

# Laboratory Diagnosis of Dengue virus

**Shabnam Tehrani M.D.**

**Associate Professor of Infectious Diseases**

**Shahid Beheshti University of Medical Sciences**

**Clinical HIV/AIDS Fellowship**

# مقدمه

- ▶ ویروس دنگی ، یک فلاوی ویروس از خانواده فلاویویریده است که شامل چهار سروتیپ ۱-۴ می باشد.
- ▶ دنگی شایع ترین عفونت آربو ویروس در جهان می باشد به طوری که تخمین زده می شود سالانه ۴۰۰ میلیون نفر به این ویروس آلوده می شوند.
- ▶ ناقل اصلی آن پشه های آئدس *Aedes albopictus* و *Aedes aegypti* می باشند.

# Dengue virus genome and proteins

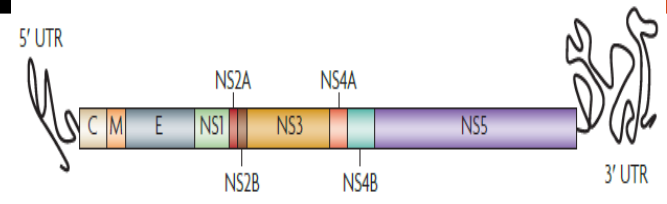
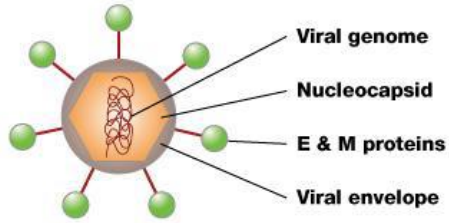
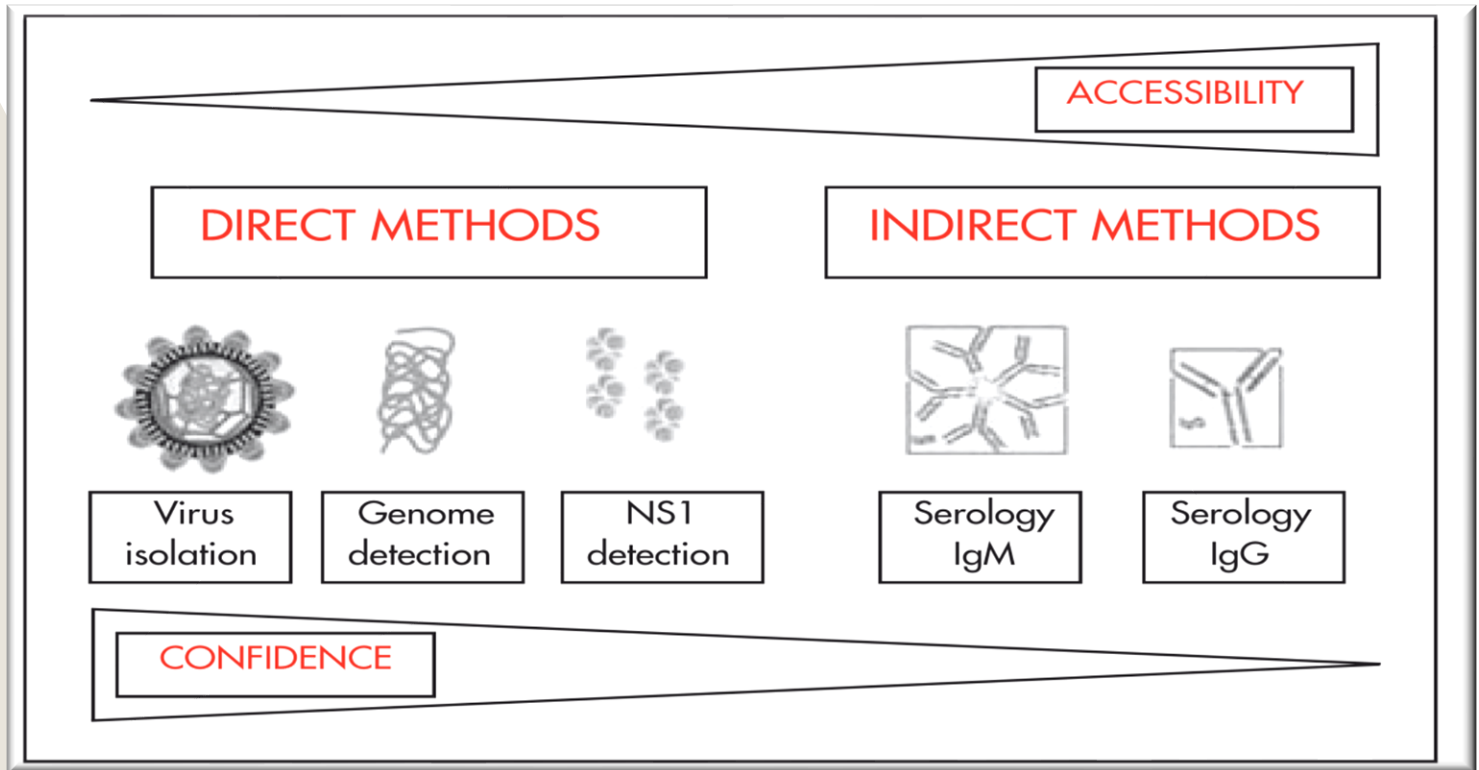


