

Deteksi *Toxoplasma gondii* dari Sampel Urin dengan *Realtime Polymerase Chain Reaction*

Fitriana^{1*}

¹Puslitbang Sumber Daya dan Pelayanan Kesehatan, Balitbangkes, Kemenkes

* Correspondence author: fitri.litbang@gmail.com ; Tel.: 081574597570

Received: 9 Februari 2021; Accepted: 8 Maret 2021; Published: 10 Maret 2021

Abstrak

Toxoplasma gondii dapat menyebabkan penyakit toksoplasmosis pada manusia. Seropositif yang tidak diobati dapat berkembang menjadi *Toksoplasma ensefalitis* (sekitar 25%), kerusakan permanen dan kematian. Pengambilan spesimen secara invasif sebagai salah satu kegagalan pengobatan. Hasil uji serologi tidak mudah diinterpretasikan pada pasien imunodefisiensi, janin dan bayi. *Realtime PCR* sebagai metode pilihan untuk menegakkan diagnosis secara tepat dan cepat. Penelitian ini bertujuan mendeteksi *T. gondii* dengan metode *Realtime Polymerase Chain Reaction (Realtime PCR)* dari sampel urin. Desain penelitian adalah potong lintang, menggunakan 30 sampel urin penderita HIV/AIDS. DNA di ekstraksi dengan *QIAamp DNA mini Kit*. *Realtime PCR* Toksoplasma menggunakan enzim RT-PCR *Taqman Kit* (Bio-Rad). Hasil penelitian PCR dari sampel urin didapatkan 7 sampel (23,3%) terdeteksi *T.gondii*. Kesimpulannya bahwa metode PCR dapat digunakan untuk mendeteksi *T.gondii* dari sampel urin pada pasien HIV/ AIDS.

Kata kunci: HIV/AIDS, *Realtime PCR*, Toksoplasma, *Toxoplasma gondii*, Urin

1. Pendahuluan

Toksoplasmosis adalah suatu penyakit pada manusia yang disebabkan oleh parasit *Toxoplasma gondii* yang dapat bersifat akut, kronik dan laten (1,2). Parasit ini merupakan penyebab tersering infeksi oportunistik toksoplasma ensefalitis pada pasien *Human Immunodeficiency Virus/ Acquired Immunodeficiency Syndrome (HIV/ AIDS)* bila dibandingkan infeksi lain (3-7). Individu dengan HIV-seropositif *T. gondii* yang tidak terobati mempunyai resiko untuk berkembang menjadi toksoplasma ensefalitis sekitar 25% (8).

Beberapa faktor yang berperan dalam pengendalian infeksi adalah virulensi mikroorganisme, tropisme jaringan dan respon imun inang, meliputi respon imun seluler dan humoral. Fase

takizoit dari parasit ini dapat menyebabkan makrofag menghasilkan *Interleukin* (IL-12), yang kemudian akan terjadi pengaktifan sel *Natural Killer* (NK) dan sel T (CD8⁺ dan CD4⁺), menghasilkan *Interferon-g* (IFN-g). Selanjutnya IFN-g dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF) akan bersinergis sebagai mediasi terhadap pembunuhan takizoit (3).

Penderita HIV/ AIDS, penerima transplantasi organ, dan pasien kanker, mempunyai tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi (2). Kegagalan pengobatan umumnya terjadi karena salah diagnosis baik dari gambaran klinis maupun pemeriksaan laboratorium (9), hal ini perlu menjadi perhatian dalam mencari metode pemeriksaan laboratorium yang bersifat sensitif dan dapat diandalkan. Masalah jenis sampel yang digunakan juga dapat menjadi kendala pada pasien toksoplasma ensefalitis AIDS, karena umumnya jenis sampel yang digunakan adalah biopsi otak dan *liquid cerebrospinal* (LCS) (2).

