

NILAI DIAGNOSTIK KASET IMUNOKROMATOGRAFI SEBAGAI ALAT PENUNJANG DIAGNOSIS DEMAM BERDARAH DENGUE PADA PENDERITA DEWASA

(The Diagnostic Value of a Cassette Immunochromatographic Test as a Diagnostic and in DHF Adult Patients)

Kusuma Pindayani*, Aryati*, Y. Probahoedo*

ABSTRAK

A rapid immunochromatographic test that incorporates blue particle conjugated with recombinant dengue envelope protein, antihuman IgM monoclonal antibodies and antihuman IgG monoclonal antibodies (Virotec Dengue IgG/IgM XP; Indec Diagnostics, Indonesia using technology of USA) was evaluated by using IgG and IgM captured ELISA (Dengue Duo ELISA, Panbio) which has a 99% sensitivity and a 92% specificity as the "gold standard". This assay, cassette in shape, is performed in 15–30 minutes and detects both immunoglobulin M (IgM) and IgG in a capture format. There were 57 paired sera of dengue haemorrhagic fever (according to WHO 1997 criterias) and 72 sera of non dengue haemorrhagic fever patients (typhoid fever, UTI, malaria, chikungunya, hepatitis and pneumonia). For the diagnosis of dengue virus infection, the rapid test showed a sensitivity of 98%, positive predictive value of 88%, negative predictive value of 98% and specificity of 99%. The rapid test is a useful aid in rapid diagnosis and differentiation between primary and secondary dengue virus infection.

Key words: immunochromatographic cassette, dengue haemorrhagic fever

PENDAHULUAN

Demam berdarah dengue (DBD) yang disebabkan oleh virus dengue (golongan flavivirus), hingga saat ini masih menjadi masalah kesehatan yang penting dan berperan dalam peningkatan angka kesakitan dan kematian di Indonesia. Selama kurun waktu 20–25 tahun sejak awal ditemukan kasus DBD pada tahun 1968 di Surabaya dan Jakarta, angka kejadian penyakit ini terus meningkat. Peningkatan serangan DBD cenderung terjadi pada golongan dewasa dalam 5 tahun terakhir. Di Indonesia, epidemik dimulai sesudah bulan September dan mencapai puncaknya pada bulan Desember.^{1,2}

Diagnosis DBD ditegakkan berdasarkan gejala klinis dan uji laboratoris.³ Diagnosis laboratoris DBD banyak digunakan saat ini berdasarkan pada uji serologi yaitu mendeteksi adanya antibodi terhadap infeksi virus dengue. Uji ini dapat membedakan antara infeksi primer dan sekunder. Penentuan infeksi primer atau sekunder penting karena gejala klinis infeksi virus dengue sekunder biasanya lebih berat dibandingkan infeksi primer. Beberapa kepustakaan dan sebuah studi epidemiologi di Asia Tenggara menunjukkan bahwa infeksi primer hanya

menyebabkan suatu keadaan yang disebut *febrile self limiting disease*, namun apabila suatu saat penderita terkena infeksi virus dengue berikutnya dengan serotipe berbeda (infeksi sekunder) maka akan timbul komplikasi yang lebih berat misalnya renjatan (syok) dan penurunan kesadaran (sindrom syok dengue = SSD).² *Hemagglutination Inhibition (HI)* masih merupakan uji baku emas serologi menurut WHO. Uji ini sensitif namun membutuhkan pasangan serum fase akut dan konvalesen serta tidak spesifik karena sering terjadi reaksi silang dengan infeksi flavivirus lainnya.^{4,5}

Saat ini, uji serologi yang lain yaitu uji *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* merupakan uji serologi yang sederhana.⁶ Uji *IgM* dan *IgG capture ELISA* telah banyak digunakan untuk menggantikan uji *HI*, karena uji *HI* membutuhkan waktu lama, sepasang serum, dan kurang spesifik.⁵ Innis dkk menggunakan uji *IgM* dan *IgG capture ELISA* untuk mendeteksi *IgM* dan *IgG* antidengue dalam darah penderita.⁷ Sebuah uji *capture ELISA* komersial untuk mendeteksi *IgM* dan *IgG* spesifik terhadap virus dengue (Dengue Duo ELISA, Panbio – Australia, No. katalog E-DEN01D) menunjukkan sensitivitas (99%) dan spesifisitas (92%) yang sangat baik dalam

* Bagian Patologi Klinik FK Unair/RSU Dr. Soetomo Surabaya
Email: pdsptklinik_sby@telkom.net

membedakan infeksi primer dan sekunder. Selain itu, *IgG capture ELISA* mempunyai korelasi yang baik dengan uji *HI* ($r = 0,83$, $p < 0,0001$).⁸ Oleh karena itu dalam penelitian ini digunakan uji *IgM* dan *IgG capture ELISA* sebagai uji “baku emas”.