Table 1 | Main features of dengue virus non-structural proteins

Protein	Size (kDa)	Key features	Main functions	Refs
NS1	46	<ul style="list-style-type: none"> <li>Can be endoplasmic reticulum-anchored, membrane-associated or secreted (sNS1)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Intracellular NS1 is involved in early viral RNA replication</li> <li>sNS1 activates the innate immune system and is implicated in vascular leakage</li> </ul>	25,27, 39,40
NS2A	22	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hydrophobic integral membrane protein</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Involved in RNA replication</li> </ul>	303
NS2B	14	<ul style="list-style-type: none"> <li>Small hydrophobic protein</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Co-factor for NS3</li> </ul>	303
NS3	69	<ul style="list-style-type: none"> <li>Multifunctional protein with several catalytic domains</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Involved in nucleoside triphosphatase and helicase functions during RNA synthesis</li> </ul>	304
NS4A	16	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hydrophobic integral membrane protein</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Required for the formation of replication vesicles</li> </ul>	304
NS4B	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>Small hydrophobic protein</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Suppresses IFN<math>\beta</math> and IFN<math>\gamma</math> signalling</li> </ul>	304
NS5	105	<ul style="list-style-type: none"> <li>Largest and most highly conserved dengue virus protein</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Involved in RNA synthesis</li> <li>Involved in blockade of the IFN system</li> </ul>	305

IFN, interferon; NS, non-structural.

# روشهای تشخیصی مستقیم (ویروس و اجزای آن) و غیر مستقیم (آنتی بادی های ضد ویروس) عفونت ویروس دنگی



# Direct Methods

## شناسایی اسید نوکلئیک

- ▶ روش های مولکولی مانند RT-PCR ، برای یافتن اسید نوکلئیک ویروس
- ▶ در بیماران مشکوک در طی ۷ روز اول بیماری برای تشخیص انجام میگیرد.
- ▶ شناسایی ژنوم ویروس بیانگر عفونت قطعی ویروس دنگی می باشد.

## شناسایی آنتی ژن NS1

- ▶ آنتی ژن NS1 در مرحله ماد عفونت با ویروس دنگی یعنی زمانی که ویرمی وجود دارد در خون قابل تشخیص است و در « هفته اول» شروع علائم برای تشخیص بیماری مساسیت بالا و مشابه روش های مولکولی را دارد.
- ▶ این آنتی ژن در بعضی از بیماران پس از هفته اول و معمولا تا روز ۹ بیماری نیز قابل شناسایی می باشد.
- ▶ به طور کلی شناسایی آنتی ژن NS1 در حال حاضر با روش های ELISA و تشخیص سریع انجام می شود.

# Indirect Methods



▶ شناسایی آنتی بادی های اختصاصی ویروس دنگی، معمولا به روش ELISA و روش های تشخیص سریع ایجاد می شود، اگر چه سایر روشهای سرولوژیک نظیر ایمونوفلورسانس نیز می تواند به این منظور مورد استفاده قرار گیرد.

▶ نمونه مورد نیاز: برای شناسایی IgM و IgG **نمونه سره** (ارجم)، پلاسما و خون کامل (فقط برای تست تشخیص سریع) می باشد.

