

# PEMERIKSAAN LABORATORIUM UNTUK MENDIAGNOSIS PENYAKIT LEPTOSPIROSIS

I Made Setiawan\*

## Abstrak

Penyakit leptospirosis disebabkan oleh bakteri *Leptospira* dan tersebar di seluruh dunia terutama di negara tropis dengan kelembaban yang tinggi. Penyakit ini dapat ditemukan di daerah pedesaan maupun perkotaan. Walaupun demikian, penyakit ini sangat jarang dilaporkan. Hal ini mungkin disebabkan penyakit leptospirosis sulit dideteksi, karena mempunyai gejala klinis mirip dengan penyakit lain seperti influenza, hepatitis, demam dengue, tuberkulosis, malaria, dll. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu alat diagnostik canggih yang dapat mendeteksi penyakit secara dini, sehingga penatalaksanaan penderita dapat dilakukan dengan tepat. Ada berbagai teknik laboratorium yang dapat digunakan untuk mendiagnosis penyakit leptospirosis diantaranya, (1) mendeteksi *Leptospira* secara langsung menggunakan mikroskop lapangan gelap atau mendeteksi bakteri *Leptospira* dengan membiakkan; (2) mendeteksi gen spesifik *Leptospira* menggunakan PCR; (3) mendeteksi antibodi terhadap *Leptospira* secara serologis menggunakan metode MAT, ELISA, RIA, IHA, dll. Semua metode ini mempunyai kelebihan dan kekurangan. Informasi ini dapat berguna untuk para klinisi, peneliti, dan ahli epidemiologi dalam menginterpretasi hasil pemeriksaan laboratorium.

*Kata kunci: leptospirosis, metode laboratorium, PCR, MAT, ELISA*

## Pendahuluan

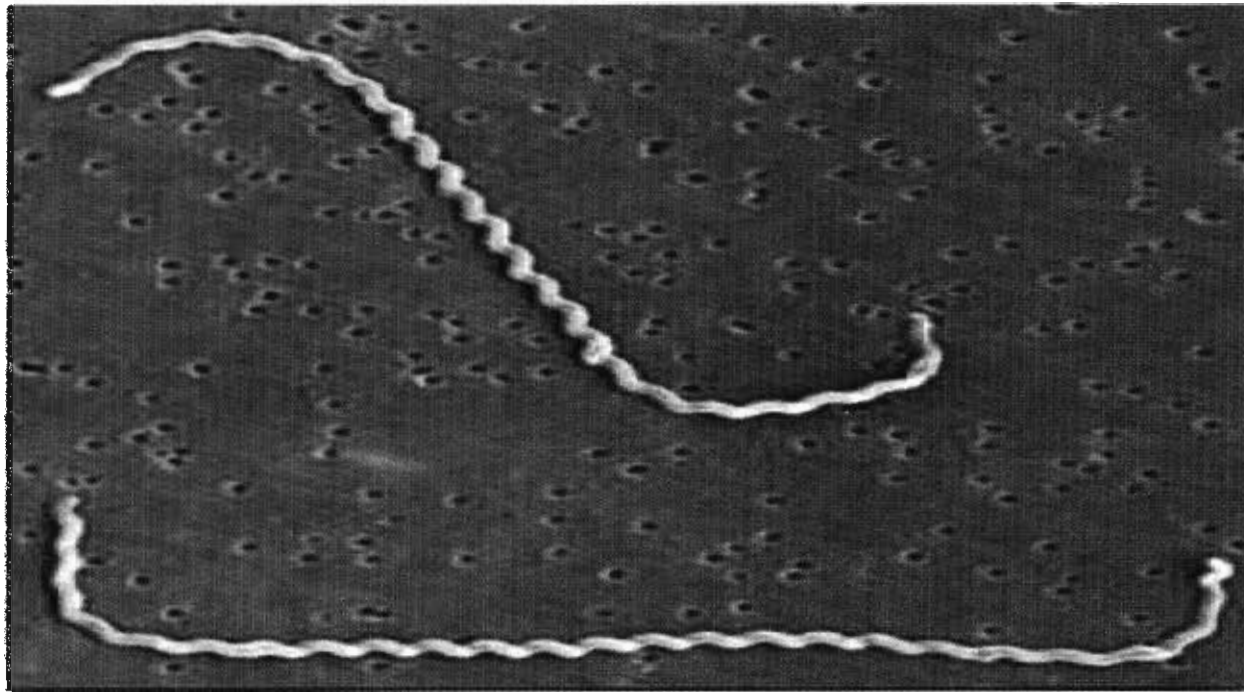
Leptospirosis adalah penyakit zoonosis yang sangat penting, dan ditemukan hampir di seluruh dunia, terutama di belahan bumi beriklim tropis dan subtropis. Penyakit ini dapat berkembang menjadi epidemi di daerah perkotaan maupun pedesaan.<sup>1,2</sup> Leptospirosis disebabkan oleh spirochaeta termasuk genus *Leptospira*, terdiri lebih dari 250 serovars.<sup>2,3</sup> Pada manusia biasanya terjadi setelah penderita kontak dengan air tergenang yang terkontaminasi dengan kencing binatang yang terinfeksi, atau mempunyai pekerjaan berhubungan dengan tanah basah yang terkontaminasi dengan leptospira.<sup>4</sup>

