C until the sample is examined. The examination of NS1 serum is carried out by immunocytochemical method followed by the inspection of RNA viruses and their serotypes by RT-PCR and continued by agarose gel electrophoresis on 1.5 up to 2%. From the sixty samples obtained showed: 71.6% tested positive immunocytochemical NS1, 28.4% negative immunocytochemical NS1, 76.7% positive RT-PCR and 23.3% negative RT-PCR, 23.9% Den-1, 43.3% Den-2, 26.1% Den-3, and 6.5% Den-4. The immunocytochemical NS1 diagnostic test obtained RT-PCR sensitivity of 85%, specificity 71%, positive predictive value 90%, and negative predictive value 59%. The immunocytochemical NS1 has a quite high sensitivity, and low specificity, where as the positive predictive value is quite high, but the negative predictive value is lower than the RT-PCR for the diagnosis of dengue virus infection.

Key words: NS1 protein, virus dengue serotype, immunocytochemical, RT-PCR

ABSTRAK

Protein NS1 merupakan protein nonstruktural virus dengue tertentu yang disekresikan ke dalam darah. Protein NS1 ini dapat ditemukan dalam darah sampai hari ke sembilan setelah permulaan penyakit yang hampir bersamaan dengan kejadian viremia. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil uji diagnostik metode imunositokimia NS1 dengan RT-PCR di pasien yang didiagnosis terinfeksi virus dengue (VD) di RS. Dr. M. Djamil Padang. Penelitian dilakukan secara potong silang dengan analitik pengambilan contoh berurutan dari penderita yang didiagnosis terinfeksi virus dengue dan dirawat di Bagian Penyakit Dalam Rumah Sakit Dr. M. Djamil Padang dari Bulan Januari sampai Agustus 2011. Darah vena penderita diambil sebanyak 5 mL kemudian dipusingkan dengan kecepatan 3500 rpm dan kemudian serumnya dipisahkan serta disimpan pada suhu -20° C sampai dilakukan pemeriksaan. Serum diperiksa dengan metode imunositokimia NS1 dan pemeriksaan virus RNA serta serotipe virusnya dengan RT-PCR yang dilanjutkan dengan elektroforesis gel agarose 1,5–2%. Analisis dilakukan dengan menggunakan SPSS 16. Hasil ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar. Enam puluh sampel yang diperiksa didapatkan 71,6% positif imunositokimia NS1, 28,4% negatif imunositokimia NS1, 76,7% positif RT-PCR dan 23,3% negatif RT-PCR, Den-1 23,9%, Den-2 43,3%, Den-3 26,1% serta Den-4 6,5%. Uji diagnostik imunositokimia NS1 terhadap RT-PCR didapatkan kepekaan 85%, kekhasan 71%, nilai ramalan positif 90%, dan yang negatif 59%. Imunositokimia NS1 memiliki kepekaan cukup tinggi, kekhasan, nilai ramalan positif yang cukup tinggi, sedangkan untuk diagnosis infeksi virus dengue nilai prediksi negatif lebih rendah dibandingkan dengan yang untuk RT-PCR.

Kata kunci: Protein NS1, serotipe virus dengue, imunositokimia, RT-PCR

PENDAHULUAN

Demam berdarah (DBD) atau *dengue haemorrhagic fever* (DHF) merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang paling besar di negara tropik dan subtropik. Penyakit ini disebabkan oleh virus dengue (VD), yang termasuk ke dalam genus *Flavivirus* dan family *Flaviviridae*. Virus dengue mempunyai empat serotipe yaitu Den-1, Den-2, Den-3, dan Den-4.^{1,2} Dari keempat serotipe VD, Den-1 dan Den-2 yang paling

banyak menyebabkan DBD dengan *dengue shock syndrome* (DSS), sedangkan serotipe Den-3 dan Den-4 sangat sedikit kemungkinannya.³

Penyakit DBD sering diragukan diagnosisnya dengan penyakit lain seperti: flu atau tipus. Hal ini disebabkan karena infeksi VD yang menyebabkan DBD dapat bersifat tanpa gejala atau tidak jelas gejalanya.⁴ Diagnosis infeksi VD ditetapkan berdasarkan diagnosis klinik dan laboratorik menurut patokan WHO 1997.⁵

¹ Departemen Patologi Klinik FK UNAND/RS. Dr. M. Djamil Padang Jl. Perintis Kemerdekaan Padang, E-mail: nafiandi@yahoo.com

