

## **Diagnosis Laboratorik Leptospirosis**

### ***Laboratory Diagnostic of Leptospirosis***

Adang Muhammad<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta*

#### **Abstract**

*Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by pathogenic leptospira species. Leptospirosis is endemic disease in the tropical urban areas. Leptospirosis must always be considered during the differential diagnosis of other tropical febrile illnesses. Laboratory tests are necessary to confirm the diagnosis of clinically suspected leptospirosis due to its varied symptomatology. Leptospira has extend serogroup. The detection of antigen and antibodies of leptospira are complicated. They depends on the samples available and temporal stage of the illness, sensitivity and spesificity of laboratory method. The conventional tests include direct microscopy, culture and the most widely used reference standard method the microscopic agglutination test but have many limitations. A variety of newer serological tests and those based on molecular techniques have been developed.*

**Keywords :** *Diagnostic, Laboratory, Leptospirosis*

#### **Abstrak**

Leptospirosis merupakan zoonosis di seluruh dunia yang disebabkan oleh spesies leptospira patogen. Leptospirosis merupakan endemis pada daerah urban di negara tropis. Leptospirosis harus selalu dipertimbangkan pada saat menemui penderita dengan demam di daerah tropis. Pemeriksaan laboratorium diperlukan sebagai konfirmasi diagnosis pada penderita yang secara klinis baik gejala maupun tanda yang sangat bervariasi dicurigai leptospirosis. Leptospira memiliki serogroup yang sangat besar. Deteksi antigen dan antibodi leptospira merupakan permasalahan yang rumit oleh karena dipengaruhi ketersediaan sampel, onset penyakit maupun sensitifitas dan spesifisitas pemeriksaan, seroprevalensi populasi. Pemeriksaan secara konvensional adalah mikroskop secara langsung, kultur, dan metode *microscopic agglutination test* (MAT) yang secara luas digunakan sebagai standar rujukan, namun pemeriksaan tersebut memiliki banyak keterbatasan. Berbagai macam tes serologi yang baru dan metode yang berbasis molekuler telah dikembangkan.

**Kata kunci :** *Diagnosis, Laboratorik, Leptospirosis*

## Pendahuluan

Leptospirosis merupakan penyakit zoonosis, yaitu penyakit yang dapat ditularkan dari hewan kepada manusia. Leptospirosis diperkirakan merupakan zoonosis yang paling luas tersebar di dunia. Etiologi leptospirosis adalah spirochaeta dari genus leptospira.<sup>1,2</sup>

Penularan leptospirosis terjadi melalui kontak terhadap kulit, terutama jika kulit terluka dan membran mukosa dengan air, tanah lembab atau tanaman yang terkontaminasi urin binatang yang terinfeksi.<sup>3</sup> Penularan dapat terjadi pula melalui kontak langsung terhadap urin dan jaringan hewan yang terinfeksi. Jalur penularan yang jarang terjadi melalui makanan atau menghirup udara yang mengandung kontaminan, gigitan binatang atau hubungan seksual.<sup>2</sup>

Masa inkubasi leptospirosis rata-rata 10 hari (4-26 hari). Gejala klinis yang muncul bervariasi mulai dari gambaran klinis yang ringan sampai berat. Gejala klinis dapat timbul mendadak, yaitu demam, sakit kepala, nyeri otot, konjungtivitis dan kadang-kadang disertai ruam. Komplikasi yang terjadi dapat berupa ikterus, meningitis, perdarahan kulit, dan selaput mukosa serta gagal ginjal. Leptospirosis memiliki spektrum yang luas, dari infeksi subklinis sampai sindroma multiorgan yang berat dengan mortalitas yang tinggi. Pada stadium lanjut terjadi kerusakan organ vital seperti hepar, selaput otak dan ginjal yang berakibat kematian penderita.<sup>2</sup> Manifestasi klinik sering kali sulit dibedakan dengan dengue haemorrhagic fever, malaria, influenza atau penyakit lain yang memiliki riwayat demam, nyeri kepala atau nyeri otot.<sup>4</sup>