Epidemi penyakit leptospirosis pada manusia di daerah tropis, terutama terjadi pada musim hujan. Gejala klinis yang timbul sangat

bervariasi dari penyakit tanpa gejala sampai gejala yang sangat berat, seperti panas tinggi, nyeri otot dan sendi yang sangat hebat, kelainan pernafasan, hepar, ginjal, sampai terjadi penurunan kesadaran.<sup>1,2</sup> Gejala penyakit leptospirosis sering menyerupai gejala penyakit lain, seperti malaria, tuberkulosis, hepatitis, demam thypoid, dan infeksi parasit lainnya.<sup>5</sup> Oleh karena itu, untuk menegakkan diagnosis pasti dengan hanya berdasarkan gejala klinis adalah sangat sulit, sehingga diperlukan pemeriksaan laboratorium yang cepat, tepat, dengan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi.

Tulisan ini menguraikan metode laboratorium yang digunakan dalam menegakkan diagnosis penyakit leptospirosis sebagai masukan untuk klinisi, peneliti, dan epidemiologist.

\*Rumah Sakit Penyakit Infeksi Prof. Sulianti Saroso



**Gambar. Gambaran Elektronmikroskop Serovar *L. interrogans* Galur Icterohaemorrhagiae yang Berikatan pada Membrane Filter<sup>3</sup>**

### Struktur/Morfologi

Famili *leptospiraceae* termasuk orde *spirochaetales* sekarang dibagi menjadi 3 genera: *Leptospira*, *Leptonema* dan *Tumeria* (dulu disebut *L. parva*).<sup>6</sup> Sebelum tahun 1989 genus *Leptospira* dibagi menjadi dua spesies yaitu *L. interrogans* merupakan galur patogen, dan *L. biflexa* merupakan galur saprofit yang diisolasi dari lingkungan.<sup>3,7</sup>

*Leptospira* adalah spirochaeta yang berbentuk pegas/coil dengan ukuran garis tengah 0,1 µm dan panjang 6-20 µm. Kadang-kadang ditemukan jauh lebih panjang. Amplitudo heliks mencapai 0,1-0,15 µm dengan panjang gelombang mencapai 0,5 µm. Salah satu atau kedua ujung sel melengkung dengan sudut yang berlawanan. Mempunyai dua filamen aksial dengan insersi polar terletak dalam ruang periplasma. Struktur protein flagella sangat kompleks.<sup>3,6</sup>

### Pengambilan Sampel Spesimen

Saat pengambilan sampel sangat tergantung pada fase infeksi penyakit. *Leptospira* biasanya berada di dalam peredaran darah penderita kira-kira 10 hari setelah terjadi infeksi. *Leptospira* juga ditemukan pada cairan tubuh yang lain seperti, urine, cairan serebrospinal, beberapa hari sesudah serangan penyakit, dan pada saat bersamaan juga dia masuk ke organ dalam penderita. Titer antibodi yang dapat dideteksi kira-kira 5-10 hari sesudah serangan penyakit, kadang-kadang lebih

lama bila penderita sudah mendapat pengobatan antibiotika.<sup>8</sup>

Jenis sampel yang sering digunakan adalah:<sup>8</sup>

1. Darah yang diambil 10 hari pertama sakit yang dicampur heparin (untuk mencegah pembekuan) digunakan untuk pemeriksaan biakan. Darah untuk biakan sebaiknya diambil tidak lebih 10 hari sesudah serangan penyakit, karena *Leptospira* sudah menghilang dari peredaran darah. Sampel untuk biakan harus disimpan dan diangkut dalam suhu ambien, karena temperatur yang rendah dapat merusak *Leptospira* patogen.
2. Darah beku atau serum. Sampel ini sebaiknya diambil dua kali dengan selang waktu beberapa hari, yaitu saat serangan penyakit dan sesudah terjadinya serokonversi.
3. Urine untuk biakan. *Leptospira* umumnya cepat mati bila tercampur dengan urine. Urine yang akan digunakan untuk biakan mempunyai nilai tinggi, bila diperoleh dalam keadaan bersih. Urine diinokulasi ke dalam media biakan dalam waktu tidak lebih dari 2 jam sesudah pengambilan. Masa hidup *Leptospira* di dalam urine yang asam dapat diperpanjang dengan menetralisasi urine tersebut.
4. Sampel postmortem (sesudah meninggal). Pengambilan sampel ini adalah sangat penting dan diusahakan untuk mengambil dari berbagai organ dalam, termasuk otak, cairan sere-

brospinal, cairan mata, paru, ginjal, hati, jantung, dan darah yang berada di dalam jantung untuk pemeriksaan serologis. Sampel postmortem harus diambil secepat mungkin secara aseptik. Sampel yang sudah diambil harus segera diinokulasi ke dalam medium biakan, dan harus disimpan dan diangkut pada suhu +4°C. Terjadinya autolisis sel pada suhu +4°C dan penurunan pH harus dicegah, dan jangan ditaruh pada suhu yang rendah.

