

Rasio IgM/IgG Fase Akut Untuk Menentukan Infeksi Dengue Sekunder

Bagus Ngurah Putu Arhana

Latar belakang. Uji hemaglutinasi inhibisi (HI) memerlukan waktu relatif lama untuk menentukan infeksi dengue primer dan sekunder, karena memerlukan pemeriksaan serum pada fase akut dan konvalesen. Beberapa penelitian dengan menggunakan rasio IgM/IgG untuk menentukan infeksi primer dan sekunder menghasilkan rasio yang berbeda-beda.

Tujuan. Untuk mengetahui gambaran IgM dan IgG pada infeksi Dengue dan akurasi rasio IgM/IgG secara Elisa pada fase akut untuk menentukan infeksi sekunder.

Metoda. Dilakukan uji diagnostik pada sampel yang diambil secara berkesinambungan (*consecutive sampling*) pada 62 anak yang dicurigai menderita demam berdarah dengue antara Juli 2003 sampai dengan Juni 2004, dengan menggunakan rasio IgM/IgG secara Elisa pada fase akut. Uji Hambatan Hemaglutinasi sesuai dengan kriteria WHO sebagai baku emas.

Hasil. Dari 62 anak yang ikut dalam penelitian ini, ditemukan 48 anak dengan infeksi sekunder dan 14 anak dengan infeksi primer. Kadar rerata IgG pada anak dengan DBD baik syok maupun tidak lebih tinggi secara bermakna daripada demam dengue. Prevalensi infeksi sekunder adalah 77,4%. *Cut off point* paling baik dari rasio IgM/IgG sebagai prediktor infeksi sekunder adalah $\leq 0,9$ (sensitivitas 87,5%, spesifisitas 92,9%, rasio kemungkinan 12,3). Prevalensi dari syok pada infeksi sekunder adalah 16,7%. *Cut off point* paling baik dari rasio kadar IgG sebagai prediktor SSD pada infeksi sekunder adalah $\geq 165,0$ U/mL (sensitivitas 87,5%, spesifisitas 97,5%, rasio kemungkinan 35,0).

Kesimpulan. Kadar rerata IgG pada DBD nonsyok dan DBD syok secara bermakna lebih tinggi daripada demam dengue. Rasio IgM/IgG $\leq 0,9$ dapat dipakai sebagai prediktor infeksi sekunder dan kadar IgG $\geq 165,0$ U/mL dapat dipakai sebagai prediktor terjadinya syok pada infeksi sekunder.

Kata kunci: DBD, infeksi primer dan sekunder, rasio IgM/IgG.

Alamat korespondensi:

Dr. Bagus Ngurah Putu Arhana, SpA(K), Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Anak, FK Unud/RS Sanglah Denpasar, Jalan P Nias, Denpasar. Tel. (0361)227911-227915 Pes. 128. Fax. (0361)244038

Virus Dengue merupakan virus dengan penularan melalui gigitan nyamuk dari famili *Flaviviridae* dan terdiri dari empat serotipe (den 1-4).^{1,2} Kurang lebih 50 juta orang di dunia terinfeksi virus dengue, dan lebih dari 2,5 miliar orang berisiko terinfeksi dengue di daerah

tropis dan sub-tropis.³ Distribusi infeksi dengue ini sesuai dengan fakta bahwa nyamuk mempunyai distribusi luas di daerah tropis dan sub-tropis menyebabkan infeksi dengue sebagai salah satu masalah kesehatan paling penting.⁴ Manifestasi klinis infeksi dengue bervariasi dari tanpa gejala, gejala ringan sampai berat,^{5,6} dan manifestasi klinis penyakit yang lebih berat ini dikaitkan dengan terjadinya fenomena perdarahan dengan kebocoran plasma pada demam berdarah dengue (DBD), yang terutama mengenai anak-anak muda.^{6,7} Kejadian DBD dan SSD paling banyak pada orang yang sebelumnya telah mempunyai antibodi dengue.⁸ Pada infeksi primer IgM anti-dengue muncul lebih dahulu daripada IgG dan biasanya terdeteksi pada hari ke-5 dan menurun dalam 1-2 bulan. Pada infeksi sekunder IgG anti-dengue cepat meninggi dan IgM produksinya sedikit. Perbedaan pada sub-kelas IgG dapat menentukan aktivasi komplemen dan ikatan reseptor Fcγ. Faktor ini juga berperan dalam perkembangan *antibody dependant enhancement* (ADE) serta patogenesis DBD h.^{6,7,9}