## تشخیص آزمایشگاهی

- ویرمی در دنگی کوتاه مدت است و عموماً از ۳ - ۲ روز قبل از بروز تب شروع شده و معمولاً تا ۷ - ۴ روز از شروع علائم بیماری ادامه می یابد. **در این دوران تست های مولکولی و آنتی ژنی مثبت می باشد.**

- در حدود ۵۰ درصد موارد **IgM** از روزهای ۵ - ۳ شروع بیماری قابل شناسایی بوده، به سرعت در عرض دو هفته افزایش می یابد و پس از ۳ - ۲ ماه به مد غیر قابل شناسایی می رسد.

## تشخیص آزمایشگاهی

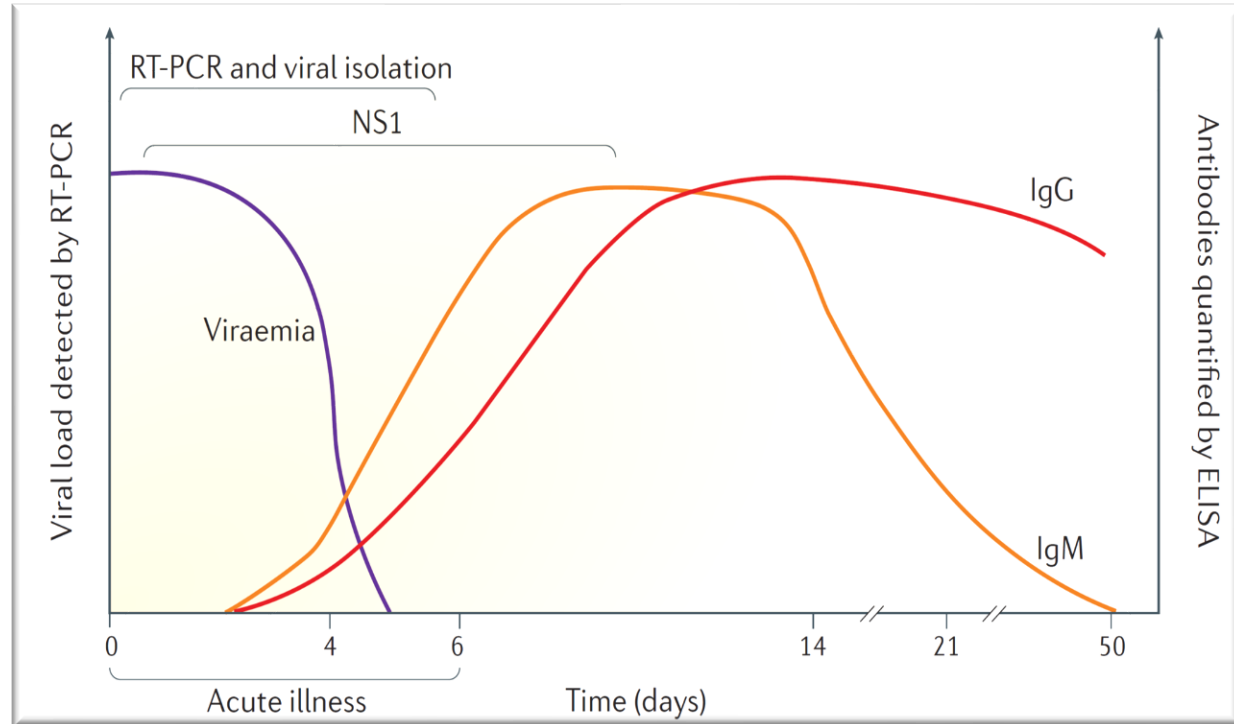
- IgG در پایان هفته اول از شروع علائم با تیترا پایین قابل شناسایی می شود و بتدریج افزایش یافته و تا مدت های طولانی (چندین سال) مثبت باقی می ماند.

بنابراین در طی پنج روز اول شروع علائم، تست های IgM & IgG معمولا منفی می باشد.