5. Sampel cairan serebrospinal dan dialisat digunakan untuk biakan.

### Pemeriksaan Laboratorium

Pemeriksaan laboratorium sangat perlu untuk menegakkan diagnosis penyakit leptospirosis secara dini dengan cepat dan tepat. Manfaat pemeriksaan laboratorium adalah:<sup>8</sup>

1. Memastikan diagnosis leptospirosis, karena penyakit ini secara klinis sangat sulit dibedakan dengan penyakit lain.
2. Menentukan jenis serovar-serogrup penyebab infeksi, yang dapat digunakan untuk mengetahui sumber penularan.

Pemeriksaan laboratorium yang dilakukan pada penderita leptospirosis dapat dibagi menjadi pemeriksaan laboratorium yang bersifat umum dan pemeriksaan laboratorium spesifik.

#### 1. Pemeriksaan Laboratorium Klinik Umum

Pemeriksaan laboratorium klinik umum memberikan hasil berbeda antara leptospirosis yang ringan dan berat. Hasil pemeriksaan laboratorium penderita dengan gejala leptospirosis berat memperlihatkan kelainan hasil laboratorium yang sangat jelas.

##### 1.a. Hasil Pemeriksaan Laboratorium Pada Kasus yang Ringan

Hasil pemeriksaan darah tepi penderita leptospirosis ringan, ditemukan laju endap darah meningkat, jumlah leukosit tidak jelas, kadang-kadang di bawah nilai normal, normal, atau sedikit meningkat. Hasil tes fungsi hati ditemukan sedikit peningkatan aminotransferase, bilirubin, dan alkaliphosphatase, sedangkan secara klinis ikterus tidak tampak dengan jelas.<sup>10</sup> Hasil

pemeriksaan urine ditemukan proteinuria, pyuria, dan sering ditemukan hamaturia mikroskopik. Juga ditemukan adanya hialin dan *granular cast* pada minggu pertama sakit.<sup>3</sup>

##### 1.b. Hasil Pemeriksaan Laboratorium pada Kasus yang Sangat Berat

Pemeriksaan darah tepi tampak leukositosis dengan pergeseran ke arah kiri, dan trombositopeni berat. Dari tes fungsi ginjal ditemukan gangguan fungsi ginjal ditandai dengan peningkatan kadar kreatinin plasma. Tingkat azotemia terjadi bervariasi tergantung beratnya penyakit.<sup>9,10</sup> Tes fungsi hati pada leptospirosis berat umumnya memperlihatkan peningkatan kadar bilirubin darah cukup bermakna dengan sedikit peningkatan kadar alkaliphosphatase. Peningkatan bilirubin umumnya tidak sesuai dengan nilai tes fungsi hati yang lain.<sup>11</sup> Hasil pemeriksaan pungsi lumbal terutama ditemukan sel limfosit, kadar protein normal atau sedikit meningkat, sementara kadar glukose normal. Pada penderita dengan ikterus berat, cairan serebrospinal tampak xantochrom. Kelainan cairan serebrospinal tampak jelas pada minggu ke-2 sakit, dan pleositosis pada cairan serebrospinal dapat terjadi sampai berminggu-minggu.<sup>3</sup>

Perubahan alami yang tidak spesifik ini hanya dapat dipakai untuk menduga adanya infeksi leptospirosis. Untuk memastikan diagnosis, perlu dilakukan pemeriksaan mikrobiologi spesifik.

#### 2. Pemeriksaan laboratorium spesifik

##### 2.a. Pemeriksaan Bakteri

###### 2.a.1. Pemeriksaan bakteri secara langsung dengan mikroskop

Hasil pemeriksaan ini dapat digunakan menegakkan diagnosis leptospirosis secara pasti. *Leptospira* dari spesimen klinik dilihat secara langsung menggunakan mikroskop lapangan gelap atau menggunakan mikroskop cahaya setelah preparat dicat dengan pewarnaan yang sesuai. Agar bakteri tampak pada mikroskop lapangan gelap diperlukan  $10^4$  *Leptospira*/ml, dengan harapan setiap lapangan pandang tampak satu sel.<sup>3</sup>

Agar pemeriksaan mikroskopis berhasil, sampel darah diambil dalam 6 hari sesudah timbul gejala, jika lebih *Leptospira* sulit ditemukan. Juga

sangat sulit menemukan *Leptospira* pada cairan serebrospinal, karena jumlah bakteri sangat sedikit. Pemeriksaan ini sering memberikan hasil yang keliru, karena adanya fibrin atau protein yang kelihatan bergerak dan berwarna coklat (*Brownian motion*), sehingga spesifisitasnya rendah.<sup>3,12</sup> *Leptospira* tampak sebagai organisme bergerak cepat, berbentuk spiral pegas yang kurus, umumnya ditemukan dalam biakan, darah, dan urine.<sup>8</sup>

Dari hasil penelitian, sensitifitas pemeriksaan mikroskop lapangan gelap 40,2% dan spesifisitas 61,5%, dengan nilai ramal positif 55,2% dan nilai ramal negatif 46,6%. Nilai rata-rata positif pada penderita dengan pemeriksaan biakan positif cukup rendah yaitu 40%.<sup>12</sup> Walaupun pemeriksaan ini merupakan tes yang cepat, tetapi tidak disarankan digunakan sebagai prosedur tes tunggal untuk mendiagnosis leptospirosis.<sup>8</sup>