Diagnosis leptospirosis biasanya ditegakkan berdasar anamnesa, gambaran klinis dan laboratoris. Diagnosis pasti ditegakkan dengan ditemukannya kuman leptospira pada darah, urin atau cairan serebrospinal yaitu dengan pemeriksaan langsung maupun kultur. Penetapan diagnostik dapat pula digunakan melalui serokonversi atau peningkatan titer lebih dari 4 kali dengan pemeriksaan *microscopic agglutination test* (MAT).<sup>5,6,7</sup>

Pemeriksaan diagnostik laboratorik leptospirosis yang sering digunakan adalah metode serologi. Pemeriksaan serologik yang sering digunakan adalah MAT, *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *immunofluorescent antibody test*. Tes diagnostik yang cepat dan mudah adalah metode *dipstick assay*, *lateral-flow assay* dan *latex based agglutination test*.<sup>8</sup>

Dalam penggunaan praktis pemeriksaan-pemeriksaan di atas banyak memiliki masalah. Hal ini terjadi sebagai dampak dari teknis pemeriksaan, ketersediaan sampel, sensitifitas dan spesifisitas metode maupun alat yang digunakan.<sup>2,9</sup> Diagnosis laboratorik leptospirosis sering menjadi hal yang membingungkan bagi profesi kesehatan yang terlibat dalam diagnosis, pengelolaan maupun *surveillance*.<sup>7</sup> Dalam penggunaan praktis, konfirmasi adanya leptospira melalui deteksi antigen atau antibodi leptospira baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah dikembangkan masih banyak memiliki keterbatasan.

Tujuan penulisan makalah ini untuk mengetahui perkembangan teknik pemeriksaan dan validitas masing-masing pemeriksaan penunjang konfirmasi etiologi leptospirosis.

Manfaat yang diharapkan adalah membantu klinisi maupun profesional kesehatan lainnya dalam menentukan pilihan pemeriksaan laboratorium yang relevan untuk leptospirosis.

## Diskusi

### Etiologi

Leptospirosis disebabkan oleh bakteri *leptospira sp*. Bakteri ini berbentuk spiral, bertekstur lentur dan merupakan bakteri gram negatif dengan flagela, termasuk ordo spirochaetales, famili trepanometaceae. Diameter bakteri sebesar 0,05 – 0,1  $\mu$ .<sup>2</sup>

*Leptospira sp* terbagi menjadi dua kelompok. Kelompok pertama adalah *leptospira interrogans* yang merupakan kelompok patogen. Kelompok ini terdiri atas lebih dari 230 serogroup. Kelompok kedua

adalah *leptospira biflexa* yang merupakan kelompok yang tidak patogen.<sup>2</sup>

*Leptospira interrogans* maupun *leptospira biflexa* memiliki sejumlah besar serovarian yang dibagi berdasar reaksi aglutinasi terhadap antigen homolog. Jika lebih dari 10% titer antigen homolog tersisa

pada sedikitnya 1 atau 2 antisera yang diulang, dua strain dikatakan memiliki serovarian yang berbeda. Pembagian serogroup didasarkan atas asal daerah yang memiliki kepentingan epidemiologi. Sebagai contoh serogroup L, interrogans memiliki berbagai serovarian (tabel 1).

**Tabel 1. Beberapa serovarian pada masing-masing serogroup**

Serogroup	Serovarian
icterohaemorrhagiae,	Icterohaemorrhagiae, copenhageni, lai, zimbabwe
Hebdomadis	hebdomadis, jules, kremastos
Autumnalis	autumnalis, fortbragg, bim, weerasinghe
Pyrogenes	pyrogenes
Bataviae	bataviae
Grippotyphosa	grippotyphosa, canalzonae, ratnapura
Canicola	canicola
Australis	australis, bratislava, lora
Pomona	pomona
Javanica	javanica
Sejroe	sejroe, saxkoebing, hardjo
Panama	panama, mangus
Cynopteri	cynopteri
Djasiman	djasiman
Sarmin	sarmin
Mini	mini, georgia
Tarassovi	tarassovi
Ballum	ballum, aroborea
Celledoni	celledoni
Louisiana	louisiana, lanka
Ranarum	ranarum
Manhao	manhao
Shermani	shermani
Hurstbridge	hurstbridge

Dikutip dari: Clin Microbiol Rev. 2001 April; 14(2): 296-326.