Rasio IgM dan IgG serum pada fase akut dapat digunakan untuk membedakan infeksi primer dan sekunder,¹⁰ namun WHO sampai saat ini masih menggunakan uji hambatan hemaglutinasi sebagai baku emas untuk menentukan infeksi primer dan sekunder pada DBD.¹¹

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kadar IgM dan IgG pada infeksi dengue dan akurasi rasio IgM/IgG secara Elisa pada fase akut untuk menentukan infeksi primer dan sekunder.

Bahan dan Cara Kerja

Penelitian ini merupakan uji diagnostik untuk menilai akurasi IgM/IgG berdasarkan uji Elisa anti-dengue untuk menentukan infeksi sekunder pada DBD dengan menggunakan uji hambatan hemaglutinasi sebagai baku emas. Penelitian dilaksanakan di Sub Divisi Infeksi Tropis, Bag/SMF Ilmu Kesehatan Anak, FK Unud/Rumah Sakit Sanglah Denpasar, mulai tanggal 1 Juli 2003 - 30 Juni 2004. Pengumpulan data dilakukan secara prospektif dan subyek diambil secara *consecutive sampling* sampai jumlah subyekl terpenuhi (sesuai dengan perhitungan jumlah sampel minimal). Subyek penelitian adalah anak dengan diagnosis klinis suspek DBD yang menjalani rawat inap, dengan kriteria inklusi yaitu anak berumur lebih dari satu

tahun, titer IgM $\geq 1,0$ unit/mL, dan bersedia mengikuti penelitian. Anak tidak diikutkan dalam penelitian, jika menderita DM, *sickle cell anemia*, atau mendapat pengobatan immunosupresif.

Diagnosis klinis DBD ditegakkan berdasarkan kriteria WHO tahun 1997.¹¹ Batasan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah,

- DBD adalah DBD derajat I dan II.
- SSD adalah DBD derajat III dan IV.
- Demam dengue (DD) adalah manifestasi klinis infeksi dengue yang dibuktikan dengan uji hambatan hemaglutinasi, tanpa disertai tanda kebocoran plasma.¹¹
- Infeksi primer: infeksi virus dengue yang ditandai oleh adanya kenaikan titer antibodi hambatan hemaglutinasi ≥ 4 dengan titer $\leq 1:1280$ pada fase konvalesen.¹¹
- Infeksi sekunder: infeksi virus dengue yang ditandai oleh adanya kenaikan titer antibodi hambatan hemaglutinasi ≥ 4 kali dengan titer $\geq 1:2560$ pada fase konvalesen.¹¹
- *Drop out* adalah subyek yang telah ikut penelitian, namun dalam perawatan subyek meninggal, menolak melanjutkan penelitian atau tidak kontrol setelah dipulangkan dari rumah sakit.