Keuntungan pemeriksaan ini:<sup>8</sup> dapat digunakan untuk mengamati *Leptospira* dalam biakan, terutama bila bakteri dalam jumlah banyak, dan untuk mengamati aglutinasi pada pemeriksaan MAT. Kelemahannya, memerlukan tenaga ahli berpengalaman. Bila jumlah bakteri sedikit, *Leptospira* sulit ditemukan.<sup>8</sup>

Sensitifitas pemeriksaan ini dapat ditingkatkan dengan memberikan pewarnaan. Metode pewarnaan yang sering dipakai *immunofluorescence*. Teknik ini dapat dilakukan untuk pemeriksaan urine, darah, dan tanah. Di samping itu, *Leptospira* dapat juga diwarnai dengan *immunoperoxidase*, sering digunakan untuk pemeriksaan sampel darah dan urine. Pewarnaan histologis yang paling sering digunakan untuk memperlihatkan *Leptospira* adalah pewarnaan perak dan pewarnaan Warthin-Starry.<sup>3,8</sup>

### 2.a.2. Isolasi Bakteri Hidup

Spesimen dari penderita dibiakkan pada media untuk memperbanyak bakteri. Metode ini membutuhkan waktu cukup lama, sangat mahal, dan memerlukan tenaga ahli berpengalaman, dan sensitifitasnya rendah. Biakan bakteri memerlukan media yang kompleks dan rumit, yang harus mengandung perangsang pertumbuhan dan antibiotika untuk menekan pertumbuhan kontaminan. Masa pertumbuhan bakteri cukup panjang yaitu 6-8 jam/siklus, sehingga tidak

mungkin dipakai mendiagnosis leptospirosis secara dini.<sup>13</sup>

Infeksi *Leptospira* pada binatang dan manusia diperkirakan terjadi sangat singkat. Biasanya bakteri ditemukan di dalam darah selama 8 hari dari pertama sakit. Oleh karena itu, darah diambil secepat mungkin. Pemberian antibiotika dapat mempengaruhi keberhasilan isolasi bakteri. Cairan serebrospinal untuk biakan harus diambil pada minggu pertama sakit. Sampel urine diambil pada minggu kedua sakit. Masa hidup *Leptospira* dalam urine sangat terbatas. Urine harus cepat diproses dengan sentrifugasi, sedimen yang diperoleh diresuspensi ke dalam *phosphate buffer salin-PBS* (untuk menetralkan pH), kemudian diinokulasi ke dalam medium dan diinkubasi pada temperatur 28°-30°C diamati setiap minggu. Sekarang sudah tersedia sistem biakan yang dijual secara komersial.<sup>14</sup>

### 2.a.3. Deteksi Antigen Bakteri

Ada berbagai metode untuk mendeteksi antigen *Leptospira* di antaranya, teknik *radioimmunoassay* (RIA), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), dan *chemiluminescent immunoassay*. Deteksi antigen *Leptospira* pada spesimen klinik lebih sensitif dan spesifik dibandingkan dengan pemeriksaan mikroskop lapangan gelap. Beberapa teknik ini telah dievaluasi, misalnya, metode RIA dapat mendeteksi 10<sup>4</sup> sampai 10<sup>5</sup> *Leptospira*/ml, metode ELISA dapat mendeteksi 10<sup>5</sup> *Leptospira*/ml. RIA lebih sensitif dibandingkan pemeriksaan langsung dengan mikroskop lapangan gelap, tetapi kurang sensitif dibandingkan biakan, terutama untuk pemeriksaan urine. Metode *chemiluminescent immunoassay* memberi hasil tidak berbeda dengan ELISA.<sup>3</sup>

Berdasarkan hasil penelitian, pemeriksaan antigen *Leptospira* dalam urine penderita dengan metode dot-ELISA menggunakan antibodi monoklonal LD5 dan LE1 memberi hasil positif berturut-turut 75%, 88,9%, 97,2%, 97,2% dan 100% bila sampel urine secara berurutan diambil pada hari ke 1, 2, 3, 7, dan 14 perawatan. Hasil penelitian ini cukup kuat untuk dapat diterapkan dalam mendeteksi antigen di dalam urine.<sup>13</sup>

*Leptospira* yang sudah diisolasi juga dapat dideteksi menggunakan metode absorpsi aglutinin silang. Dengan memiliki panel antibodi

monoklonal, maka laboratorium yang mampu melakukan tes aglutinasi mikroskopis, dapat mengidentifikasi isolat dalam waktu relatif lebih cepat. Metode molekuler seperti *polymerase chain reaction* (PCR), *restriction fragment length polymorphisms* (RFLP) juga dapat dipakai mendeteksi *Leptospira*.<sup>3,8</sup> Di samping itu, serovar atau serogrup juga dapat ditentukan dari isolat *Leptospira* yang diperoleh.<sup>8</sup>

## 2.b. Pemeriksaan Serologis

Sebagian besar kasus leptospirosis didiagnosis dengan tes serologi. Antibodi dapat dideteksi di dalam darah 5-7 hari sesudah munculnya gejala. Ada banyak metode serologis yang dapat digunakan, dan yang dianggap paling baik sampai saat ini adalah *microscopic agglutination test* (MAT).