Penelitian menggunakan *Virotec Dengue IgG/IgM XP* (Indec Diagnostics, Indonesia dengan teknologi USA, No. Katalog DS-V30) dengan metode imunokromatografi cepat, secara kualitatif mampu mendeteksi antibodi *IgM* dan atau *IgG* dari ke 4 serotipe virus dengue. Garis *IgG* yang timbul dirancang hanya dapat mendeteksi kadar *IgG* yang tinggi, sehingga dapat membedakan antara infeksi dengue primer dengan infeksi dengue sekunder. Garis *IgM* dirancang untuk mendeteksi kadar *IgM* yang terdapat pada penderita dengan infeksi primer dan sebagian dari infeksi sekunder.

Antihuman IgM monoclonal antibody dan *antihuman IgG monoclonal antibody* diimobilisasi pada membran berkapasitas tinggi, masing-masing pada area tes *IgM* dan *IgG*, serta penggunaan *blue particle* yang dikonjugasi dengan *recombinant dengue envelope protein* sebagai konjugat.

BAHAN DAN METODE

Penderita DBD adalah penderita dewasa yang menderita demam sesuai dengan kriteria diagnosis klinis.³ Infeksi virus dengue dikategorikan menjadi infeksi primer dan sekunder berdasarkan hasil uji *IgM* dan *IgG capture ELISA*. Dikategorikan sebagai infeksi primer apabila *IgM* positif dengan indeks $> 1,1$ (negatif bila $< 0,9$) dan dikategorikan sebagai infeksi sekunder bila *IgG* positif dengan indeks $> 2,2$ (negatif bila $< 1,8$) dengan disertai atau tidak *IgM* yang positif. Penderita nonDBD meliputi penderita dengan diagnosis ISK (infeksi saluran kemih, ditandai dengan perbenihan urin positif), demam tifoid (perbenihan empedu positif), malaria (*ICT* positif, hapusan darah positif), hepatitis (uji serologi positif), pneumonia (foto *thorax* positif dan leukositosis), dan chikungunya (gejala klinis dan uji serologi positif).

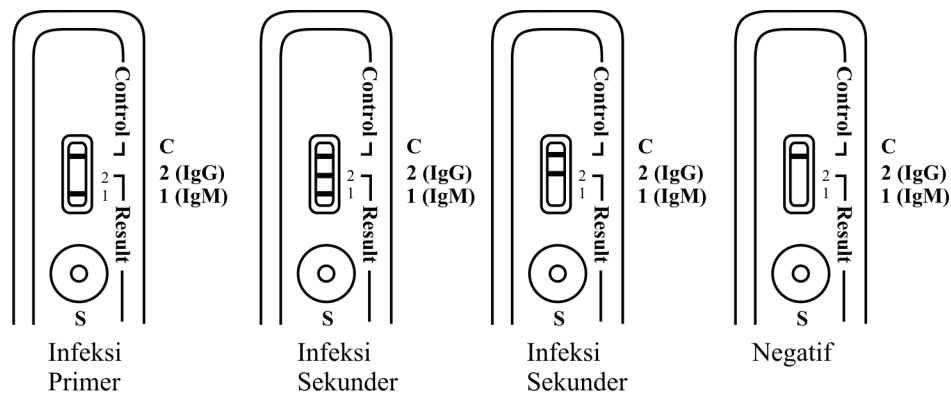
Serum DBD didapat dari penderita yang dirawat di ruang penyakit tropik infeksi RSUD Dr. Soetomo Surabaya, dikumpulkan pada saat masuk dan keluar RS sejumlah 57 pasangan serum. Serum non-DBD didapat dari penderita yang dirawat di ruang Penyakit Dalam RSUD Dr. Soetomo Surabaya, RS Dok II Papua, dan KLB chikungunya di Palembang sejumlah 72 sampel serum tunggal. Sampel serum dimasukkan dalam tabung *microcentrifuge*, dan untuk menjaga kestabilan suhu pengiriman, dikirim dalam wadah berisi *dry ice* yang tertutup rapat kemudian dikirim ke Instalasi/Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Serum disimpan

dalam *freezer* $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hingga saat akan dievaluasi. Pengerjaan *ELISA* dilakukan di laboratorium swasta di Surabaya.

