

Pengembangan Tes Diagnostik Toxoplasma Gondii dengan ELISA dan Immunobloting

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=77082&lokasi=lokal>

Abstrak

Toxoplasma gondii menyebabkan toksoplasmosis pada manusia. Parasit ini merupakan patogen penting selama masa hamil dan pada periode perinatal [1]. Pada wanita hamil yang mendapat infeksi primer dapat terjadi abortus, kelahiran mati atau bayi dilahirkan dengan toksoplasmosis kongenital, yaitu lahir cacat seperti hidrosefalus, retardasi mental dan motorik, kebutaan serta ketulian. Akhir-akhir ini parasit tersebut ditemukan sebagai salah satu penyebab utama penyakit susunan saraf pusat pada penderita AIDS. Prevalensi zat anti T. gondii di Indonesia berkisar antara 2-63% [3]. Kelainan kongenital karena T. gondii telah dilaporkan sejak tahun 1976 di Indonesia [3,4,5,6,7]. Dan dari 99 bayi dengan kelainan kongenital ternyata 18,2% menderita toksoplasmosis kongenital. Laporan tentang toksoplasmosis kongenital ini menunjukkan pentingnya infeksi ini [8].

Karena toksoplasmosis pada orang dewasa pada umumnya tanpa gejala klinis, sedangkan pada bayi gejala klinisnya beraneka ragam, maka untuk diagnosis toksoplasmosis perlu pemeriksaan laboratorium. Deteksi antibodi secara serologi dapat menentukan adanya infeksi akut atau kronis. Deteksi titer zat anti IgG dan IgM yang positif atau meningkat pada wanita hamil kurang dari 2 bulan menunjukkan adanya infeksi primer dan ada risiko janinnya terinfeksi sehingga pengobatan profilaktis dapat segera dimulai. Bila ditemukan IgM pada neonatus, diagnosis toksoplasmosis kongenital sudah pasti dan pengobatan dapat segera dimulai. Dengan analisis immunoblotting diharapkan suatu tes diagnostik yang lebih spesifik dan akurat.

Di Laboratorium Parasitologi diagnosis toksoplasmosis dilakukan dengan mendeteksi IgM dan IgG spesifik dengan teskit ELISA yang diimpor. Karena tingginya harga teskit tersebut dan karena ketergantungan pada pihak luar negeri, maka ingin dilakukan uji ELISA dapat dengan antigen buatan sendiri. Dengan demikian diharapkan biaya uji ELISA dapat lebih murah, sehingga lebih banyak kasus toksoplasmosis kongenital dan kasus wanita hamil yang mungkin terinfeksi dapat dibuat diagnosisnya dan dapat dipertimbangkan pengobatannya.

Walaupun hasil tes diagnostik yang dikembangkan mungkin tidak sama sensitivitasnya dengan teskit buatan luar negeri yang dianggap sebagai standard, namun diharapkan akan diperoleh sensitivitas sekitar 85-90%.

Pada tahun pertama dari penelitian selama 3 tahun ini dikembangkan uji ELISA dengan antigen buatan sendiri untuk mendeteksi zat anti IgG.

Antigen T. gondii dibuat di Bagian Parasitologi FKUI dengan membiak T. gondii strain RH pada mencit albino, mengumpulkan takizoit T. gondii, memecahkan takizoit T. gondii dengan ultrasonifikasi, memisahkan serpihan sel dengan sentrifuse dan menentukan kadar protein supernatan.

Konsentrasi antigen, serum dan konjugat yang akan dipakai ditentukan dulu dengan "checkerboard titration".

Batas OD positif ditentukan dengan memeriksa sejumlah serum dengan titer IgG negatif terhadap Toxoplasma pada uji ELISA Toxonostika, dengan uji ELISA dengan antigen buatan sendiri.

DD serum positif untuk serum kontrol ditentukan dengan menggunakan 10 serum dengan titer IgG terhadap Toxoplasma 1:3200 pada uji ELISA Toxonostika. OD masing-masing serum ditentukan dengan uji ELISA lokal dan digunakan untuk koreksi variasi pada setiap pemeriksaan.

Uji ELISA lokal dengan antigen buatan sendiri dilakukan dengan metoda Voller dkk. (9)

Uji ELISA Toxonostika dilakukan di Laboratorium Makmal Terpadu Imunoendokrinologi FKUI. Besar sampel dihitung dengan rumus [1]. $2p \times (100-p) \times f (-I3)$

Darah vena diambil sebanyak 5 ml dari 363 penderita yang datang ke Laboratorium Makmal untuk pemeriksaan serologi terhadap Toxoplasma.

Hasil titrasi antigen ialah perbandingan OD tertinggi (9,35) antara pool serum positif kuat dan pool serum negatif pada konsentrasi protein antigen 5 ug/ml dan pengenceran serum 1/100.

Pada titrasi konjugat didapatkan perbandingan tertinggi OD pool serum positif kuat dan negatif [8,9] pada pengenceran konjugat 1/5000. Batas OD positif uji ELISA lokal adalah 0,115.