### 2.b.1. Microscopic Agglutination Test (MAT)

*Microscopic agglutination test* (MAT) adalah tes untuk menentukan antibodi aglutinasi di dalam serum penderita. Cara melakukan tes adalah, serum penderita direaksikan dengan suspensi antigen serovar *Leptospira* hidup atau mati. Setelah diinkubasi, reaksi antigen-antibodi diperiksa di bawah mikroskop lapangan gelap untuk melihat aglutinasi. Yang dipakai batas akhir (*end point*) pengenceran adalah pengenceran serum tertinggi yang memperlihatkan 50% aglutinasi.<sup>8</sup> Metode ini dipakai sebagai metode referensi untuk mengembangkan teknik lain dengan membandingkan sensitifitas, spesifisitas, dan akurasi. MAT sering mengalami beberapa kendala terutama di negara yang sedang berkembang, karena memerlukan banyak jenis serovar dan tenaga ahli yang berpengalaman.<sup>13</sup>

Metode MAT sangat rumit terutama saat pengawasan, pelaksanaan, dan penilaian hasil. Seluruh biakan serovar hidup harus dipelihara dengan baik. Perlakuan terhadap tes menggunakan *Leptospira* hidup maupun mati harus sama. Memelihara biakan *Leptospira* di dalam laboratorium cukup berbahaya bagi para petugas. Di samping itu, sering terjadi kontaminasi silang antara serovar, sehingga perlu dilakukan verifikasi serovar secara berkala.<sup>3,8</sup>

Pemeriksaan MAT memerlukan antigen serovar *Leptospira* yang banyak beredar di suatu

wilayah.<sup>3,8</sup> Serovar yang sering digunakan adalah *Leptospira Interrogans* yaitu, *Australis*, *Autumnalis*, *Bataviae*, *Canicola*, *Copenhageni*, *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, dan *Pomona*. *Leptospira biflexa* adalah serovar *Patoe*.<sup>1</sup> Maksud penggunaan banyak jenis antigen, agar dapat mendeteksi infeksi serovar yang tidak umum, yang sebelumnya tidak pernah terdeteksi.<sup>3,8</sup> Sampai saat ini, serovar *Leptospira* yang beredar di Indonesia belum seluruhnya diketahui secara pasti. Oleh karena itu, diperlukan penelitian untuk mengetahui seluruh serovar yang beredar di Indonesia, sehingga antigen yang digunakan sesuai dengan serovar yang beredar, untuk memperoleh hasil MAT yang lebih tepat dan menghindari hasil negatif palsu.

Untuk mengatasi kesulitan MAT dengan antigen hidup, maka digunakan antigen mati. Antigen mati umumnya menghasilkan titer antibodi sedikit lebih rendah, dan reaksi silang lebih sering terjadi. Aglutinasi antigen mati kualitasnya berbeda dengan antigen hidup. Akan tetapi, untuk laboratorium yang tidak memiliki tenaga ahli, maka antigen ini merupakan alternatif yang cukup baik.<sup>3</sup>

Pada tubuh penderita biasanya muncul antibodi aglutinasi terhadap serovar yang menginfeksi. Sering ditemukan antibodi yang bereaksi silang dengan serovar lain, terutama ditemukan pada fase dini penyakit. Pada minggu pertama, reaksi heterologous serovar lain terjadi lebih kuat dibanding reaksi homologous serovar yang menginfeksi. Kadang-kadang ditemukan reaksi heterologous positif, sementara reaksi homologous masih negatif. Fenomena ini disebut reaksi *paradoxical*. Titer antibodi reaksi silang cenderung menurun relatif lebih cepat sampai beberapa bulan, sementara antibodi spesifik serogrup dan spesifik serovar tetap ada dalam waktu lama sampai bertahun-tahun.<sup>8</sup> Hal ini disebabkan karena penderita sudah mempunyai antibodi terhadap serogrup *Leptospira* lain sebelum terkena infeksi serogrup *Leptospira* yang baru.<sup>3</sup>

Untuk diagnosis, diperlukan sepasang serum. Adanya peningkatan titer empat kali lipat dari sepasang serum dapat memastikan diagnosis tanpa memperhatikan jarak waktu pengambilan di antara kedua sampel. Jarak pengambilan antara sampel pertama dan kedua sangat tergantung pada waktu antara munculnya gejala dan penampilan

gejala penyakit yang berat pada penderita. Jika gejala penyakit leptospirosis sangat jelas, maka jarak 3-5 hari sudah dapat mendeteksi peningkatan titer. Untuk penderita dengan perjalanan penyakit kurang jelas atau jika munculnya gejala tidak diketahui, maka jarak pengambilan sampel pertama dan kedua antara 10-14 hari. Jarang serokonversi tidak terjadi dengan jarak waktu tersebut. Selang waktu antara sampel pertama dan kedua sebaiknya lebih lama. Pemeriksaan serologis menggunakan MAT kurang sensitif terutama untuk pemeriksaan spesimen yang diambil pada permulaan fase akut, sehingga tidak dapat digunakan menentukan diagnosis pada penderita berat yang meninggal sebelum terjadinya serokonversi.<sup>3</sup>