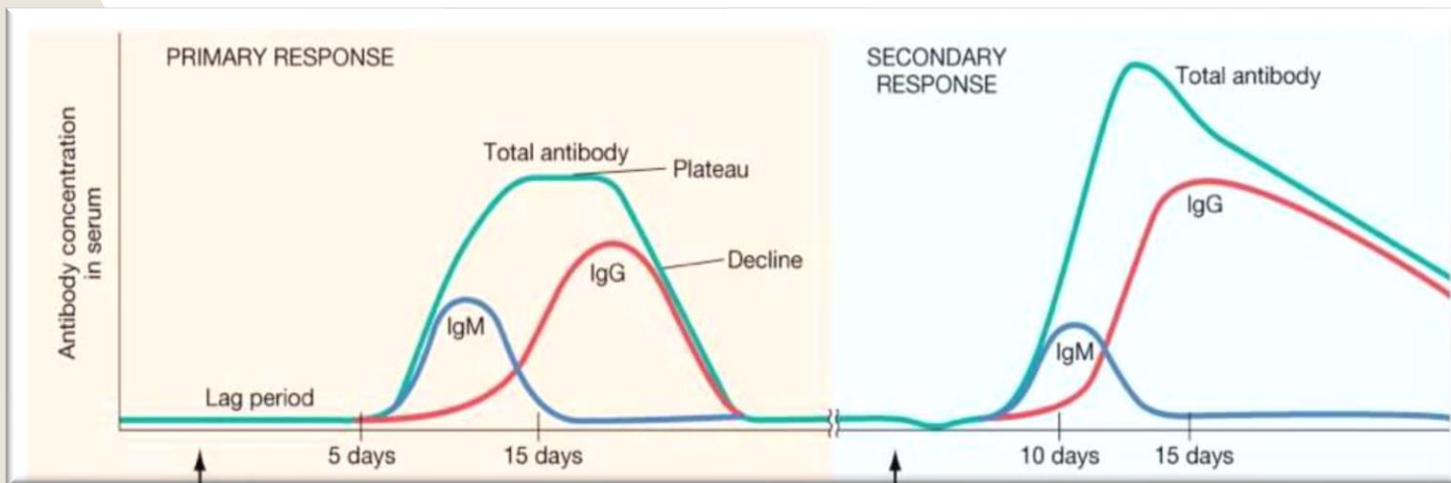
# Dengue virus infection kinetic

بنابراین در هفته اول بیماری  
بهترین روش تشخیص شناسایی  
ویروس و اجزای آن ( ژنوم و  
آنتی ژن ویروسی) و در هفته  
دوم آنتی بادی های ضد ویروس  
می باشد.

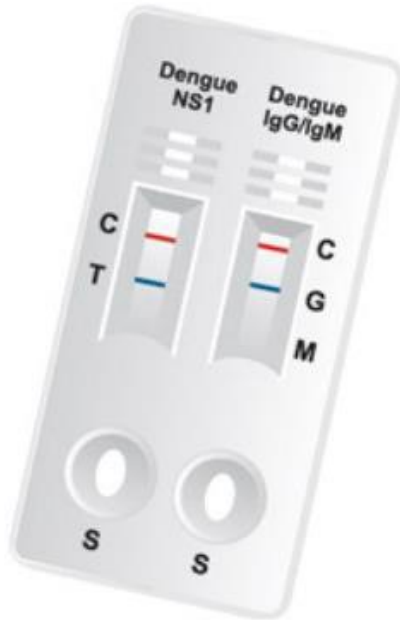


## پاسخ آنتی بادی در عفونت اولیه در مقابل عفونت ثانویه

در طی عفونت ثانویه، دنگی (فرد قبلاً مبتلا شده بوده است)، تیتر آنتی بادی به سرعت افزایش می یابد و حتی در روزهای اول نیز تیتر IgG بسیار بالا است و ممکن است تا پایان عمر مثبت بماند. تیتر IgM در عفونت ثانویه پایین می ماند. طول مدت زمان ویرمی در عفونت های ثانویه کوتاه تر است.



# Rapid Diagnosis Assays



## Sensitivity :

- 92.4% (Dengue NS1 Ag)
- 94.2% (Dengue IgG/IgM)

## Specificity :

- 98.4%(Dengue NS1 Ag),
- 96.4% (Dengue IgG/IgM)