Virus dengue terdiri dari protein struktural (25% jumlah keseluruhan protein VD yaitu *envelope* (E), selaput (M), inti/*core* (C) dan non-struktural (75%) yaitu NS1 sampai NS5. Protein NS1 ini dihasilkan dalam dua (2) bentuk yaitu: terikat di selaput (mNS1) dan sekresi (sNS1). Protein NS1 virus dengue merupakan satu-satunya protein non-struktural yang terdapat dalam bentuk terlarut yang dilepaskan dan beredar dalam aliran darah.⁶

Secara umum, infeksi VD dapat didiagnosis dengan pemeriksaan laboratorik yaitu: isolasi virus, kenaikan titer antibodi (serologis) antara serum akut dengan titer pemulihan kesembuhan, pembuktian keberadaan RNA virus dengan *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) dari serum atau plasma, dan penemuan antigen.^{5,7}

Saat ini dikembangkan pemeriksaan tertentu terhadap protein non-struktural 1 (NS1) dengue yang dapat menemukan infeksi VD dengan lebih awal, bahkan pada hari pertama permulaan demam, karena protein NS1 bersirkulasi dalam kepekatan tinggi di darah penderita selama awal tahap akut, baik saat infeksi primer maupun sekunder tanpa perlu menunggu antibodi terbentuk.⁸ Cara ini dikenal sebagai imunositokimia dan berasaskan *immunocytochemical streptavidin biotin complex assay*, menggunakan antibodi monoklon DSSC7 khas NS1, termasuk klas IgG, di subklas IgG1 yang imunoreaktif terhadap keempat serotipe VD dan tidak ada reaksi silang dengan antigen radang otak Jepang (*Japanese encephalitis*) serta *chikungunya*.^{9,10}

Penelitian Umniyati¹⁰ menggunakan metode *immunocytochemical streptavidin biotin comple* terhadap nyamuk *A.aegypti* yang terinfeksi VD, didapatkan kepekaan 96%, kekhasan 97%, NPP 97,5%, dan NPN 80%.¹⁰

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil uji diagnostik (kepekaan, kekhasan, nilai peramalan positif/NPP, dan nilai negatifnya/NPN) menurut metode imunositokimia NS1 terhadap RT-PCR di penderita yang didiagnosis terinfeksi VD di RS. Dr. M. Djamil Padang.

METODE

Penelitian ini merupakan kajian potong silang secara analitik. Penelitian dilakukan mulai Bulan Januari sampai dengan Agustus 2011 di ruang rawat inap Bagian Ilmu Penyakit Dalam RS. Dr. M. Djamil Padang dan Laboratorium Patologi Klinik FK UNAND/RS Dr. M. Djamil Padang. Pemeriksaan imunositokimia NS1 dan RT-PCR dilakukan di Laboratorium Biomedik FK UGM.

Populasi penelitian adalah seluruh penderita yang menderita demam 2–7 hari dan dirawat di

Bagian Penyakit Dalam RS. Dr. M. Djamil Padang. Sampel penelitian adalah bagian dari populasi yang sesuai dengan patokan WHO. Sampel diambil secara *consecutive sampling*.

Enam puluh pasien yang didiagnosis dengan patokan WHO 1997 diambil darah venanya sebanyak 5 mL, kemudian dipusingkan dengan kecepatan putar 3500 rpm selama 5 menit. Serumnya kemudian dipisahkan dan disimpan pada suhu -20°C sampai pemeriksaan imunositokimia serta RT-PCR dilakukan.

Isolasi RNA virus dengue dilakukan dengan *Purelink Viral RNA/DNA Kits*[®] (Invitrogen) *Catalog no. 12280-050*.

One-Step RT-PCR dikerjakan untuk menguatkan gen prM *flavivirus* dan juga sebagai model pembentuk (*template*) reaksi PCR berikutnya. *Reverse Transcription* PCR ini dikerjakan dengan menggunakan sepasang *universal primer* yang juga berfungsi sebagai *Outer primer* reaksi PCR berikutnya. Pada penelitian ini digunakan *SuperScript III Platinum One-Step Quantitative* RT-PCR system (Invitrogen). Tatalangkahnya disesuaikan dengan protokol pabrik (Erllich, 1992).

Penguatan DNA virus dengue dengan *Superscript III one step RT-PCR system* dengan *platinum taq DNA polimerase* (Invitrogen).