Infeksi *Leptospira* akut sangat sulit didiagnosis dengan pemeriksaan sampel tunggal, karena titer antibodi penderita dipengaruhi oleh tingkat paparan yang terjadi di dalam populasi dan seroprevalensi. Oleh karena itu, menurut *communicable disease control* (CDC), yang dianggap kasus mungkin (*probable*) adalah penderita yang memiliki titer antibodi  $\geq 200$  dengan gejala klinis yang sesuai. Penilaian ini dapat diterapkan di negara dengan paparan *Leptospira* yang jarang, sedangkan untuk negara tropis dengan tingkat paparan *Leptospira* yang tinggi, maka titer tunggal adalah  $\geq 800$ , tetapi untuk lebih pasti disarankan titer  $\geq 1.600$ .<sup>3</sup>

MAT juga merupakan tes yang cukup baik untuk serosurvei epidemiologi, karena dapat juga dipakai pemeriksaan pada binatang, dan antigen yang dipakai dapat ditambah atau dikurangi sesuai dengan kebutuhan. Biasanya sebagai bukti mendapat paparan sebelumnya adalah titer  $\geq 100$ .<sup>15</sup> MAT dapat memberikan gambaran umum tentang serogrup yang ada dalam populasi.<sup>13</sup>

Karena pemeriksaan MAT sangat kompleks, maka dikembangkan sistem pemeriksaan antibodi *Leptospira* yang cepat. Ada berbagai metode serodiagnostik untuk leptospirosis. Beberapa di antaranya sudah tersedia secara komersial. Tes yang paling sering digunakan sebagai pengganti MAT adalah tes *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).<sup>16</sup>

### 2.b.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Tes ELISA sangat populer dan bahan yang

diperlukan untuk pemeriksaan sudah tersedia secara komersial dengan antigen yang diproduksi sendiri (*in house*). Untuk mendeteksi IgM umumnya digunakan antigen spesifik genus yang bereaksi secara luas, teknik ini kadang-kadang juga digunakan untuk mendeteksi antibodi IgG. Adanya antibodi IgM merupakan pertanda adanya infeksi baru *Leptospira*, atau infeksi yang terjadi beberapa minggu terakhir.<sup>8</sup>

Test ELISA cukup sensitif untuk mendeteksi *Leptospira* dengan cepat pada fase akut, dan lebih sensitif dibandingkan dengan MAT.<sup>1</sup> Tes ini dapat mendeteksi antibodi IgM yang muncul pada minggu pertama sakit, sehingga cukup efektif untuk mendiagnosis penyakit. ELISA dapat juga digunakan untuk mendeteksi antibodi IgM dalam cairan serebrospinal, saliva dan urine. Harus diingat bahwa, antibodi kelas IgM kadang-kadang masih dapat dideteksi sampai bertahun-tahun, sehingga titer positif (*cut-off point*) harus ditentukan dengan dasar pertimbangan yang sama seperti MAT. Tes ELISA spesifik genus cenderung memberikan reaksi positif lebih dini dibandingkan dengan MAT. ELISA biasanya hanya mendeteksi antibodi yang bereaksi dengan antigen spesifik genus yang sangat luas, sehingga tidak dapat menentukan serovar atau serogrup penyebab.<sup>8</sup>

Metode ELISA telah banyak dimodifikasi, misalnya, Dot-ELISA spesifik IgM dikembangkan menggunakan antigen *Leptospira* polivalen yang ditetaskan di atas kertas filter selulose sumur mikrotiter. Dengan metode ini, jumlah reagen yang dibutuhkan sedikit. Di samping untuk mendeteksi IgM, metode ini dimodifikasi untuk mendeteksi IgG dan IgA. *Dipstick assay* telah digunakan secara luas di beberapa negara. Dari hasil pemeriksaan sampel darah yang diambil pada fase akut, tes ini memberikan sensitifitas 60,1%, dan bila sampel darah diambil pada fase konvalesen sensitifitasnya meningkat menjadi 87,4%.<sup>17</sup> Dari hasil penelitian ternyata sensitifitas IgM-ELISA dan IgM-*dipstick* komersial untuk mendeteksi leptospirosis akut adalah 89,6-98% dan spesifitasnya 90-92,7% dengan nilai ramal positif 87,6-90% dan nilai ramal negatif 90,7-92%. Pemeriksaan *dot immunoblot* dengan menggunakan *conjugate* koloid emas dapat memberikan hasil pemeriksaan dalam waktu 30 menit.<sup>3,18</sup>

### 2.b.3. Tes serologis lain

Tes *macroscopic slide agglutination* sudah pernah dilakukan pada binatang dan manusia. Sering digunakan untuk penapisan serum manusia atau binatang, tetapi sering memberikan hasil positif palsu.<sup>19</sup>

Juga dapat digunakan sel darah merah yang disensitisasi, bila ditambahkan komplemen akan mengalami hemolitik. Di samping itu, juga dapat dilakukan pemeriksaan hemaglutinasi. Pemeriksaan ini dapat mendeteksi antibodi IgM dan IgG.<sup>3</sup>

Pemeriksaan *indirect hemagglutination* (IHA) dikembangkan oleh *communicable disease control* (CDC), mempunyai sensitifitas 92%, spesifisitas 95%, dan dengan nilai ramal negatif 92%, bila dibandingkan dengan MAT. Metode ini tersedia secara komersial. Sensitifitas IHA pada populasi yang endemi *Leptospira* memberikan hasil yang sangat bervariasi.<sup>16,20,21</sup>