# Diagnosis Assays

Diagnostic tests	Advantages	Limitations
Viral isolation and identification	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Confirmed infection</li> <li>• Specific</li> <li>• Identifies serotypes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requires acute sample (0–5 days post onset)</li> <li>• Requires expertise and appropriate facilities</li> <li>• Takes more than 1 week</li> <li>• Does not differentiate between primary and secondary infection</li> <li>• Expensive</li> </ul>
RNA detection	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Confirmed infection</li> <li>• Sensitive and specific</li> <li>• Identifies serotype and genotype</li> <li>• Results in 24–48 hours</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Potential false-positives owing to contamination</li> <li>• Requires acute sample (0–5 days post onset)</li> <li>• Requires expertise and expensive laboratory equipment</li> <li>• Does not differentiate between primary and secondary infection</li> </ul>
<b>Antigen detection</b>		
Clinical specimens (for example, using blood in an NS1 assay)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Confirmed infection</li> <li>• Easy to perform</li> <li>• Less expensive than virus isolation or RNA detection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Not as sensitive as virus isolation or RNA detection</li> </ul>
Tissues from fatal cases (for immunohistochemistry, for example)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Confirmed infection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Not as sensitive as virus isolation or RNA detection</li> <li>• Requires expertise in pathology</li> </ul>
<b>Serological tests</b>		
IgM or IgG seroconversion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Confirmed infection</li> <li>• Least expensive</li> <li>• Easy to perform</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IgM levels can be low in secondary infections</li> <li>• Confirmation requires two or more serum samples</li> <li>• Can differentiate between primary and secondary infection*</li> </ul>
IgM detection (single sample)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identifies probable dengue cases</li> <li>• Useful for surveillance, tracking outbreaks and monitoring effectiveness of interventions</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IgM levels can be low in secondary infections</li> </ul>

\*Primary infection: IgM-positive and IgG-negative (if samples are taken before day 8–10); secondary infection: IgG should be higher than 1,280 haemagglutination inhibition in convalescent serum.

# تعاریف موارد ممتل و قطعی تب دنگی

## تب دنگی تأیید شده

مورد محتمل با حداقل یکی از موارد زیر:

- NS1 مثبت در تست الایزا یا ریپید و/یا وجود ژنوم ویروس در تست مولکولی
- کشت مثبت ویروس
- افزایش قابل ملاحظه در تیتراژ IgG (چهار برابر یا بیشتر)
- IgG or IgM seroconversion

## تب دنگی محتمل

بیماری حاد تب دار بالای ۳۸ درجه

بعلاوه:

- سابقه اپیدمیولوژیک مثبت \* یا
- سرولوژی مثبت (IgM و/یا IgG مثبت در یک نمونه)
- علاوه دو یا بیشتر از علائم زیر:
- سردرد شدید
- درد حدقه چشم ها (پشت چشم ها)
- علائم گوارشی نظیر تهوع، استفراغ
- میالژی، ضعف، خستگی
- آرترالژی/درد شدید استخوانی
- بثورات جلدی ماکولوپاپولر یا موربیلیفرم
- علائم خونریزی از نقاط مختلف نظیر بینی، لته، ...
- لکوپنی کمتر/مساوی  $5000 \text{ cells/mm}^3$
- ترومبوسیتوپنی کمتر از  $150,000 \text{ cells/mm}^3$
- تست تورنیکه مثبت
- افزایش هماتوکریت (۱۰-۰.۵٪)

\* سابقه سکونت یا سفر در دو هفته گذشته به:

1. منطقه اندمیک (در سال های متوالی بیماری در آن منطقه وجود داشته باشد) یا
2. منطقه همراه با انتقال محلی (منطقه ای که شرایط انتقال بیماری یعنی حضور همزمان پشه ناقل و مخزن بیماری در آن مهیا باشد) یا
3. منطقه آلوده به ناقل مهاجم آندس (پشه در منطقه استقرار یافته است به معنی استقرار گسترده آندس اجپیتی یا آلبویکتوس در منطقه ای وسیع تر از ۲۵ کیلومتر مربع) یا
4. سکونت در منطقه در معرض خطر (مناطق که دارای شرایط آب و هوایی مناسب با زیست و تکثیر ناقل مهاجم باشد و نیز احتمال وجود مخزن بیماری (انسان مبتلا در مرحله ویرمیک بیماری) در آن منطقه وجود داشته باشد).

تذکره: با توجه به اینکه تقسیم بندی فوق در طول زمان تغییر خواهد کرد موارد ۱ تا ۴ بر اساس استعمال حوزه درمان و اعلام رسمی مرکز مدیریت بیماری های واگیر خواهد بود.



## الگوریتم تشخیص آزمایشگاهی عفونت ویروس دنگی در ایران

▶ در این الگوریتم نمونه فاز ماد بیماری که در مرحله ویرمی (۷ روز اول بیماری) تهیه شده است برای شناسایی ژنوم با روش RT-PCR ، شناسایی آنتی ژن NS1 و شناسایی آنتی بادی های IgM و IgG با روش ELISA مورد استفاده قرار می گیرد.