Subyek *drop out* diganti dengan pasien baru sampai tercapai jumlah sampel minimal 62 anak. Selanjutnya pasien/orang tua diminta mengisi dan menandatangani *inform consent*. Jika setuju, diwawancarai oleh peneliti dengan menggunakan kuesioner, dan dilakukan pencatatan terhadap hasil pemeriksaan fisik serta perkembangan klinis yang berhubungan dengan gejala DBD. Penanganan selama di RS dilaksanakan sesuai prosedur tetap yang berlaku. Selama dirawat diambil sampel darah 1 mL tiap hari untuk pemeriksaan hemoglobin, leukosit, hematokrit dan trombosit. Pemeriksaan darah tepi juga dilakukan pada fase konvalesen (saat kontrol setelah dipulangkan) pada subyek yang tidak mengalami hemokonsentrasi selama fase akut. Pengambilan sampel darah fase akut untuk pemeriksaan uji HI, IgM dan IgG dengan tehnik Elisa dilakukan pada hari sakit ke-5/6. Untuk uji HI fase konvalesen pengambilan sampel darah dilakukan 2-3 minggu setelah pengambilan yang pertama. Sampel yang telah memenuhi kriteria inklusi dibagi menjadi dua kelompok didasarkan atas hasil uji hambatan hemaglutinasi sesuai kriteria WHO. Penelitian ini telah disetujui oleh Komite Penelitian dan Pengembangan RS Sanglah/FK Unud.

Anak yang memenuhi kriteria infeksi sekunder dimasukkan ke dalam kelompok infeksi sekunder, dan yang lain dimasukkan ke dalam kelompok infeksi primer. Masing-masing kelompok diuraikan karakteristik klinis, dan laboratorium. Selanjutnya dihitung rerata umur, berat badan, kadar IgM, IgG dan rasio IgM/IgG dan dijabarkan pula jenis kelamin, dan manifestasi klinis masing-masing kelompok

Pengolahan data menggunakan program *Statistical Product and Service Solutions (SPSS) 11.5 for Windows*. Uji *t* dilakukan untuk mengetahui perbedaan kadar rerata IgM dan IgG antara demam dengue dan bukan demam dengue (DBD dan SSD), selanjutnya dihitung nilai sensitifitas, nilai spesifisitas, nilai duga positif, nilai duga negatif, akurasi, dan rasio kemungkinan dari nilai *cut off* rasio IgM/IgG. Nilai *cut-off* ditentukan dengan menggunakan kurva *receiver operator characteristic (ROC)*.

Hasil Penelitian

Karakteristik Subyek

Selama periode penelitian Juli 2003 sampai dengan Juni 2004 dari 191 anak yang didiagnosis suspek DBD, 67 anak memenuhi kriteria penelitian, 5 anak *drop out* terdiri dari 4 anak tidak datang pada pengambilan darah uji HI pada fase konvalesen, 1 anak oleh karena sampel darah tidak memenuhi syarat, sehingga hanya 62 anak yang dapat diinterpretasi hasil uji HI. Di dapatkan 48 (77,4%) anak mengalami infeksi sekunder, 14 (22,6%) anak dengan infeksi primer. Manifestasi klinis anak dengan infeksi sekunder adalah demam dengue pada 17 anak, DBD non syok pada 23 anak, dan DBD syok pada 8 anak. Sedangkan 14 anak dengan infeksi primer semuanya termasuk dalam demam dengue. Kadar rerata IgM dan rasio IgM/IgG lebih tinggi pada kelompok infeksi primer, sedangkan kadar rerata IgG lebih tinggi pada kelompok infeksi sekunder (Tabel 1)

Uji diagnostik rasio IgM/IgG untuk menentukan infeksi sekunder

Dilakukan uji diagnostik untuk mencari nilai *cut off* rasio IgM/IgG sebagai uji untuk menentukan infeksi sekunder. Didapatkan rasio IgG : IgM $\leq 0,9$

merupakan nilai terbaik sebagai uji diagnostik untuk menentukan infeksi sekunder dengan nilai sensitifitas 87,5%, spesifitas 92,9%, nilai ramal positif (NRP) 97,7%, nilai ramal negatif (NRN) 68,4%, akurasi 88,7%, dan dengan rasio kemungkinan (RK) 12,3. Untuk menunjukkan tingkat sensitifitas dan spesifisitas dari rasio IgM/IgG dalam menentukan infeksi sekunder pada masing-masing nilai *cut-off* digambarkan dengan kurva *receiver operator characteristic (ROC)* (Gambar1).