## Patogenesis

Leptospirosis memasuki tubuh manusia melalui abrasi kulit atau melalui membran mukosa yang intak seperti conjungtiva, mukosa oronasopharing. Faktor virulensi yang berperan adalah asam hyluronat dan motilitasnya. Selanjutnya akan terjadi leptospiremia dan menyebar ke seluruh organ. Organisma ini dapat diisolasi dari darah atau *liquor cerebrospinal spinal* (LCS) pada 4-10 hari penyakit.<sup>2</sup>

Leptospira mengakibatkan vaskulitis pada endotel kapiler di seluruh tubuh yang mengakibatkan berbagai manifestasi klinis terutama pada hepar dan ginjal. Di dalam ginjal akan menyebabkan nephritis interstisial dan nekrosis tubular. Di dalam liver menyebabkan nekrosis centrilobular dengan proliferasi sel-sel kupfer. Di dalam paru-paru mengakibatkan perdarahan. Di dalam otot skelet mengakibatkan pembengkakan, vakuolisasi myofibril dan nekrosis fokal. Pada saat antibodi terbentuk, leptospira tersingkir dari semua tempat kecuali mata, ginjal, dan otak, dimana akan bertahan sampai beberapa minggu sampai beberapa bulan. Persistensi mikroorganisma ini dapat menyebabkan uveitis rekuren.<sup>2</sup>

Respon sistem imun bekerja secara efektif mengeliminasi organisma tetapi juga memproduksi reaksi inflamasi dan memunculkan gejala. Hal ini dapat ditunjukkan dengan terjadinya meningitis pada saat peningkatan titer antibodi.<sup>2</sup>

Leptospiremia terjadi pada kondisi subklinis sampai dengan 1 minggu onset. Pada LCS atau cairan dialisat dapat ditemukan leptospira meskipun dalam jumlah yang kecil. Leptospira dapat muncul dalam urin pada permulaan minggu kedua sampai beberapa minggu.<sup>2</sup>

## Epidemiologi

Iklim yang cocok untuk perkembangan leptospira adalah udara yang hangat, tanah yang lembab dan pH alkalis. Keadaan demikian dijumpai pada daerah tropis sepanjang tahun.<sup>10</sup> Di negara beriklim tropis, kejadian leptospirosis dapat lebih banyak 1000 kali dibanding negara subtropis dengan risiko penyakit lebih

berat.<sup>11</sup> Di daerah subtropis jumlah kasus leptospirosis tergantung pada musim, dengan insidensi lebih tinggi pada musim gugur.<sup>2</sup>

Insidensi Leptospirosis yang telah dilaporkan menggambarkan adanya kasus yang terdiagnosis secara laboratorik maupun berdasar indeks klinis. Di Amerika Serikat insidensi tertinggi terjadi di Hawaii dengan 100 kasus pertahun.<sup>12</sup>

Di New Zealand antara tahun 1990-1998 sebesar 44 per 100.000. Angka insidensi tertinggi terjadi pada pekerja yang berhubungan dengan daging dan hutan.<sup>13</sup>

Penelitian di Baltimore menunjukkan leptospirosis sering terjadi pada dewasa muda dengan umur rata-rata 23,5 tahun.<sup>14</sup> Penelitian terhadap perbedaan jenis kelamin menunjukkan bahwa laki-laki memiliki risiko 9,6 kali lebih besar dibanding perempuan.<sup>10</sup>

Kejadian sporadis telah dilaporkan seperti yang terjadi pada atlet triathlon di Illinois. Para perenang yang terbukti terpapar sebanyak 30 dari 70 peserta.<sup>3</sup>

Faktor risiko leptospirosis akibat pekerjaan yang ditemukan pertama kali adalah pekerja tambang, selanjutnya dilaporkan penjahit dan pekerja ikan. Peternak mempunyai risiko terpapar lebih banyak di seluruh dunia.<sup>2</sup>

Paparan kegiatan rekreasi dapat terjadi pula, terutama olahraga yang berhubungan dengan air, seperti berenang, berkano, menyelam dan memancing. Banyak wabah terjadi selama pertandingan olah raga, terutama terjadi pada musim panas dan cuaca kering yang bertepatan waktunya dengan perkembangbiakan leptospira di sungai dan kolam air tawar. Kasus leptospirosis juga sering terjadi setelah banjir besar.<sup>2</sup>