Tes aglutinasi mikrokapsul menggunakan polimer sintetik sebagai pengganti sel darah merah telah dievaluasi secara luas di Jepang dan China, ternyata lebih sensitif dibandingkan dengan MAT atau ELISA-IgM untuk pemeriksaan fase akut, tetapi gagal mendeteksi infeksi yang disebabkan oleh banyak serovar.<sup>3</sup>

Pemeriksaan aglutinasi latex sederhana (*simple latex agglutination assay*) mempunyai sensitifitas 82,3% dan spesifisitas 94,6%. Pemeriksaan ini sangat mudah dilakukan dan tidak memerlukan keahlian dan peralatan khusus. Reagen mempunyai masa hidup lama, walaupun pada temperatur lingkungan daerah tropis.<sup>23</sup> Teknik lain adalah *immunofluorescence*, RIA, *counterimmuno-electrophoresis* dan immuno assay tetes tebal, tetapi jarang digunakan.

### 3. Pemeriksaan Molekuler

DNA *Leptospira* dapat dideteksi menggunakan metode *dot-blotting* dan hybridisasi. *Probe* rekombinan yang spesifik untuk serovar patogen sudah dibuat dari serovar *lai*. *Probe* spesifik untuk serovar *hardjobovis* juga sudah dikembangkan dan digunakan untuk mendeteksi *Leptospira* dari urine sapi. Agar dapat mendeteksi, *probe* yang dilabel dengan <sup>32</sup>P membutuhkan 10<sup>3</sup> *Leptospira*, sedangkan jumlah *Leptospira* yang dapat dideteksi oleh PCR jauh lebih rendah, sehingga sekarang teknik *probe* sudah tidak

digunakan lagi.<sup>3</sup>

### 3.a. Teknologi PCR

*Polymerase chain reaction* (PCR) adalah metode amplifikasi segmen DNA *Leptospira* yang terdapat di dalam sampel klinik. Jadi, adanya *Leptospira* dipastikan dengan menemukan segmen DNA *Leptospira* yang spesifik. Metode ini sangat berguna untuk mendiagnosis leptospirosis terutama pada fase permulaan penyakit. Alat ini dapat mendeteksi *Leptospira* beberapa hari setelah munculnya gejala penyakit. Akan tetapi, alat ini belum tersedia secara luas terutama di negara yang sedang berkembang.<sup>23</sup>

Untuk mendeteksi DNA *Leptospira*, teknologi PCR membutuhkan sepasang *primer* dengan sasaran gen spesifik, seperti gen rRNA 16S dan 23S, atau elemen pengulangan. Di samping itu, ada juga yang disusun dari pustaka genom. Umumnya teknologi ini sangat jarang dipakai untuk memeriksa spesimen klinik.<sup>3</sup>

Dari hasil penelitian penderita yang sudah didiagnosis leptospirosis secara pasti, ternyata yang menunjukkan hasil biakan positif sekitar 48%, sementara PCR 62%, sedangkan pemeriksaan serologis 97%. Pada keadaan tertentu pemeriksaan PCR lebih menguntungkan. Sebagai contoh, pemeriksaan ini dapat memberikan hasil positif pada 2 penderita yang meninggal sebelum terjadi serokonversi, dan juga memberi hasil positif pada 18% penderita seronegatif pada permulaan fase akut.<sup>3</sup>

Merien dkk. (1992) membuat sepasang *primer* yang dapat mengamplifikasi fragmen yang panjangnya 331 pasang basa dari gen rrs (rRNA 16S) *Leptospira* patogen dan non-patogen dengan harapan agar dapat mendeteksi seluruh serovar patogen.<sup>24</sup> Gravekamp dkk. (1993) membuat *primer* G1 dan G2.<sup>25</sup> *Primer* ini mempunyai kelemahan yaitu tidak dapat mengamplifikasi serovar *L. kirschneri*. Kedua pasang *primer* ini sudah digunakan secara luas untuk studi klinik.

Keterbatasan PCR adalah tidak mampu untuk mendeteksi jenis serovar yang menginfeksi. Walaupun demikian PCR bermanfaat untuk epidemiologi dan kesehatan masyarakat. Agar lebih bermanfaat, maka hasil yang diperoleh dicerna dengan enzim *endonuclease* restriksi, kemudian *amplicon* yang diperoleh disekuens langsung, atau dianalisis dengan metode

konformasi untai tunggal.<sup>26</sup>

Keuntungan pemeriksaan PCR adalah, bila bakteri ada maka diagnosis dapat dipastikan dengan cepat terutama pada fase dini penyakit sebelum titer antibodi dapat dideteksi. Kelemahannya, memerlukan peralatan dan tenaga ahli yang khusus. Disamping itu, PCR dapat memberikan hasil positif palsu, apabila terkontaminasi oleh DNA asing. Dia juga dapat memberi hasil negatif palsu, karena spesimen klinik yang diperiksa sering mengandung inhibitor seperti heparin dan saponin.<sup>8</sup>