Program PCR dilakukan dengan membuat cDNA satu (1) daur pada suhu $45-60^{\circ}\text{C}$ selama 15–30 menit, denaturasi satu (1) daur pada suhu 94°C selama 2 menit, penguatan PCR 40 daur pada suhu 94°C selama 15 detik denaturasi dan pada suhu $55-56^{\circ}\text{C}$ selama 30 detik. Kemudian *annealing* pada suhu 68°C selama 1 menit (perpanjangan/ekstensi), perpanjangan terakhir satu (1) daur pada suhu 68°C selama 5 menit.

Hasil PCR dielektrofresis dalam gel agarose 1,5–2%, sebesar 100 bp yang digunakan sebagai petanda untuk menganalisis hasil tersebut.

Imunositokimia NS1 dilakukan dengan metode *Imunocytochemistry Streptavidin Biotin Peroxidase Complex* menggunakan antibodi monoklonal DSSC7.

Analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS versi 16.0. Data yang didapat disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rentang umur penderita yang diteliti berkisar antara 13 sampai 55 tahun dengan rerata usia $24,8 \pm 14,1$ tahun. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan yang didapatkan Selvia¹¹ yaitu umur rerata penderita DBD $25,03 \pm 7,98$ tahun dan Budiarto¹² di Palembang yang umur rerata penderita DBD yang diteliti $\pm 10,71$ tahun, sedangkan Jaya¹³ di Surakarta rerata umur penderita DBD yang diteliti $24,40 \pm 9,31$ tahun.¹¹⁻¹³

Laki-laki lebih banyak daripada perempuan, laki-laki 41 orang (68,3%) dan perempuan sebanyak 19 Orang (31,7%). Hasil ini sama dengan penelitian Selvia¹¹ yang mendapatkan laki-laki 55% dan perempuan 45% serta Jaya¹³ mendapatkan laki-laki 55% dan perempuan 45%.^{11,13}

Hemoglobin rerata didapatkan $14,01 \pm 1,73$ gr/dL dan rerata kadar hematokrit adalah $44,46 \pm 5,3\%$. Jaya¹³ mendapatkan rerata kadar hematokrit penderita DBD $43,10 \pm 5,36\%$ dan Pardede¹⁴ menemukan sedikit lebih rendah dengan rerata $41,40 \pm 5,82\%$.^{13,14}

Rerata jumlah trombosit $62,333 \pm 36,210/\mu\text{L}$. Hasil ini lebih rendah daripada yang didapatkan Selvia¹¹ $64,73 \pm 28,05$ ribu/ μL , Chen¹⁵ $89,00 \pm 5,60$ ribu/ μL .^{11,15}

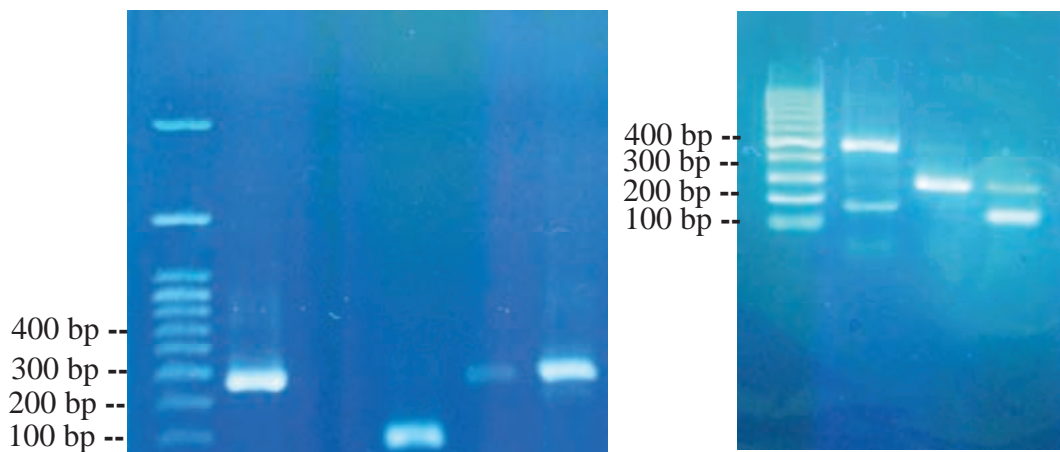
Trombositopenia merupakan salah satu manifestasi yang ditemukan di infeksi VD, yang penyebabnya sampai saat ini masih belum dipahami sepenuhnya. Menurut kepustakaan VD dapat mengimbas penekanan trombosit di sumsum tulang, sehingga menyebabkan kadar trombosit turun, selain itu diduga ada mekanisme imun yang menyebabkan peningkatan kerusakan trombosit mengakibatkan trombositopenia. Sun¹⁶

melaporkan bahwa trombositopenia di penderita DBD disebabkan oleh beberapa hal, yaitu: VD yang melekat di permukaan trombosit dan mengakibatkan aktivasi, serta adanya antibodi di permukaannya.¹⁶