Dalam menengakkan diagnosis definitif harus ditemukan adanya parasit, sedangkan untuk diagnosis presuntif umumnya menggunakan uji antibodi positif untuk anti-*T.gondii* (8-10). Metode serologi biasa digunakan untuk menengakkan diagnosis, tapi pemeriksaan ini mempunyai beberapa kelemahan yaitu salah satunya pada interpretasi hasil pada penderita dengan imunokompromais, janin atau bayi (2). Hal tersebut dapat disebabkan karena pada penderita tersebut sering tidak dapat menunjukkan adanya pembentukan antibodi yang cukup dalam serum sehingga dapat menimbulkan hasil sebagai negatif palsu (1).

Metode pemeriksaan lain yang dapat dilakukan adalah dengan *indirect fluorescent-antibody test* (IFAT), *enzim-linked immunosorbent assay* (ELISA), kultur jaringan, dan *polymerase chain resction* (PCR) (2). *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan pemeriksaan molekuler yang dapat mendeteksi *T.gondii* pada jaringan otak, cairan serebrospinal (CSS), vitreous dan cairan aqueous mata, cairan bilasan bronkoaveolar, cairan amnion dan darah pada pasien AIDS (11).

Pemeriksaan PCR dengan menggunakan cairan serebrospinal dari beberapa penelitian didapatkan hasil bahwa PCR dapat menggantikan diagnosis definitif dari biopsi otak, dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang lebih baik (12-14). Keunggulan lain dari pemeriksaan ini adalah tidak dipengaruhi oleh respon imun, sehingga deteksi dapat dilakukan pada sampel dari pasien imunokompromais dan berbagai fase dari penyakit (15). Beberapa publikasi menjelaskan kelebihan PCR dalam memdiagnosis toksoplasmosis kongenital prenatal atau toksoplasmosis ensefalitis pasien AIDS dengan menggunakan gen P30 atau BI atau segmen ribosomal 18S DNA sebagai target (16). *Realtime PCR* merupakan metode pilihan yang dapat membantu dalam penegakkan diagnosis secara tepat dan cepat (17-19).

Melihat masalah yang ada pada jenis sampel yang digunakan dengan pengambilan yang memerlukan tindakan invasif serta metode pemeriksaan yang mempunyai beberapa kelemahan maka dikembangkan suatu metode *realtime* PCR untuk membantu penengakkan diagnosis toksoplasma dengan menggunakan sampel urin yang relatif mudah untuk didapatkan. Penelitian ini bertujuan untuk melihat hasil pemeriksaan dari *realtime* PCR dalam mendeteksi *T. gondii* dari sampel urin pada pasien HIV/ AIDS.

2. Metode

Desain penelitian adalah dengan potong lintang, jumlah sampel yang digunakan sebanyak 30 orang yang telah terdiagnosis HIV/ AIDS dan di rawat di rumah sakit (RS) Pengayoman Cipinang Jakarta. Pemeriksaan sampel dilakukan pada Laboratorium Mikrobiologi Klinik (LMK) Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI), yang berada pada periode bulan Maret sampai Oktober 2016 (20).

Sampel urin yang diambil adalah urin pancar tengah yang diambil pada pagi hari dengan menggunakan pot urin steril. Urin yang sudah diambil dikumpulkan pada suhu -4°C untuk kemudian di bawa ke LMK FKUI dengan menggunakan *coolbox* yang telah diisi dengan 6 buah *dry ice* (20). Di laboratorium tujuan, sampel urin akan dilakukan aliquat, kemudian disimpan pada suhu -80°C sampai seluruh sampel terkumpul, untuk kemudian dilakukan pemeriksaan *realtime* PCR.