Hasil uji statistik dengan cara Mc Nemar pada 363 serum adalah tidak ada perbedaan bermakna antara uji ELISA lokal dan uji ELISA Toxonostika. Sensitivitasnya 91,7%, spesifisitasnya 90,2%. Nilai duga positif 94,1%, nilai duga negatif 86,5%. Uji statistik korelasi dan regresi menunjukkan korelasi antara titer zat anti IgG pada uji ELISA lokal dan uji ELISA Toxonostika. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa telah dikembangkan uji ELISA dengan antigen buatan sendiri untuk deteksi IgG, yang tidak berbeda bermakna dengan teskit dari Organon. Perlu dikembangkan uji ELISA untuk deteksi IgM.

<hr>

Development of a Diagnostik Test for Toxoplasma Gondii with Elisa and Immunoblotting Toxoplasma gondii is the cause of toxoplasmosis in man. This parasite is an important patogen in pregnancy and during the perinatal period [1]. When a pregnant woman acquires T. gondii infection, she may transmit it transplacentally to her fetus, which may result in abortion, intrauterin fetal death and clinically manifest prenatal toxoplasmosis with hydrocephaly, mental and growth retardation, blindness or deafness. Recently this parasite is found as the primary cause of encephalitis in patients with AIDS. The prevalence of T. gondii antibodies in Indonesia ranges from 2--63% [3]. Congenital anomalies caused by T. gondii have been reported in Indonesia since 1976 [3,4,5,6,7]. And T. gondii is found as the cause of congenital anomalies in 18,2% of 99 babies. These reports indicate the importance of this infection [8].

Since toxoplasmosis in adults are usually asymptomatic, while there is a wide variety of nonspecific clinical manifestations in congenital toxoplasmosis, the diagnosis is made with laboratory test, finding of toxoplasma antibodies can aid diagnosis. Detection of positive or rising titers of IgG and IgM antibodies early in pregnancy indicates infection after the time of conception and the fetus is at high risk, so that the woman should be given prophylactic treatment. Detection of IgM antibodies in a newborn baby is evidence of active infection and treatment should be given immediately.

A more specific and accurate diagnostic test with immunoblotting analysis is desirable.

In the Department of Parasitology the diagnosis of toxoplasmosis is done by detection of IgM and IgG antibodies with an imported ELISA testkit. Because these testkits are very expensive and because dependence upon importing, we would like to establish an ELISA test with Toxoplasma antigen prepared in our laboratory. This would likely lower the costprice of the test, so that more cases of congenital toxoplasmosis and pregnant women with primary infection may be diagnosed and treatment may immediately be given.

Although the developed testkit may be not as sensitive as the imported testkit, which is considered as the gold standard, a sensitivity of about 85-90% would be expected.

In the first year of the 3 years study an ELISA test with prepared Toxoplasma antigen will be established for detection of IgG antibodies.

T. gondii antigen is prepared in the Department of Parasitology, Medical Faculty, University of Indonesia, by breeding the RH strain of T. gondii in albino mice, harvesting the T. gondii tachyzoites, sonification of the tachyzoites, separation of cell debris by centrifugation and estimation of the protein content of the supernatant.

The concentration of antigen, serum and conjugate to be used in the test is determined by the checkerboard titration.

The cut off titer is determined by testing a number of sera with negative IgG titer (tested with Toxonostika ELISA testkit) with the ELISA test using the prepared antigen. The number of the negative serum sample is calculated with this formula : $Z2 \times SD2$

The optical density of positive control serum is determined by testing 10 sera with an IgG titer of 1 : 3200 (tested with Toxonostika ELISA testkit) with the ELISA test using the prepared antigen. This OD is used to correct the variation of each test.

The local ELISA test with the prepared antigen is performed according to the method of Voller et al. [9].

The Toxonostika ELISA test is performed in Makmal Terpadu Imunoendokrinologi Laboratory. The sample size is calculated with this formula [10]. $2p \times (100-p) \times f(0.6) n =$ Five ml venous blood is taken from 363

patients visiting the Makmal Laboratory for serologic detection of *T. gondii* antibodies.

Antigen titration resulted in the highest OD ratio (9,35) of high positive serum samples to that of negative serum samples, when an antigen protein concentration of 5 ug/ml and a serum dilution of 1/100 is used.

The highest OD ratio (8,9) of high positive serum samples to that of negative serum samples in conjugate titration is obtained when a conjugate dilution of 1/5000 is used.

The lowest positive OD for the local ELISA test is 0,115. Statistical evaluation of 363 sera according to Mc Nemar resulted in no significant difference between the local ELISA test and the Toxonostika ELISA test. The sensitivity is 91,7%. The specificity is 90,2%. The positive predictive value is 94,1% and the negative predictive value is 86,5%.

The statistical correlation and regression test indicates a correlation between IgG antibody titers with the local ELISA test and the Toxonostika ELISA test.

It is concluded that an ELISA test is established with prepared antigen to detect IgG antibody, which is not significant different from the ELISA testkit made by ORGANON. It is necessary to develop an ELISA test for detection of IgM antibodies.