ELISA (Panbio Dengue Duo *ELISA*, catalog No. E-DEN01D). Kit terdiri dari sumuran spesimen yang dilapis dengan *antihuman IgM monoclonal antibodies* atau *antihuman IgG monoclonal antibodies*, antigen rekombinan DEN 1–4, dapat lekat (bufer) pencuci yang bila akan dipakai diencerkan 1:19 dengan air suling, pengencer serum, pengencer antigen *Monoclonal Antibody tracer* yang dikonjugasikan dengan *HRP* (*Horseradish Peroxidase*), larutan *TMB* (*Tetrametilbenzidin*), serum kontrol *IgM* atau *IgG* positif, serum kalibrator *cut-off IgM* atau *IgG*, serum kontrol negatif *IgM* atau *IgG*, dan *stopping solution*. Pertama, tambahkan $10\text{ }\mu\text{L}$ antigen ke dalam $2,5\text{ mL}$ pengencer antigen kemudian dicampur. Sejumlah volume antigen yang telah diencerkan tadi dipindahkan pada tabung yang lain dan dicampur *MAB tracer* dengan volume yang sama. Larutan diinkubasi selama 1 jam pada suhu $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kedua, ditambahkan $100\text{ }\mu\text{L}$ sampel atau kontrol yang telah diencerkan ($10\text{ }\mu\text{L}$ serum atau kontrol diencerkan dengan $1000\text{ }\mu\text{L}$ pengencer serum) ke dalam sumuran lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu $37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sumuran lalu dicuci sebanyak 6 kali dengan bufer pencuci yang telah diencerkan lalu ditambahkan $100\text{ }\mu\text{L}$ kompleks *Ag-MAB tracer* kedalam setiap sumuran dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu $37\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sumuran dicuci kembali sebanyak 6 kali lalu ditambahkan $100\text{ }\mu\text{L}$ *TMB* kedalam setiap sumuran dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$. *Stopping solution* sebanyak $100\text{ }\mu\text{L}$ ditambahkan ke dalam larutan dan dibaca pada $\lambda\text{ }450\text{ nm}$ dengan acuan penyaring (*filter reference*) $600\text{--}650\text{ nm}$. Kalibrator *cut-off* diperiksa secara 3 kali (triplikat) dan diambil nilai rata-rata. Nilai ini adalah nilai *cut-off*. Hasil *ELISA* dinyatakan dalam bentuk indeks. Nilai indeks diperoleh dari nilai absorbansi sampel: nilai *cut-off*.

Uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* Kit terdiri dari *test kit*, *loop* untuk mengambil sampel, dan bufer pengencer. Satu *loop* sampel serum atau $1\text{ }\mu\text{L}$ serum jika menggunakan pipet mikro dimasukkan ke dalam sumuran sampel. Bufer pengencer sebanyak 4 tetes ditambahkan ke dalam sumuran sampel. Hasil dibaca pada 15–30 menit. Hasil yang negatif dikonfirmasi kembali setelah 30 menit, dan pembacaan hasil tidak boleh lebih dari 60 menit. Warna yang timbul pada garis kontrol berwarna merah sedangkan pada garis tes berwarna biru. Hasil *invalid* apabila garis kontrol (warna merah) tidak muncul. Interpretasi hasil dapat dilihat pada Gambar 1.

Data dianalisis menggunakan *chi-square* untuk mengevaluasi adanya perbedaan bermakna uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* antara penderita DBD dan non-DBD.



Gambar 1. Interpretasi hasil uji Virotec Dengue IgG/IgM XP ⁹

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis dalam penelitian ini lebih ditekankan pada sampel serum akut karena klinisi menentukan diagnosis berdasarkan pada fase awal atau penyakit akut.

Tabel 1 menggambarkan karakteristik uji Virotec Dengue IgG/IgM XP pada serum fase akut.

Tabel 1. Karakteristik uji Virotec Dengue IgG/IgM XP pada serum fase akut menggunakan uji ELISA sebagai baku emas.