Uji diagnostik kadar IgG untuk menentukan Dengue Syok pada infeksi sekunder

Dilakukan uji diagnostik untuk mencari nilai *cut off* kadar IgG sebagai uji untuk menentukan SSD pada infeksi sekunder. Didapatkan kadar IgG $\geq 165,0$ U/mL sebagai prediktor untuk menentukan SSD dengan nilai sensitifitas 87,5%, spesifisitas 97,5%, NRP 87,5%, NRN 97,5%, akurasi 95,8%, dan dengan RK 35,0. Untuk menunjukkan bagaimana tingkat sensitifitas dan spesifisitas dari kadar IgG untuk menentukan DBD syok pada masing-masing nilai *cut-off* digambarkan dengan kurva ROC.(Gambar 2)

Diskusi

Pada karakteristik dasar nampak kadar rerata IgM dan rasio IgM/IgG lebih tinggi pada kelompok infeksi primer, sebaliknya kadar rerata IgM lebih rendah pada kelompok infeksi sekunder. Untuk mengeliminasi virus pada infeksi pertama kali peran IgM permukaan sel plasma sangat penting. Adanya IgM permukaan ini menyebabkan sel plasma menghasilkan IgM dalam waktu singkat dan dalam jumlah yang banyak. Pada infeksi sekunder peran IgM diambil alih oleh IgG sehingga produksi IgM menjadi tidak sebesar pada infeksi primer.^{12,13}

Manifestasi klinis kelompok infeksi sekunder tampak lebih berat, dari pada kelompok infeksi primer (semuanya demam dengue)(Tabel 1). Dari 62 subyek yang ikut dalam penelitian, 48 (77%) merupakan infeksi sekunder, sisanya 14 (23%) infeksi primer. Tujuh belas (35%) dari 48 subyek yang mengalami infeksi sekunder bermanifestasi sebagai demam dengue, 23 (48%) DBD non syok, dan 8 (17%) sebagai DBD syok. Empat belas anak dengan infeksi

Tabel 1. Karakteristik subyek

Karakteristik demografi, klinis, dan laboratorium	Infeksi sekunder (n=48)	Infeksi primer (n=14)
Jenis kelamin, n(%)		
Laki-laki	27 (56,3)	6 (42,9)
Perempuan	21 (43,7)	8 (57,1)
Umur, bulan, rerata (SD)	70,83 (29,57)	61,36 (38,81)
Berat badan, kg, rerata (SD)	20,77 (7,64)	19,50 (8,89)
IgM (u/mL), rerata (SD)	38,23 (25,52)	71,30 (37,39)
IgG (u/mL), rerata (SD)	103,72 (61,39)	12,31 (13,55)
Rasio IgM/IgG	0,95 (2,29)	9,40 (6,74)
Manifestasi klinis, n (%)		
Demam dengue	17 (35,4)	14 (100,0)
DBD non syok	23 (47,9)	0 (0,0)
DBD syok	8 (16,7)	0 (0,0)

Tabel 2 menunjukkan bahwa kadar rerata IgG pada DBD lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan pada kelompok DD.

Tabel 2. Perbandingan kadar rerata IgM dan IgG pada DD dan DBD

Kadar (U/mL)	DD (N=31)	DBD (N=31)	95% CI	p
IgM, rerata (SD)	53,22 (32,95)	38,17 (28,62)	(-0,63634)-(30,72021)	0,06
IgG, rerata (SD)	48,69 (44,98)	117,47 (67,34)	(-97,87673- (-39,69101)	0,000

Uji *t*, bermakna $p < 0,05$

Kadar rerata IgG pada DBD syok jauh lebih tinggi dibandingkan dengan pada penderita dengan DBD. (Tabel 3)