• در صورتی که تشخیص قطعی بر اساس نمونه اول حاصل نگردید ، نمونه دوم ( نمونه فاز نقاهت) با فاصله « ۱۴ روز» از نمونه اول تهیه شده و برای شناسایی آنتی بادی های IgM و IgG با روش ELISA مورد استفاده قرار می گیرد.

## تفسیر نتایج آزمایشگاهی.

### تشخیص ممتل عفونت ویروس دنگی

- ▶ مثبت شدن IgM در یک نمونه بالینی
- ▶ مثبت شدن IgG در یک نمونه بالینی
- ▶ مثبت شدن IgM و IgG در یک نمونه بالینی

### تشخیص قطعی عفونت ماد ویروس دنگی

- ▶ مثبت شدن هر یک از موارد زیر:
- ▶ روش های تشخیص مولکولی
- ▶ آنتی ژن NS1
- ▶ سروکانورژن IgM در نمونه فاز نقاهت نسبت به نمونه فاز ماد
- ▶ سروکانورژن IgG در نمونه فاز نقاهت نسبت به نمونه فاز ماد
- ▶ افزایش حداقل ۴ برابری تیتراژ آنتی بادی IgG در نمونه فاز نقاهت نسبت به نمونه فاز ماد

## نخیره سازی نمونه

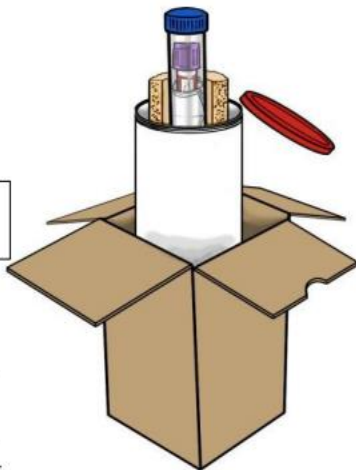
- ▶ نمونه ارجع برای انجام آزمون های تشخیصی سره و مداقل مجم ۲ میلی لیتر مورد نیاز است.
- ▶ اگر قرار است در طی ۴۸ ساعت فرآوری شود یا به آزمایشگاه رفرانس ارجاع شود : **در یفچال ( ۲-۸ درجه سانتی گراد )** نگهداری شود .
- ▶ اگر قرار است بعد از ۴۸ ساعت اول یا ظرف ۷ روز فرآوری شود، در **دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ( فریز )** نگهداری شود.
- ▶ اگر قرار است « بعد از یک هفته » فرآوری شود، آن را در **دمای ۷۰- درجه سانتی گراد فریز** کنید. نمونه را می توان برای مدت طولانی نگهداری کرد.

## حمل و نقل نمونه

Primary Container

Secondary Container

Tertiary Container



نصیر ۲

ممل با یغ.

همیشه از بسته بندی سه گانه استفاده کنید.