### 3.b. Pemetaan molekuler

Metode yang digunakan adalah mencerna DNA kromosom menggunakan *restriction endonuclease* (REA), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *ribotyping*, *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) dari hasil PCR. Metode-metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi berbagai serovar.<sup>3</sup>

### Kesimpulan

Ada berbagai metode tes laboratorium yang dapat digunakan untuk mendiagnosis penyakit leptospirosis pada manusia. Untuk mendeteksi *Leptospira* dapat dilakukan dengan membiakkan pada medium yang sudah tersedia, atau dengan melihat bakteri secara langsung pada spesimen klinik menggunakan mikroskop lapangan gelap. Saat ini pemakaian PCR untuk mendeteksi gen *Leptospira* menggunakan sepasang *primer* juga sudah banyak berkembang. Diagnosis dapat juga ditegakkan dengan cara pemeriksaan serologis untuk mendeteksi antibodi yang timbul sebagai akibat leptospirosis, misalnya dengan MAT, ELISA, RIA, IHA dll. Masing-masing dari tes ini mempunyai keunggulan dan kelemahan. Untuk itu, maka para klinisi, ahli epidemiologi, dan peneliti hendaknya memahami keunggulan dan kelemahan dari masing-masing tes ini, sehingga dapat mengevaluasi hasil tes yang diperoleh dengan baik dan benar.

### Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan banyak terima kasih kepada seluruh dewan redaksi Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan yang telah memuat tulisan ini.

### Daftar Pustaka:

1. Bharadwaj R, Bal AM, Joshi SA, Kagal A, Pol SS, Garad G, et al. An Urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. *Jpn.J Infect Dis* 2002; 55:194-196.
2. Ko AI, Reis MG, Dourado CMR, Johnson WD, Roley LW, and the Salvador Leptospirosis Study Group. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet* 1999; 354:820-825.
3. Levett PN, Branch SL, Whittington CU, Edwards CN, and Paxton H. Two methods for rapid diagnosis of acute leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 349-351.
4. Romeo EC, Bernardo CCM, Yasuda PM. Human leptospirosis: A twenty-nine year serological study in Saulo Paulon Brazil. *Res Inst Med trop S Paulo* 2003; 45(5):745-748
5. Chu KM, Rathinam R, Namperumalsamy, and Dean D. Identification of leptospira spesies in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in South India. *J Infect Dis* 1998; 177:1314-21.
6. Plank R and Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of leptospira spp. In humans. *Microbes and Infect* 2000; 2: 1265-1276.
7. Fontaine GA.: Canine leptospirosis---Do we have a problem? *J Vetmic* 2006; 117: 19-24.
8. WHO. Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. International leptospirosis society. 2003.
9. Marutto PCF, Nascimento CMR, Neto JE, Marotto MS, Andrade L, Sztajnbok J, et al. Acute lung injury in leptospirosis: Clinical and laboratory featurer, outcome, and factors associated with mortality. *Clin Infec Dis* 1999; 29: 1561-3.
10. Martin EM, Bestard BV, Marquez RL, and Gonzalez AA: Case report: Lung involvement in leptospirosis. *Arch Bronconeumol* 2006; 42(4):202-4
11. Trevejo RT, Rigau-Peres JG, Ashford DA, McClure EM, Gonzalez CJ, Amador JJ, et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage---Nicaragua, 1995. *J Inf Dis* 1998; 178:1457-63.



12. Vijayachari P.: Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnosis procedure in leptospirosis. *Indian J Med Res* 2001; 114:54-58.
13. Saengjaruk P, Chaicumpa W, Watt G, Bunyaraksyotin G, Wuthiekanun V, Tapchaisri P, et al. Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody-based antigen detection in urine. *J Clin Microbiol* 2002; 40:480-489.
14. Palmer MF, Zochowski WJ. Survival of leptospire in commercial blood culture systems revisited. *J Clin Pathol* 2000; 53: 713-714.
15. Levett PN.: Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Aclin infec Dis* 2003; 36: 447-452.
16. Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Wood CW, Aye T, Spiegel RA, et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic test for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41:803-809.
17. Smith HL, Ananyina YV, Chershsky A, Dancel L, Lai-A-Fat, RFM, Chee HD, et al. International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2904-2909.
18. Levett PN and Branch SL. Evaluation of two enzyme linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 745-748.
19. Brandao AP, Camargo ED, da Silva ED, Silva MV and Abrao RV. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3138-3142.
20. Levett PN and Whittington CU. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 11-14.
21. Effler PV, Domen HY, Bragg SL, Aye T, and Sasaki DM. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1081-1084.
22. Smith HL, van der Hoorn MAWG, Goris MGA, Gussenhoven GC, Yersin C, Sasaki DM, et al. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1272-1275.
23. Yersin C, Bovet P, Merien F, Wong T, Panowsky J, and Perolat P. Human leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): a population-based study. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 933-940.
24. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, and Girons IS. Polymerase chain reaction for detection of leptospira spp. In clinical samples. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2219-2224.
25. Gravekamp C, van de Kemp H, Franzen M, Carrington DG, Schoone GL, Van Eys GJJM, et al. Detection of seven species pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 1691-1700.
26. Natarajaseenivasan K, Prabhu N, Selvanayaki K, Raja SSS, and Ratnam S. Human Leptospirosis in Erode, South India: Serology, isolation, and characterization of the isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57: 193-197.