Berdasarkan analisis RT-PCR didapatkan 46 sampel (76,7%) positif, sedangkan 14 sampel (23,3%) negatif. Hasil elektroforesis dari RT-PCR dengan menggunakan gel agarose yang diwarnai bahan pembentuk pewarna krom (kromogenik) (*Goldview*[®], invitrogen) memperlihatkan panjang nukleotida yang berbeda untuk setiap serotipe VD. Yaitu Den-1 berukuran 482 bp, Den-2 119 bp, Den-3 290 bp dan Den-4 389 bp (lihat Gambar 1).

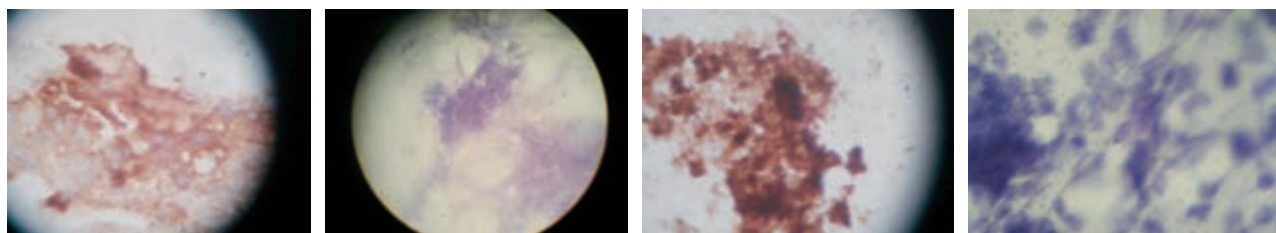
Hasil RT-PCR ditemukan angka banding serotipe VD yang berbeda, yaitu Den-2 merupakan kasus terbanyak yaitu 20 kasus (43,5%), sedangkan yang sedikit ialah: Den-1 11 kasus (23,9%), Den-3 12 kasus (26,1%), dan Den-4 3 kasus (6,5%).

Hasil ini sama dengan yang didapatkan Shu dkk.¹⁷ dan Wang 2009¹⁸ di Taiwan, yaitu serotipe VD yang terbanyak adalah: Den-2, diikuti oleh Den-1. Hasil berbeda didapatkan oleh Selvia¹¹ serotipe VD yang



(lajur 1: standar, lajur 2: Den 3, lajur 4: Den-2, lajur 5 dan 6: Den-3) (lajur 1: standar, lajur 2: Den-1, lajur 3: Den-3, lajur 4: Den-2).

Gambar 1. Hasil PCR serotipe virus dengue



A (Positif)

B (Negatif)

C (Pembanding positif)

D (Pembanding negatif)

A. Hasil pemeriksaan positif, yang terlihat warna coklat di sediaan.
B. Hasil pemeriksaan negatif, yang terlihat warna biru di sediaan.
C. Pembanding positif, D. Pembanding negatif.

Gambar 2. Foto mikroskopis sediaan imunositokimia

terbanyak adalah Den-3 65%, sedangkan yang sedikit Den-2 20% dan Den-1 15%.^{11,17-18}

Perbedaan hasil ini disebabkan oleh perbedaan cara yang dipakai. Pada penelitian ini dipakai metode imunositokimia, sedangkan Hang dkk²⁰, Besoff dkk¹⁹, dan Osorio dkk²¹ memakai metode ELISA. Hang dkk²⁰ dan Besoff dkk¹⁹ memakai antibodi monoklon, sedangkan Osorio dkk²¹ memakai antibodi poliklon. Perangkat yang dipakai ialah antibodi monoklon untuk menemukan antigen NS1 yang hasilnya lebih baik daripada perangkat dengan antibodi poliklon karena antibodi monoklon lebih khas dibandingkan dengan antibodi poliklon.^{19,20,21}

Pemeriksaan imunositokimia NS1 (ISK) dilakukan untuk menemukan protein NS1 yang terdapat di sirkulasi VD. Di hasil analisis tertunjukkan 43 sampel (71,6%) positif dan 17 negatif (28,4%).