Serum akut	Virotec Dengue IgG/IgM XP		Total
Kasus	Positif	Negatif	
DBDB	56	1	57
non-DBD	7	65	72
Total	63	66	129

Hasil tersebut dianalisis dengan *chi square*, didapatkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara nilai uji Virotec Dengue IgG/IgM XP pada penderita DBD dan non-DBD ($\chi^2 = 96,3$; $p < 0,0001$). Analisis dari Tabel 1 didapatkan bahwa

sensitivitas uji ini sebesar 98% (56 dari 57) dan spesifisitas 90% (65 dari 72). Nilai ramal positif dari uji ini 88% (56 dari 63) sedangkan nilai ramal negatif 98% (65 dari 66), sehingga efisiensi diagnostik uji ini sebesar 94% (121 dari 129).

Spesifisitas uji Virotec Dengue IgG/IgM XP ditunjukkan dalam Tabel 2. Spesifisitas IgM sebesar 99% (71 dari 72) dengan 1 kasus positif palsu dari penderita malaria. Spesifisitas IgG sebesar 90% (65 dari 72) dengan hasil positif palsu didapat dari 1 kasus ISK, 2 kasus chikungunya, 1 kasus demam tifoid, dan 3 kasus malaria. Spesifisitas total dari uji ini adalah 99% (71 dari 72) dengan hasil positif palsu didapat dari 1 penderita malaria.

Persentase diagnostik dari uji Virotec Dengue IgG/IgM XP untuk infeksi primer dan sekunder ditunjukkan dalam Tabel 3. Dari 4 kasus infeksi primer, terdapat 3 IgM positif (75%) oleh Virotec Dengue IgG/IgM XP dan tidak ada garis IgG atau garis IgG dan IgM yang positif. Pada 110 kasus infeksi sekunder semuanya terdeteksi IgG positif (100%) dan 72 yang terdeteksi IgM positif (65%) oleh uji Virotec Dengue IgG/IgM XP begitu pula dengan garis IgG dan IgM.

Tabel 2. Uji Cross-reactivity Virotec Dengue IgG/IgM XP pada sampel non-DBD dengan menggunakan uji ELISA sebagai baku emas

Jenis Penyakit	% Spesifikasi		
	Σ IgM Negatif/Total	Σ IgG Negatif/Total	Σ IgM atau IgG negatif/Total
ISK	12/12 (100)	11/12 (92)	12/12 (100)
Chikungunya	24/24 (100)	22/24 (92)	24/24 (100)
Demam tifoid	6/6 (100)	5/6 (83)	6/6 (100)
Pneumonia	11/11 (100)	11/11 (100)	11/11 (100)
Hepatitis	12/12 (100)	12/12 (100)	12/12 (100)
Malaria	6/7 (86)	4/7 (57)	6/7 (86)
Total	71/72 (99)	65/72 (90)	71/72 (99)

Tabel 3. Pengujian *Virotec Dengue IgG/IgM XP* untuk infeksi dengue primer dan dengue sekunder menggunakan *ELISA* sebagai baku emas.

	Jumlah sampel Positif/total jumlah sampel	
	Dengue Primer	Dengue Sekunder
Garis IgM	3/4 (75)	72/110 (65)
Garis IgG	0/4 (0)	110/110 (100)
Garis IgM dan IgG	0/4 (0)	72/110 (65)

Analisis pasangan serum menunjukkan bahwa dengan menggunakan sampel serum fase akut, Uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* mendeteksi adanya 1 dari 2 infeksi primer (50%) dan 55 dari 55 (100%) infeksi sekunder sedangkan bila menggunakan serum konvalesen, terdeteksi 2 dari 2 (100%) infeksi primer dan 55 dari 55 (100%) infeksi sekunder (Tabel 4).

Pembacaan hasil uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* ini dilakukan oleh 3 orang analisis menggunakan uji *Wilcoxon signed ranks* dan uji kesesuaian *weighted kappa* menyatakan bahwa secara umum tidak ada perbedaan antara ketiga pembaca.

Saat ini masih dijumpai kesulitan dalam menentukan diagnosis infeksi virus dengue, baik pada penderita rawat jalan maupun pada penderita rawat inap. Tidak jarang penderita dirawat dengan diagnosis kerja demam berdarah hanya atas dasar salah satu kriteria laboratorium saja atau bahkan tidak sama sekali. Kadang-kadang tanpa manifestasi perdarahan yang nyata, tetapi didapatkan nilai hematokrit yang tinggi dan jumlah trombosit cenderung rendah.¹⁰ Untuk kasus meragukan diperlukan pemeriksaan laboratorium yang dapat membantu menegaskan diagnosis infeksi virus dengue dalam waktu singkat. Pada DBD yang terlambat ditegakkan diagnosisnya sering berakibat fatal. Angka kematian kasus DBD pada penderita yang tidak dirawat dan diobati segera mencapai 50%, tetapi angka tersebut menurun sampai 5% dengan tindakan yang cepat dan tepat, baik dalam diagnosis maupun dalam penatalaksanaannya.¹¹