Prosedur realtime PCR

Ekatraksi DNA Toksoplasma gondii

DNA diekstraksi menggunakan *QIAamp DNA minikit* (Qiagen), sesuai dengan instruksi manufaktur (21). Volume elusi DNA akhir sebanyak $40\mu\text{l}$. Volume sampel yang akan diekstraksi sebanyak 1 ml. Prosedur ekstraksi DNA adalah sebagai berikut yaitu sentrifus 1 ml sampel pada 12000 rpm selama 2 menit, kemudian buang supernatant tanpa mengganggu pellet, lalu tambahkan $20\mu\text{l}$ *Qiagen protease* (proteinase K) dan tambahkan $180\mu\text{l}$ *Buffer ATL*, campur menggunakan *pulse-vortex* selama 15 detik, dan lisiskan sel dengan di inkubasi pada suhu 56°C selama 3 jam. Sentrifus tabung selama 15 detik, lalu tambahkan $200\mu\text{l}$ *Buffer AL*, dan campur rata dengan menggunakan *pulse-vortex* selama 5 detik.

Inkubasi tabung pada suhu 70°C selama 10 menit, kemudian sentrifus tabung selama 15 detik, dan tambahkan $200\mu\text{l}$ ethanol (96-100%), lalu campurkan kembali dengan menggunakan *pulse-vortex* selama 15 detik, setelah itu sentrifus tabung selama 15 detik.

Tambahkan 600µl larutan ke dalam *QIAamp mini* buang kolom, sentrifus kolom pada 12000 rpm selama 1 menit, lalu buang tabung yang mengandung filtrate, dan tempatkan *QIAamp DNA* kolom ke dalam 2 ml tabung, kemudian buang yang berisi filtrate dan tambahkan 500µl Buffer AW1. Sentrifus kolom pada 12000 rpm selama 1 menit dan buang tabung yang mengandung filtrate.

Tempatkan *QIAamp DNA* mini putar kolom ke dalam 2 ml tabung dan tambahkan 500µl Buffer AW2. Sentrifus kolom pada 12000 rpm selama 1 menit, dengan pipet filtrate dan tempatkan kembali *QIAamp DNA* mini putar kolom pada tabung yang sama. Sentrifus tabung kosong pada 12000 rpm selama 2 menit dan tempatkan *QIAamp DNA* mini putar kolom pada tabung mikrosentrifus 1,5 ml, kemudian tambahkan 40 µl Buffer AE, dan inkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit. Sentrifus kolom pada 12000 rpm selama 2 menit, dan terakhir simpan DNA tidak lebih dari 1 minggu sampai nanti akan digunakan pada suhu -20°C.

Real time PCR

Real time PCR T. gondii menggunakan enzim *RT-PCR Taqman Kit* (Bio-Rad). Dengan sekuens primer dan probe seperti yang pernah dilaporkan oleh Kompalic tahun 2007.²² Untuk primer *Forward* dengan GENE_B1_TG-TX2F dan sekuens oligonukleotida 5'CTAGTATCGTGCGGCAATGTG3' dan bp 20; primer *Reverse* GENE_B1_TG-TX2R dan sekuens oligonukleotida adalah 5'GGCAGCGTCTCTTCCTCTTTT3' serta bp 21; Probe dengan GENE_B1_TG-TX2MI dan sekuens oligonukleotida 5'(6-FAM)-CCACCTCGCCTCTTGG-(NFQ-MGB)3' dan bp 15.²²

Campuran reaksi pertama kali diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 menit, kemudian diikuti tahapan 8 menit pada 95°C amplifikasi yang dilakukan dalam 40 siklus denaturasi (95°C selama 15 menit; laju lereng, 20°C/detik), annealing (60°C selama 1 menit dengan laju lereng, 20°C/detik), dan ekstensi (72°C selama 50 detik, dengan laju lereng 20°C/detik).

Hasil dianggap positif bila terdapat sinyal fluoresen yang signifikan diatas baseline yang telah terdeteksi, seperti ditentukan dengan metode algoritma derivatif kedua, dan dinyatakan sebagai nilai siklus kuantifikasi (Cq). Setiap akan dijalankan, terdapat DNA *T.gondii* sebagai kontrol positif dan penggunaan buffer elusi untuk ekstraksi DNA sebagai kontrol negatif.