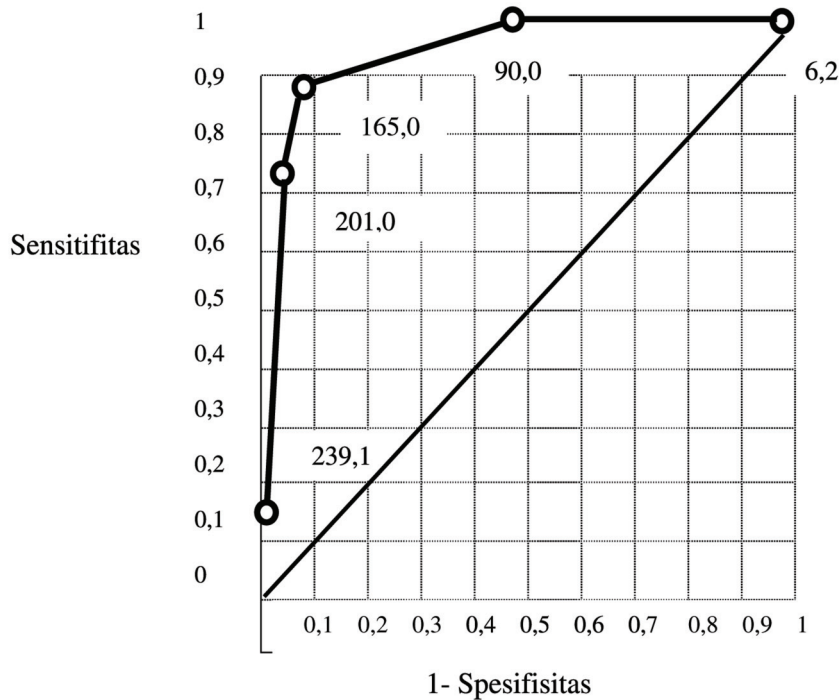
Tabel 3. Perbandingan kadar rerata IgM dan IgG antara penderita DD, DBD non syok, dan DBD syok

Kadar (U/mL)	DD (n=31)	non syok (n=23)	DBD syok (n=8)
IgM, rerata (SD)	53,22 (32,95)	41,33 (31,03)	29,09 (18,88)
IgG, rerata (SD)	48,69 (44,98)	85,83 (40,51)	208,46 (39,05)

primer semua menderita demam dengue, dan semua DBD baik syok maupun tidak (100%) adalah infeksi sekunder. Halstead (dikutip dari Sumarno¹⁴) mendapatkan bahwa tidak semua pasien DBD terjadi pada infeksi sekunder. Pada infeksi primer dapat bermanifestasi sebagai DBD baik syok maupun tidak, tetapi hampir semua pasien yang mengalami syok terjadi pada infeksi sekunder. Teori virulensi menyatakan bahwa untuk timbulnya DBD tidak perlu dua kali infeksi, satu kali saja cukup bila virus penyebab

virulen. Galur serotipe den-2 diketahui mempunyai virulensi yang berpotensi menimbulkan gejala berat.¹³ Untuk mengidentifikasi adanya galur tersebut diperlukan teknik isolasi virus.

Penelitian rasio IgM/IgG untuk menentukan infeksi primer dan sekunder menunjukkan hasil yang berbeda. Pada penelitian kami, rasio IgM/IgG $\leq 0,9$ dapat digunakan untuk menentukan infeksi sekunder dengan sensitifitas 87,5%, spesifisitas 92,9%, nilai ramal positif 97,7%, nilai ramal negatif 68,8%, akurasi



Gambar 2. Kurva ROC IgG sebagai prediktor untuk menentukan dengue syok pada infeksi sekunder dalam berbagai nilai *cut-off* kadar IgG (unit/mL)

88,7%, dan dengan rasio kemungkinan 12,3. Penelitian oleh Innis dkk.¹⁵ yang dilakukan di Thailand dengan menggunakan uji hemaglutinasi inhibisi sebagai baku emas, nilai *cut-off* dari rasio IgM/IgG pada infeksi sekunder adalah $\leq 0,56$ dengan sensitivitas 92% dan spesifisitas 96%. Sai Kit Lam dkk.¹⁶ pada penelitiannya di Malaysia mendapatkan nilai *cut off* rasio IgM/IgG $\leq 0,5$ pada infeksi sekunder dengan sensitivitas 95% dan spesifisitas 94%. Hasil yang hampir sama pada penelitian Innis dan Sai Kit Lam tersebut mungkin karena Malaysia dan Thailand mempunyai seroepidemiologis hampir sama. Beda dengan penelitian kami, secara epidemiologis tempat penelitian kami memang beda dengan Malaysia dan Thailand. Selain itu, adanya kemungkinan reaksi silang dengan flavivirus lain. Adanya reaksi silang ini telah dibuktikan oleh Pei dkk.¹⁷ yang pada penelitiannya di Cina mendapatkan, 10% IgG pada pasien infeksi dengue menunjukkan *cross-reactive* dengan flavivirus lain.