Selain pekerjaan dan lingkungan, kebiasaan hidup juga merupakan faktor risiko leptospirosis. Penelitian Bovet menunjukkan lingkungan hidup di hutan, sampah sekitar rumah, dan tikus di dapur sebagai faktor risiko leptospirosis.<sup>11</sup> Kebiasaan hidup yang dapat menjadi faktor risiko adalah mencuci pakaian di sungai, mandi di sungai berjalan tanpa alas kaki, luka pada kulit serta kebiasaan minum alkohol.<sup>2</sup>

Di Indonesia, dengan wilayah sebaran Jawa Tengah, Yogyakarta, Jawa Barat, Sumatera Utara, Riau, Jambi, Sumatera Selatan, Bengkulu dan Kalimantan Timur telah diidentifikasi sekitar 170 serovarian leptospira.<sup>15</sup> Survei pada tahun 1995-1996 menunjukkan bahwa 10 spesimen dari 554 spesimen penduduk Propinsi Sumatera Barat, Sumatera Utara, Kalimantan Barat, Sulawesi Selatan dan Sulawesi Utara positif mengandung leptospira sp.<sup>16</sup>

### Diagnosis Laboratorik

Menurut The Center for Disease Control (CDC Amerika) diagnosis leptospirosis definitif dapat ditegakkan dengan ditemukannya leptospira dari spesimen apapun (darah, jaringan atau cairan tubuh) atau adanya gambaran klinik leptospirosis yang didukung oleh serologi positif.<sup>12</sup>

### Pemeriksaan mikroskopis

Leptospira dapat terlihat melalui pemeriksaan langsung spesimen melalui mikroskop medan gelap, immunofluoresensi atau mikroskop cahaya setelah dilakukan pengecatan khusus. Kira-kira  $10^4$  leptospira/ml diperlukan untuk satu leptospira perlapangan pandang terlihat pada mikroskop medan gelap.<sup>17</sup> Menurut Kramer, metode *buffy coat* kuantitatif mampu memperlihatkan sensitifitas berkisar  $10^2$  leptospira/ml.<sup>18</sup>

Leptospiremia dapat dideteksi melalui mikroskop hanya dalam beberapa hari pertama fase akut. Pemeriksaan mikroskop medan gelap terhadap darah, urin, LCS dan cairan dialisat memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang rendah. Positif palsu maupun negatif palsu tidak jarang terjadi meskipun diperiksa oleh tenaga yang berpengalaman.<sup>6,7</sup>

Pada relawan yang terinfeksi serovarian grippotyphosa, leptospira terdeteksi paling awal hari ke empat setelah gejala. Tidak satupun sampel yang positif yang diambil sesudah hari ke enam. Hampir semua temuan penelitian menunjukkan bahwa leptospira terlalu kecil

berada di LCS untuk dideteksi dengan mikroskop medan gelap. Mikroskop medan gelap dapat mengalami *mis-interpretasi* terhadap fibrin atau protein yang memperlihatkan gerak brown.<sup>2</sup>

Metode pengecatan telah diterapkan untuk meningkatkan sensitifitas pemeriksaan secara langsung. Termasuk pengecatan immunofluoresensi terhadap urin, air dan tanah serta pengecatan immunoperoxidase terhadap darah dan urin. Pengecatan histopatologi telah diterapkan pula untuk meningkatkan sensitifitas pemeriksaan dalam jaringan. Baru-baru ini telah diperkenalkan metode immunohistokimia.<sup>6,7</sup>

### Pemeriksaan Kultur

Leptospiremia terjadi pada tahap pertama penyakit dimulai sebelum onset gejala dan berakhir pada minggu pertama sakit. Oleh karena itu kultur darah sebaiknya dilakukan sesegera mungkin setelah muncul onset penyakit. Satu atau dua tetes darah diinokulasikan ke dalam 10 cc media semisolid yang berisi 5-fluorouracil. Deteksi secara cepat leptospira dengan metode radiometri. Leptospira bertahan dalam media kultur konvensional dalam beberapa hari. Jarang terjadi leptospira dapat diisolasi setelah satu minggu onset. Isolasi leptospira dari sampel klinis memberikan kepastian diagnosis dan membantu identifikasi prevalensi serogroup.<sup>6</sup>