ارسال ظرف ۴۸ ساعت

نمونه های اصلی باید بسته بندی، برچسب گذاری و علامت گذاری شوند

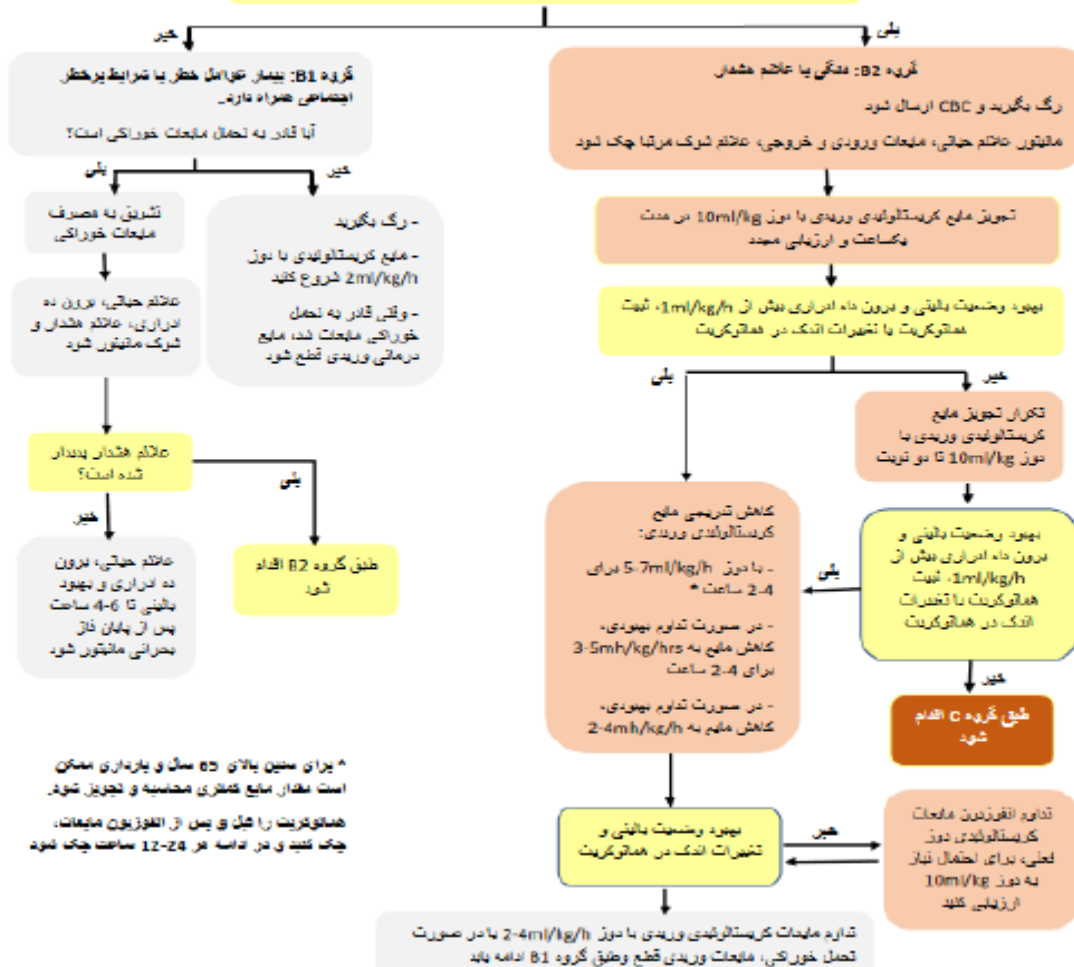
همیشه همراه نمونه، برگه شامل علایم بالینی و اپیدمیولوژیکی بیمار را کاملاً تکمیل کنید