Banyak penelitian yang telah dilakukan oleh para ahli untuk berusaha menjelaskan hubungan antara respon imun dan variasi manifestasi klinis yang timbul pada infeksi dengue. Pada manifestasi yang berat,

penganut teori *secondary heterologous infection* yang kemudian diperkuat teori ADE menganggap antibodi *cross-reactive* dengue yang ada dan sel T merupakan sentral dari patogenesis infeksi dengue. Hipotesis ini menyatakan bahwa antibodi nonneutralisasi *cross-reactive* dari infeksi sebelumnya memfasilitasi masuknya virus dengue ke reseptor Fc pada monosit/makrofag. Peningkatan jumlah APC terinfeksi mengaktifasi prekursor sel T memori *cross-reactive* yang ada dalam jumlah besar sebagai hasil infeksi oleh virus dengue heterologus sebelumnya. Selain mengakibatkan pelepasan mediator kimia yang menyebabkan kebocoran plasma dan peningkatan derajat penyakit, juga mengakibatkan sel plasma memproduksi antibodi IgG dalam jumlah besar, suatu antibodi heterotipik yang tidak efektif untuk mengeliminasi serotipe virus yang sedang menginfeksi.⁷ Pada penelitian kami, didapatkan kadar rerata IgG pada kelompok infeksi sekunder lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok infeksi primer 103,72 (SD 61,39) versus 12,31 (SD 13,55). Berdasarkan manifestasi klinis didapatkan kadar rerata IgG pada subyek yang mengalami DBD baik syok maupun tidak lebih tinggi secara bermakna

dibandingkan dengan yang mengalami DD 117,47 (SD 67,34) versus 48,69 (SD 44,98), 95%CI (-97,87673)-(39,69101). Dari 48 subyek yang mengalami infeksi sekunder, 17(35%) sebagai Demam Dengue, 23 (48%) sebagai DBD non syok, dan 8 (17%) sebagai DBD syok dengan kadar rerata IgG cenderung bertambah tinggi sesuai dengan derajat penyakit (48,69; 85,83; 208,46 U/mL). Koroka dkk.¹⁸ berdasarkan korelasi antara kinetik subkelas imunoglobulin serum spesifik virus dengue menyimpulkan bahwa peningkatan kadar IgG antidengue terutama IgG1 dan IgG3 dapat dijadikan petanda risiko terjadinya DBD dan DBD syok. Pada penelitiannya didapatkan kadar IgG1 dan IgG3 pada DBD dan DBD syok lebih tinggi secara bermakna dibandingkan pada DD. Dijelaskan bahwa IgG1 dan IgG3 heterotipik yang terbentuk efektif mengikat komplemen, sehingga terjadi aktivasi komplemen yang selanjutnya menginduksi pembekuan dan mungkin koagulasi intravaskular yang memperberat derajat penyakit. Hasil yang kami dapat dan juga hasil penelitian Koroka dkk. sesuai dengan teori ADE.

Berdasarkan uji diagnostik untuk mencari nilai *cut-off* kadar IgG $\geq 165,0$ unit/mL dapat digunakan sebagai prediktor terjadinya Syok dengan sensitifitas 87,5%, spesifisitas 97,5%, nilai ramal positif 87,5%, nilai ramal negatif 97,5%, akurasi 95,8%, dan rasio kemungkinan 35,0.