Virotec Dengue IgG/IgM XP adalah uji imunokromatografi generasi terbaru sebagai penunjang diagnosis infeksi dengue baik primer maupun sekunder dan dapat mendeteksi adanya antibodi terhadap ke-4 jenis serotipe dengue. Uji ini

hanya membutuhkan serum tunggal, cepat (dapat dibaca setelah 15–30 menit inkubasi), berbentuk *cassette*, dan warna garis yang timbul pada kontrol berwarna merah, berbeda dengan warna pada garis uji berwarna biru⁹ sehingga mudah diamati dan memperkecil kesalahan di interpretasi hasil. Bila warna garis sama (terkadang) pada hasil negatif di mana hanya garis kontrol saja yang timbul, akan mempengaruhi pembacaan seakan-akan timbul pula warna pada garis uji sehingga disimpulkan hasil positif.

Penggunaan membran nitroselulosa dengan kapasitas tinggi meningkatkan sensitivitas dari tes, sedangkan untuk meningkatkan spesifisitas digunakan *antihuman IgM* dan *antihuman IgG monoclonal antibodies* dengan derajat purifikasi yang tinggi dan berperan sebagai antigen. *Blue particle* yang dikonjugasi dengan *recombinant dengue envelope protein* berperan sebagai konjugat. *Protein envelope* merupakan target epitop netralisasi dan dipakainya rekombinan karena dapat menggambarkan mayoritas bagian aktif dari protein *envelope*.¹²

Peran uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* sangat dibutuhkan dalam membantu penentuan diagnosis infeksi DBD, terutama pada fase akut. Uji ini dapat dipercaya terbukti dengan perbedaan yang bermakna antara nilai uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* pada penderita DBD dan non-DBD serta mempunyai nilai diagnostik yang tinggi sebagai penunjang diagnosis DBD (sensitivitas 98%, spesifisitas 90%, nilai ramal positif 88%, nilai ramal negatif 98%, dan efisiensi diagnostik sebesar 94%).

Spesifisitas diagnostik uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* ini pada serum penderita akut sebesar 90% (Tabel 1), bila diperhatikan tersendiri garis *IgM* atau *IgG*, spesifisitas total meningkat sebesar 99% (Tabel 2). Adanya perbedaan ini disebabkan karena pada Tabel 1 ada 7 kasus nonDBD yang uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* menunjukkan hasil positif, sedangkan pada Tabel 2, karena digunakan pula kriteria gabungan *IgM* atau *IgG* yang negatif, maka hanya ada 1 kasus non-DBD yang uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* menunjukkan hasil positif yaitu pada 1 kasus malaria (*IgM* dan *IgG* positif). Kasus positif palsu banyak terjadi pada garis *IgG* yaitu terdapat pada 1 kasus ISK, 2 kasus chikungunya, 1 kasus demam tifoid, dan

Tabel 4. Deteksi infeksi virus dengue oleh uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* menggunakan pasangan serum dengan *ELISA* sebagai baku emas.

	Jumlah sampel positif/total jumlah sampel			
	IgM serum akut	IgM serum konvalesen	IgG serum akut	IgG serum konvalesen
Dengue primer	1/2 (50)	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2 (0)
Dengue sekunder	35/35 (64)	37/55 (67)	55/55 (100)	55/55 (100)

3 kasus malaria, sedangkan positif palsu pada garis IgM dari 1 penderita malaria. Hal ini menunjukkan bahwa dalam pembacaan garis IgG (infeksi sekunder) kita hendaknya lebih berhati-hati dan tetap harus dikonfirmasi dengan pemeriksaan klinis dan hasil laboratorium yang lain.¹³

Infeksi dengue sekunder yang menunjukkan manifestasi klinis lebih berat daripada infeksi dengue primer, lebih memerlukan perhatian lebih mendalam karena kemungkinan timbul komplikasi yang berat seperti syok dan perdarahan. Uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* mendeteksi 75% IgM positif pada kasus infeksi primer dan 0% IgG positif. Pada kasus infeksi sekunder, 100% IgG positif dan IgM yang terdeteksi positif sebanyak 65%. Diagnosis infeksi sekunder tidak harus menunggu timbulnya garis IgM positif, namun cukup dengan timbulnya garis IgG karakteristik untuk infeksi sekunder sudah dapat dikatakan adanya infeksi sekunder (hanya 25–78% IgM positif pada infeksi sekunder akut).¹⁴ Hal ini menunjukkan bahwa uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* sangat baik dalam membedakan infeksi primer dan sekunder.