Kekuatan diagnostik antibodi anti NS1 memperlihatkan 39 (65%) sampel positif VD berdasarkan pemeriksaan PCR dan ISK, jika dibandingkan dengan pemeriksaan PCR saja. Tujuh (11,2%) sampel positif dengan PCR, tetapi negatif dengan ISK. Sepuluh (16,6%) sampel negatif berdasarkan hasil PCR dan ISK. Empat sampel negatif berdasarkan hasil PCR, tetapi positif ISK. Uji diagnostik memperlihatkan kekuatan diagnostik ISK terhadap PCR adalah 85% untuk kepekaan, 71% untuk kekhasan, NPP 90%, dan NPN 59%. Hasil ini lebih rendah dari yang didapatkan Hang dkk.²⁰ yaitu kepekaan 83,2%, kekhasan 100%, NPP 100%, NPN 38,2%. Besoff dkk.¹⁹ yang mendapatkan kepekaan 83,2%, kekhasan 100%, NPP 100%, dan NPN 62,5%. Sementara itu hasil telitian ini lebih tinggi daripada yang didapatkan Osorio dkk.²¹ yaitu kepekaan 70,8%, kekhasan 91,3%, NPP 95,5%, dan NPN 57,5%.

Tujuh orang penderita menunjukkan negatif palsu, hal ini terlihat di hasil RT-PCR yang positif dan ISK yang negatif. Menurut kepustakaan kadar antigen NS1 berhubungan dengan jumlah virus dalam darah, selain itu juga disebabkan oleh kompleks imun yang terbentuk antara antigen NS1 dan IgG di infeksi sekunder, sehingga NS1 tidak dapat ditemukan dan dapat juga disebabkan pengambilan sampel pada awal dan akhir penggandaan virus.^{18,21}

Hasil negatif antigen NS1 dengan imunositokimia tidak menyingkirkan keberadaan infeksi VD, yaitu pada penelitian ini negatif palsu didapatkan di VD serotipe Den-4, keragaman hasil ini diduga berkaitan dengan serotipe VD yang menginfeksi.²⁰

Sepuluh orang pasien negatif RT-PCR dan imunositokimia NS1, penderita yang didiagnosis DBD berdasarkan patokan WHO ternyata berdasarkan pemeriksaan RT-PCR dan imunositokimia didapatkan hasilnya negatif. Walaupun mengalami keluhan dan gejala seperti DBD, tetapi hal tersebut bukan disebabkan

oleh VD kemungkinan karena bakteri atau virus lain yang merupakan diagnosis bandingan infeksi VD. Jadi diagnosis infeksi VD berdasarkan patokan klinik dan laboratorik rutin saja tidak cukup untuk menetapkan diagnosis terinfeksi VD. Keberadaan trombositopenia dan kebocoran plasma hanya 51% yang memberikan diagnosis infeksi VD yang benar. Krisnamukti²² menemukan di penderita dengan serologis yang positif hanya 60% yang terdiagnosis infeksi VD. Oleh karena itu diperlukan pemeriksaan laboratorik yang khas dapat membedakan infeksi VD dari demam lainnya, terutama pada awal demam, sehingga penatalaksanaannya lebih tepat guna.²²