Kelemahan pada penelitian ini adalah jumlah sampel sedikit; variabel luar yang dapat mempengaruhi respon imun seperti umur, jenis kelamin, dan status gizi tidak dapat kami kendalikan karena pada uji diagnostik secara metodologi memang tidak memungkinkan untuk itu. Hal lain yang dapat mempengaruhi hasil penelitian adalah adanya kemungkinan reaksi silang dengan flavivirus lain pada subyek yang kami teliti, yang tidak dapat kami buktikan.

Kesimpulan

Kadar rerata IgG pada kelompok infeksi sekunder lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok infeksi primer, dan kadar rerata IgG pada DBD baik yang mengalami syok atau tidak lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan DD. Berdasarkan sensitifitas, spesifisitas, nilai ramal positif, nilai ramal negatif, akurasi, dan rasio kemungkinan, maka *cut-off* yang terbaik untuk menentukan infeksi sekunder adalah

pada rasio IgM/IgG $\leq 0,9$ dan kadar IgG $\geq 165,0$ U/mL pada infeksi sekunder baik sebagai prediktor terjadinya syok. Ratio IgM/IgG secara Elisa dapat dipakai untuk mendiagnosis tipe infeksi dengue karena hanya memerlukan satu kali pemeriksaan untuk menentukan tipe infeksi dan pada saat yang sama kadar IgG dapat digunakan sebagai prediktor terjadinya SSD.

Daftar Pustaka

1. Tabel 2 menunjukkan bahwa kadar rerata IgG pada DBD lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan pada kelompok DD. Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Taka-saki, Masaru Nawa, Sadao Yabe, Ichiro Kurane. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10:725-8.
2. Katrin CL, Vaughan DW, Douglas MW. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. J Virol 1999; 73:4738-47.
3. Vanda AUFS, Silvana F, Evaldo SA. Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infections. J Clin Microbiol 2004; 42:1782-4.
4. Srisakul CK, Ananda N, Walter EB, Larry W, Donald B. Antibody dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. Am J Trop Med Hyg 1989;40:444-51.
5. Vaughn DW, Sharone G, Kalayanarooj S. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. J Infect Dis 1997; 176:322-30.
6. Maria GG, Gustavo K. Advances in dengue diagnosis. Clin Diagn Lab Immunol 1996; 3: 621-7.
7. Robert A, Wang SL, Osioy C, Issekutz AC. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. J Virol 1997; 71: 4226-32.
8. Juffrie M, K Haasnoot, LG Thijs. Dengue virus infection and dengue hemorrhagic shock. Crit & Care 2000; 3:130-47.
9. Ohmann HB. Pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. Trend in Microbiol 1997; 5:409-12.
10. Alan L.R. Clinical presentation and diagnosis of dengue virus infection. UpToDate 2001; 9:1-7.
11. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever:

- diagnosis, treatment and control. Jenewa, 1997 .h. 1-83.
12. Feldmann M. Cell cooperation in the antibody response. Dalam: Roitt, Brostoff, Male, penyunting. Immunology. Edisi ke-5. Philadelphia: Mosby, 1998.h.139-50.
 13. Sutaryo. Dengue. Edisi pertama. Yogyakarta: Medika Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada, 2004.h.1-241.
 14. Sumarmo. The epidemiology control and prevention of dengue hemorrhagic fever (DHF) in Indonesia. *Cermin Dunia Kedokteran* 1994;92: 5-10.
 15. Innis BL, Nisalak S, Nimmannitya 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.
 16. Sai Kit Lam, Cheng Lan Ew, Jody L Mitchell, Andre J C, Peter L Devine. Evaluation of a capture screening enzyme-linked immunosorbent assay for combined determination of immunoglobulin M and G antibodies produced during dengue infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7:850-2.
 17. Pei YS, Li KC, Shu FC. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *J Clin Immunol* 2003; 10:622-30.
 18. Koroka P, Suharti C, Setiati E. Kinetics of dengue-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome infection. *J Clin Microbiol* 2001;39:4332-8