3. Hasil penelitian

Dari 30 responden didapatkan sebanyak 7 responden (23,3%) mempunyai hasil positif *Toxoplasma gondii* dari penggunaan sampel urin.²⁰

Tabel 1. Hasil realtime PCR *Toxoplasma gondii*²⁰

PCR	Frekuensi (n)	Persentase (%)
Positif	7	23,3
Negatif	23	76,7
Total	30	100

4. Pembahasan

Metode *realtime* PCR ini menggunakan suhu annealing pada 60°C yang sesuai dengan suhu yang dilakukan oleh Kompalic pada tahun 2007 (22). Penggunaan gen B1 dan gen RE sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Mesquita dkk yang membandingkan *realtime* PCR dengan *Taqman*, dan didapatkan hasil sensitivitas dengan nilai gen B1 sebesar 86%, dan gen RE dengan nilai sensitivitas sebesar 98%, sedangkan untuk nilai spesifisitas gen B1 adalah 97% dan gen RE sebesar 88,8% (23).

Dari penelitian tersebut, Mesquita dkk mendapatkan hasil *realtime* PCR dari sampel darah dan cairan serebrospinal pasien HIV yang diduga toksoplasma ensefalitis, dengan gen B1 sebagai gen target, maka didapatkan hasil positif *T.gondii* dari sampel darah sebesar 34%, sedangkan dari cairan serebrospinal sebesar 23,91% (23).

Pada penelitian ini, dengan menggunakan metode *realtime* PCR dan sampel dari urin, didapatkan hasil sebesar 23,3% terdeteksi *T.gondii*, 7 pasien dari 30 pasien yang menjadi sampel, hasil pemeriksaan ini mendekati hasil positif pada cairan serebrospinal yang dilakukan oleh Mesquita dkk. Modifikasi yang dilakukan pada metode *realtime* PCR berada pada suhu annealing 60°C dan penggunaan gen B1 dan gen RE.

Selama ini PCR sudah dapat digunakan untuk membantu diagnosis toksoplasma terutama pada pasien imunokompromais, dengan jenis sampel yang diambil dari berbagai cairan tubuh termasuk salah satunya dari urin. *Realtime* PCR sendiri saat ini juga sudah mulai digunakan untuk membantu diagnosis, dengan memasukan fluoresens sebagai label pada probe oligonukleotida, selain itu juga dapat mengurangi resiko terjadinya kontaminasi pada DNA (24,25).

5. Kesimpulan

Realtime PCR yang telah dimodifikasi pada suhu annealing, serta penggunaan gen B1 dan gen RE dapat digunakan untuk mendeteksi *Toxoplasma gondii* dari sampel urin pasien dengan imunokompromais (HIV/ AIDS).

Daftar Pustaka

1. Chahaya,I. Epidemiologi *Toxoplasma gondii*. Kesehatan Lingkungan Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Sumatera Utara. 2003.
2. Xin Hu, Chang-Wang Pan, Ya-Fei Li, et.al. Urine Sample Used For Detection Of *Toxoplasma Gondii* Infection By Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Folia Parasitologica* 59 (1):21-26. 2012.
3. G.M. Bhopale. Patogenesis of Toxoplasmosis. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 26. 2003.213-222
4. Wijaya KMI, Infeksi HIV pada penderita tuberculosis, Seminar nasional FMIPA UNDIKSHA III 2013:295-303.
5. Zulkifli Amin et.al. Profil Pasien TB-HIV dan Non TB-HIV di RSCM. *Buletin Penelitian Kesehatan*, Vol.41, No.4, 2013: 195-199.
6. Lubis AD. Infeksi oportunistik paru pada penderita HIV.Div Peny Inf Tropik. *FK USU*:1-16.
7. The International congress on Toxoplasmosis. *International journal for parasitology* 34. 2004. 249-252.
8. Nelson M, Manji H, Wilkins E. Central Nervous System Opportunistic Infections. *HIV medicine*, 12 (Suppl.2). 2011.
9. Cardona N, Basto N, Parra B, et.al. Detection of *Toxoplasma* DNA in the Peripheral Blood of HIV-Positive Patients with Neuro-opportunistic Infections by a Real-Time PCR Assay. *Journal of Neuroparasitology*. Vol. 2. 2011.
10. Vidal JE, Colombo FA, et.al. PCR assay Using Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *Journal Clinical Microbiology*. P.4765-4768. Vol 42. No 10. 2004.
11. Montoya JG. 2002. Laboratory diagnosis of *toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *California: The Journal of Infectious Diseases*; Vol 185 Suppl 1: 73