# اقدامات درمانی

# درمان بیماران بر اساس تظاهرات بالینی و شرایط بیمار

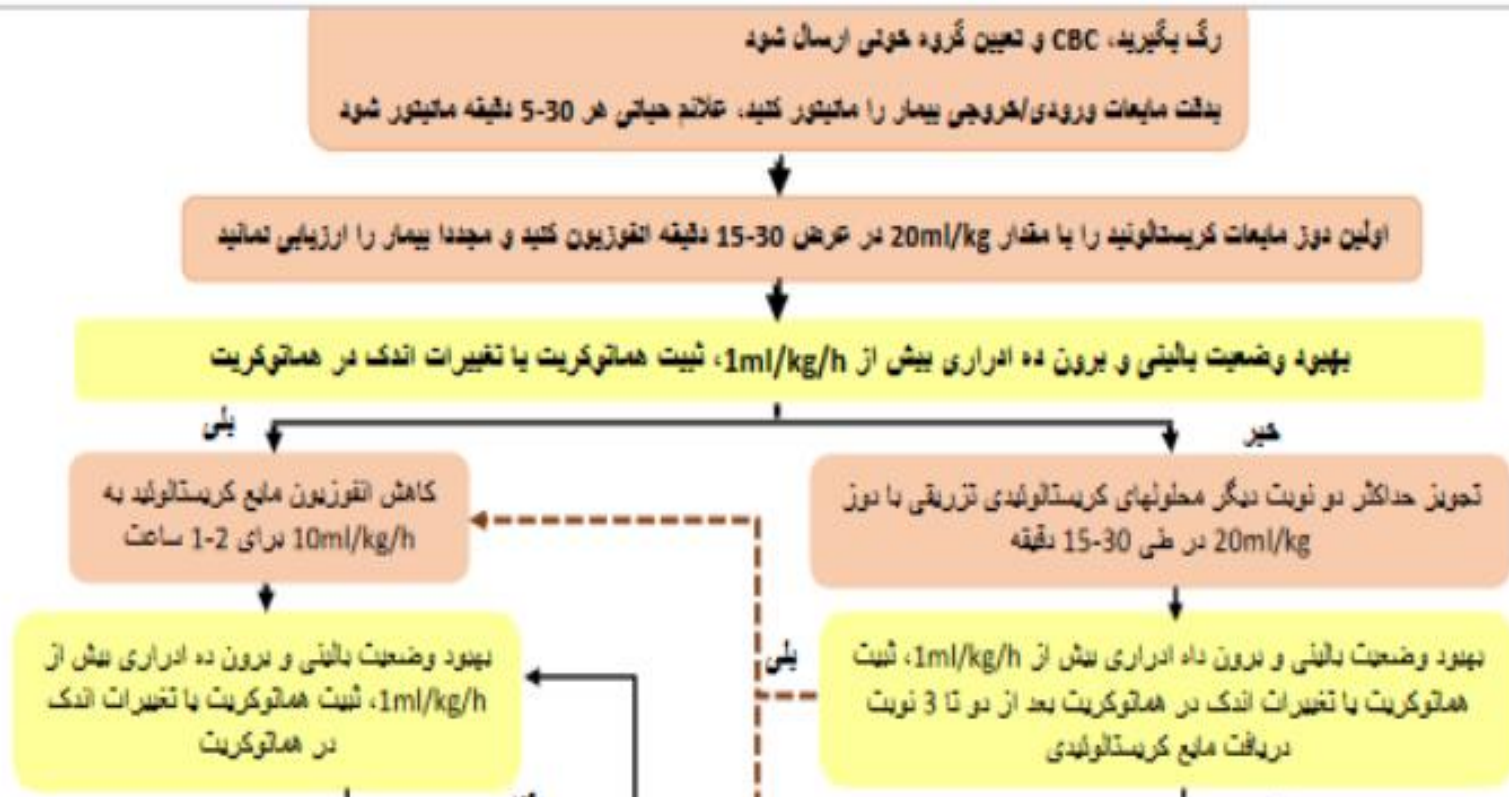


## آیا بیمار هریک از علائم هشدار را دارد؟



\* برای سنین بالای 65 سال و بارداری امکان است مقدار مایع کمتری محاسبه و تجویز شود.  
هفاکتوریت را قبل و پس از افزودن مایعات، چک کنید و در ادامه هر 24-12 ساعت چک شود

# درمان موارد شدید با هیپوتانسیون







شکل ۱۰: درمان موارد بستری با شوک جبران شده یا هیپوتانسیو

## اصول مایع درمانی در DHF

▶ مملول های کریستالوئیدی ایزوتونیک

▶ نرمال سالین ( ۰.۹ %) و رینگر لاکتات کریستالوئیدهای انتخابی در مایع درمانی دنگی می باشند.

Note	Children rate (ml/kg/hour)	Adult rate (ml/hour)
Half the maintenance M/2	1.5	40–50
Maintenance (M)	3	80–100
M + 5% deficit	5	100–120
M + 7% deficit	7	120–150
M + 10% deficit	10	300–500

## وضعیت متغیرهای همودینامیک بیمار در ابتدا و در طول درمان

پارامترهای همودینامیک	وضعیت تثبیت شده	شوک جبران شده	شوک هیپوولمیک
وضعیت هشیاری	کاملاً هشیار	هشیار	بیقرار
پرشدن مویرگی	سریع (در کمتر/مساوی ۲ ثانیه)	طولانی شده (بیش از ۲ ثانیه)	بسیار طولانی و پوست حالت Mottled دارد
اندام ها	گرم و رنگ نرمال	سردی محیطی	سرد و مرطوب
قدرت نبض محیطی	حجم/قدرت خوب	ضعیف و نخی	بسیار ضعیف یا نبود
ضربان قلب	نرمال	تاکیکارد	تاکیکاردی بسیار شدید یا برادی کاردی در مراحل انتهایی شوک
فشار خون	<ul style="list-style-type: none"> <li>نرمال</li> <li>فشار نبض نرمال</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>فشار سیستولیک نرمال اما دیاستولیک افزایش یافته</li> <li>فشار نبض به سمت Narrow شدن است</li> <li>هیپو تانسیون وضعیتی</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>فشار نبض Narrow (کمتر/مساوی 20mmHg)</li> <li>افت فشار خون</li> <li>فشار خون غیر قابل اندازه گیری</li> </ul>
تعداد تنفس	نرمال	تاکی پنه	هیپرپنه یا تنفس Kussmaul's (اسیدوز متابولیک)
پرون ده ادراری	نرمال	روند کاهشی	الگوری یا آنوری

**Thank You**

**Any questions?**