Analisis serum sepasang menunjukkan bahwa pada infeksi dengue primer fase akut tidak ada garis IgG yang timbul (0%), hal ini menggambarkan bahwa pada infeksi dengue primer memang hanya IgM saja yang timbul.

Analisis kesesuaian antara ke-3 pembaca menggunakan uji *Wilcoxon signed ranks* dan uji kesesuaian *weighted kappa* menyatakan bahwa secara umum tidak ada perbedaan antara ketiga pembaca. Hal ini menggambarkan bahwa uji tersebut tidak mempunyai subyektivitas tinggi dalam pembacaan hasil. Garis yang ditimbulkan jelas terbaca dan terlihat perbedaan warna antara garis kontrol dan garis uji.

SIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa terdapat beda yang bermakna antara hasil uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* pada penderita DBD dengan non-DBD sehingga uji ini memiliki nilai diagnostik tinggi sebagai alat penunjang diagnosis DBD dan dapat membedakan antara infeksi dengue primer dengan infeksi dengue sekunder secara cepat, praktis, dan andal.

Perlu dilakukan pula uji *Virotec Dengue IgG/IgM XP* ini pada beberapa sampel flavivirus lainnya (misalnya pada infeksi *Japanese encephalitis*) untuk menilai bagaimana reaksi silang infeksi flavivirus lainnya terhadap uji ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami sampaikan terima kasih atas bantuan pengadaan bahan penelitian kepada PT. Pacific Biotekindo Intralab.

DAFTAR PUSTAKA

1. Soegijanto S, Sustini F, Wirahjanto A. *Epidemiologi Demam Berdarah Dengue*. Dalam: Demam Berdarah Dengue, Tinjauan dan Temuan Baru di Era 2003. Cetakan I. Surabaya, Airlangga University Press, 2004; 1–10.
2. Suroso, Chrishantoro T. Informasi Produk PanBio Dengue Fever Rapid Strip IgG dan IgM. Edisi ke-2. Jakarta, PT Pacific Biotekindo Intralab, 2004; 3–16.
3. WHO. Dengue Haemorrhagic Fever Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. 2nd edition, Geneva, WHO/TDR, 1997; 1–84.
4. Guzmán MG, Alvarez M, Vazquez S, Kouri G. Laboratory Diagnosis of Dengue Infection: Epidemiology and Field Studies in Dengue Diagnostics: proceeding of international workshop. 4–6 October. Switzerland, WHO/TDR Geneva, 2004.
5. Kao CL, King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJ. Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection: Current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect*, 2005; 38: 5–16.
6. Gubler DJ. Serological Diagnosis of Dengue Haemorrhagic Fever. *Dengue Bull*, 1996; 20: 20–23.
7. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdcaraya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg*, 1989; 40: 418–27.
8. Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, Kalayanarooj S, Dung NM, Kneen R, Cuzzubo A. Rapid Serologic Diagnosis of Dengue Virus Infection Using a Commercial Capture ELISA that Distinguishes Primary and Secondary Infections. *Am J Trop Med Hyg*, 1999; 60(4): 693–8.
9. Leaflet Virotec Dengue IgG/IgM XP Index Diagnostic.
10. Soedarmo SSP. Demam Berdarah pada Anak UI. Press, 1988.
11. Monath TP. Viral Febrile Illness. In: Hunter's Tropical Medicine. 6th ed. Philadelphia, Saunders, 1984; 143–9.
12. Heinz FX. Epitope Mapping of Flavivirus Glycoproteins. *Adv. Virus Res.* 1986; 31: 103–68.
13. Lam SK. Dengue Haemorrhagic Fever, Reviews in Medical Microbiology, 1995; 6: 39–48.
14. Aryati. Aspek Diagnostik Laboratoris DBD. Dalam: Memberantas Penyakit Infeksi Menuju Masyarakat Indonesia Sehat 2010. Simposium Akbar Penyakit Tropik dan Infeksi FK UHT Rumkital Dr. Ramelan. 2006. (unpublished).