12. Ammassari A, Cingolani A, Pezzotti P, De Luca A, Murri R, Giancola ML, et al. 2000. Italy: AIDS-related focal brain lesions in the era of Highly Active Antiretroviral Therapy. *Neurology*. 55:1194–1200
13. Kompalic A, Cristo, Frotta C, Mutis MS, Fernandes O, Britto C. 2007. Evaluation of a real time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol Res* 101:619-625
14. Nogui NLF, Mattas S, Júnior TG, Lewi SD. 2009. Neurotoxoplasmosis Diagnosis for HIV-1 Patients by Real-Time PCR of Cerebrospinal Fluid. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2009;13(1):18-23
15. Maritza PJ, M. Jaime, CE, Maria T, Chang C, Robert . Gilman VH, Martín C, Lopez J, Evans CA. 2002. Optimization and Evaluation of a PCR Assay for Detecting Toxoplasmic Encephalitis in Patients with AIDS. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 40, No. 12: 4499–4503
16. Nguyen T.D, Kesel M.D, Bigaignon G, et.al. Detection of *Toxoplasmosis gondii* Tachyzoites and Bradyzoites in Blood, Urine, and Brains of Infected Mice. *Clinical and diagnostic Laboratory Society for Microbiology*. P.635-639. Vol 3. No 6. 1996.
17. Ivovic V, Vujanic M, Živkovic T, Klun I, Djakovic DO. 2012. Molecular Detection and Genotyping of *Toxoplasma gondii* from Clinical Samples, *intech*:103-120
18. Vidal JE, Colombo FA, de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL 2004. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J Clin Microbiol* 42. 10: 4765-4768
19. Vujanic M . 2012. Molecular detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated in Serbia. PhD thesis. University of Belgrade, Serbia
20. Fitriana, Pracoyoo NE. Deteksi *Toxoplasma gondii* dari Spesimen Urin Penderita HIV/AIDS. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. 2017 vol 27, no 2:105-110
21. Rahmawati E, Imran D, Ibrahim F, Sudarmono P. Deteksi *Toxoplasma gondii* dan Epstein Barr Virus pada Pasien HIV dengan Infeksi Otak dari Cairan Serebrospinal Dibandingkan dengan Darah Menggunakan Dupleks Real-time PCR. Departemen Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2016 (Tesis)
22. Kompalic A, Cristo, Frotta C, et.al. Evaluation of a real time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol Res*. 2007; 101:619-625

23. Mesquita RT, Ziegle AP, Hiramoto RM, Vidal JE, Chioccola V. Real time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. *Journal of Medical Microbiology*. 2010; 59:641-647
24. Alfonso Y, Fraga J, Fonseca C, Jiménez N, Pinillos T, Contreras JD, et al. Molecular diagnosis of toxoplasma gondii infection in cerebrospinal fluid from AIDS patients. *Cerebrospinal Fluid Research*; 2009: p 1-6
25. Achappa B, Mahalingam S, Shamir AR, Krishnan BU, Ramapuram JT, Rao S, et al. Clinical spectrum and outcomes for toxoplasma encephalitis among AIDS patients before and during the era of anti-retroviral therapy in Mangalore. India: *Journal of Clinical and Diagnostic Research*; November 2011; Vol 5 Suppl 2: p 1397-1401.