

Optimasi uji real-time PCR untuk deteksi *Leptospira* spp patogen pada spesimen urin dan darah manusia = Optimization of real-time PCR method for the detection of pathogenic *Leptospira* spp. in human urine and blood specimens

Ika Ningsih, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20340539&lokasi=lokal>

Abstrak

Leptospirosis adalah penyakit infeksi akut yang dapat menyerang manusia maupun hewan yang disebabkan bakteri *Leptospira* spp dan digolongkan sebagai zoonosis. Gejala klinis leptospirosis yang tidak spesifik dan sulitnya uji laboratorium untuk konfirmasi diagnosis mengakibatkan penyakit ini seringkali tidak terdiagnosis. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan optimasi uji diagnostik molekuler menggunakan real-time PCR sebagai deteksi cepat, sensitif dan spesifik untuk *Leptospira* patogen pada manusia DNA bakteri di dalam spesimen darah diekstraksi menggunakan QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen dan spesimen urin diekstraksi menggunakan QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen dengan prosedur sesuai dengan petunjuk manualnya. Primer dan probe yang digunakan berdasarkan publikasi penelitian oleh Smythe dkk, 2002. Dari hasil uji optimasi kondisi optimal real-time PCR didapat suhu annealing 60°C, konsentrasi primer 0,9 µM dan konsentrasi probe 0,2 µM. Spesifisitas primer diuji menggunakan DNA bakteri patogen lain Hasil uji sensitivitas real-time PCR untuk mendeteksi konsentrasi DNA terendah bakteri *Leptospira* spp adalah 0,75 fypL, hasil uji spesifisitas real-time PCR menunjukkan bahwa primer yang digunakan untuk deteksi bakteri *Leptospira* spp tidak beraksi silang dengan genom bakteri-bakteri uji, konsentrasi minimal DNA bakteri yang masih terdeteksi dalam darah mencapai 150 fg/pl, sedangkan dalam urin mencapai 1470 fg/pl yang masih dapat dideteksi dengan pemeriksaan real-time PCR. Metode real-time PCR ini dapat digunakan sebagai alternatif pemeriksaan mikrobiologi yang cepat dan tepat untuk mendiagnosis leptospirosis.

.....Leptospirosis is an emerging infectious disease in human and animals caused by *Leptospira* spp. and considered endemic in Indonesia due to its tropical climate. The International Leptospirosis Society (2001) declared Indonesia has high incidence of leptospirosis and ranked the third in the world for mortality (16.7%) The clinical features are not specific and may result in a missed or delayed diagnosis. The microbiology diagnostic method e.g. culture and microscopic agglutination test (MAT) are sensitive and specific but time-consuming and high cost. The other method to detect the antibody result false positive reactions and need confirmation by the MAT. Therefore in this study we optimized the real-time PCR assay, which has been used to detect a large number of microbes. It has high sensitivity and specificity, thus making it ideal as a rapid and accurate method to detect pathogen *Leptospira* spp. in human specimens. The amplification of the DNA control was performed optimally with the following conditions: annealing temperature is 60°C, primer volume is 0.5 µl (final concentration: 0.9 µM); probe volume is 0.2 µl (final concentration 0.2 µM). This method may detect the DNA in the Mastermix Mix with the concentration of 0.75 fg/ul, however in blood specimen the limit of detection of the DNA 150 fg/pl and in urine is 1470 fg/pl. The primer used in this assay is not complementary with the DNA of other pathogenic *Leptospira* spp. The real-time PCR assay is a rapid and accurate method to detect pathogenic *Leptospira* in human specimens. Further studies are needed to know the sensitivity and specificity of the real-time PCR assay compared to

other diagnostic methods in clinical settings.