SIMPULAN DAN SARAN

Imunositokimia NS1 memiliki kepekaan 85%, kekhasan 71%, nilai ramal positif 90%, dan yang negatif 59% untuk diagnosis infeksi VD. Untuk itu perlu penelitian lebih lanjut tentang imunositokimia NS1 ini untuk meningkatkan kepekaan dan kekhasan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kuno G, Chang K, Tsuchiya N, Karabatsos, and Cropp C. Phylogeny of the Genus *Flavivirus*. *J. Virol.* 1998; 72: 73-83.
2. Trent D, Manske G, Fox, M, Chu S, Kliks, and Monath T. The Molecular Epidemiology of Dengue Viruses, Genetic Variation and Microevolution. *Appl. Virol. Res.* 1990; 2: 293-315.
3. Kristina, Isminah, Leni W. Kajian Kesehatan Demam Berdarah Dengue. Jakarta Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan, 2004; 25-34.
4. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, and Seneviratne SL. Dengue Viral Infections. *Postgraduate Medicine Journal*, 2004; 80: 588-601.
5. Wuryadi S. Diagnosis Laboratorium Infeksi Virus Dengue, dalam 'Demam Berdarah Dengue Naskah Lengkap'. Penyunting Hadinegoro S dan Satari H, Jakarta, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2004; 55-62.
6. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, et al. Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells Via Interaction with Heparan Sulfate and Chondroitine Sulfate E. *Plos Pathog.* 2007; 3(183): 83-99.
7. WHO. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. 2009; TDR for Research on Diseases of Poverty; 91-106.
8. Koraka P, Burghoom CP, Falconer A, et al. Detection of immune complex dissociated nonstructural 1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol.* 2003; 4154-9.
9. Umniyati SR, Sutaryo, Wahyono D, Artama WT, Mardihusodo SJ, Soeyoko, et al. Application of Monoclonal Antibody DSSC7 for Detecting Dengue Infection in *Aedes aegypti* Based on Immunocytochemical Streptavidin Biotin Peroxidase Complex Assay (ISBPC). *Dengue Bulletin*, 2008; 32: 83-97.
10. Umniyati SR. Standardization of Immunocytochemical Method for the Diagnosis Viral Infection in *Aedes aegypti* Linn Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Berkala Ilmu Kedokteran*, 2009; 41(1): 1-10.
11. Selvia Y. Hubungan Gambaran Klinis Demam Berdarah Dengue dengan Serotipe Virus Dengue pada Penderita yang Dirawat di bangsal Penyakit Dalam di Beberapa Rumah Sakit di kota

- Padang. Tesis Akhir Program Studi Ilmu Penyakit Dalam FKUA/RS.M.Jamil, Padang, 2005; 34–8.
12. Budianto P. Pemberian Kortikosteroid pada DBD Memperkecil Peningkatan Konsentrasi Trombosit Darah. Tesis Akhir Program Studi Ilmu Penyakit Dalam FK UNSRI Palembang, 2005; 15–9.
 13. Jaya I. Hubungan Kadar Hematokrit Awal dengan Derajat Klinis Demam Berdarah Dengue. Skripsi Akhir FK Muhammadiyah Surakarta, 2008; 10–4.
 14. Pardede E. Kadar Komplemen C3 pada Penderita Demam Berdarah Dengue. Tesis Akhir Program studi Patologi Klinik FK USU. Medan, 2008; 16–9.
 15. Chen RF, Yang KD, Wang L, Liu JW, Chi CC, Cheng JT. Different Clinical and Laboratory Manifestations between Dengue Haemorrhagic Fever and Dengue Fever with Bleeding Tendency. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2007; 10: 1106–13.
 16. Sun DS, King CC, Huang HS. Antitrombosit Autoantibodies Elicited by Dengue Virus Non-Structural Protein 1 Cause Thrombocytopenia and Mortality in Mice. *J Thromb Haemost*, 2007; 5: 2291–9.
 17. Shu YP, Chen LK, Chang SF, Su CL, Chien LJ, et al. Dengue Virus Serotyping Based on Envelope and Membrane and Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific Capture Immunoglobulin M Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Journal of clinical microbiology*, 2004; 42: 2489–94.
 18. Wang SM dan Sekaran SD. Evaluation of a Commercial SD Dengue Virus NS1 Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit for Early Diagnosis of Dengue Virus Infection'. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010; 46: 2793–7.
 19. Bessoff K, Delorey M, Sun W, Hunsperger E. Comparison of Two Commercially Available Dengue Virus (DENV) NS1 Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using a Single Clinical Sample for Diagnosis of Acute DENV Infection. *Clinical and vaccine immunology*, 2008; 26(34): 1513–8.
 20. Hang VT, Nguyet NM, Trung DT, Tricou V, Yoksan S, et al. Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral flow Rapid Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009; 27(47): 35–41.
 21. Osorio L, Ramirez M, Bonelo A, Villar LA, Parra B, et al. Comparison of the Diagnostic Accuracy of Commercial NS1-Based Diagnostic Tests for Early Dengue Infection. *Virology Journal*, 2010; 7: 361–8.
 22. Krishnamurti C, Kalayanarooj S, Cutting MA, et al. Mechanism of Hemorrhage in Dengue Without Circulatory Collapse. *Am J Trop Med Hyg*, 2001; 840–7.