Spesimen LCS dan cairan dialisat dapat pula dikultur selama 1 minggu pertama onset penyakit. Urine dapat dikultur dari permulaan minggu kedua onset penyakit. Lamanya ekskresi urin bervariasi tetapi dapat terjadi sampai beberapa minggu. Daya tahan leptospira di dalam urin sangat terbatas sehingga proses sentrifugasi harus sesegera mungkin dan diikuti resuspensi sedimen dengan dengan *phosphat-buffered saline*. Selanjutnya diikuti dengan inokulasi dalam media semi solid yang berisi 5-fluorouracil.<sup>19</sup>

Kultur diinkubasi pada suhu  $28^{\circ}$  to  $30^{\circ}\text{C}$  dan diperiksa dengan mikroskop medan gelap dalam satu minggu hingga 13 minggu sebelum dibuang. Kultur yang

terkontaminasi di saring dengan filter ukuran  $0.2 \mu\text{m}$  or  $0.45 \mu\text{m}$  sebelum subkultur ke dalam media segar.<sup>19</sup>

Penggunaan kultur sebagai konfirmasi diagnosis jarang dilakukan dikarenakan sangat rumit, mahal, menghabiskan banyak waktu dan memerlukan waktu inkubasi yang panjang (minimal 1 bulan untuk dinyatakan negatif) dan memiliki sensitifitas yang rendah. *Leptospira* juga memiliki waktu penggandaan yang lama (6-8 jam). Diperlukan pula keamanan laboratorium tingkat II (*Biosafety level II*) untuk menjaga infeksiusitasnya.<sup>5</sup>

Isolat *leptospira* dari hasil kultur diidentifikasi melalui pemeriksaan serologi ataupun tehnik molekuler. Metode lama yang dapat digunakan adalah *cross-agglutinin absorption*. Sedikit laboratorium yang mampu menyelenggarakan pemeriksaan identifikasi isolat *leptospira*. Laboratorium yang mampu menyediakan pemeriksaan MAT dapat melakukan identifikasi secara cepat melalui penggunaan panel antibodi monoklonal. Identifikasi melalui metode molekuler telah berkembang dan digunakan secara luas.<sup>2</sup>

*Leptospira* sering sensitif terhadap beta-lactam, macrolides, tetracyclines, fluoroquinolones and streptomycin. Permasalahan uji sensitifitas meliputi masa inkubasi yang panjang, menggunakan media yang berisi serum dan kesulitan penghitungan pertumbuhan secara akurat.<sup>19</sup>

## Pemeriksaan Serologi

### Deteksi antigen

Deteksi antigen dalam spesimen klinik memiliki sensitifitas yang lebih tinggi dibanding mikroskop medan gelap. Metode RIA (*Radioimmunoassay*) dapat mendeteksi  $10^4$ - $10^5$  sub *leptospira*/ml sedangkan metode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) mampu mendeteksi  $10^5$  sub *leptospira*/ml. Metode CLIA (*chemiluminescent immunoassay*) telah diterapkan namun memiliki sensitifitas lebih rendah dibanding ELISA. Baru-baru ini telah dikembangkan metode *immunomagnetic*

*antigen capture* yang dikombinasikan dengan *fluoroimmunoassay* untuk mendeteksi sedikitnya  $10^2$  sub *leptospira*/ml urin pada tikus yang terinfeksi serovarian *hardjo*.<sup>2,19</sup>

### Deteksi Antibodi

Paling banyak kasus leptospirosis dideteksi dengan ditemukannya antibodi.<sup>5,6</sup> Antibodi dapat dideteksi pada hari ke enam hingga ke sepuluh onset penyakit dan mencapai puncak pada minggu ke tiga dan ke empat. Kadar antibodi selanjutnya berkurang secara bertahap namun tetap tersisa hingga beberapa tahun. Metode serologis dapat dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok pertama untuk genus spesifik dan yang lain untuk serogroup spesifik. Penggunaan tes aglutinasi telah dilakukan pertama kali. Sampai saat ini masih sedikit serovarian yang dikenal dan belum ada upaya untuk membuat standar metodologi di antara laboratorium-laboratorium. Telah banyak metode serologi yang diterapkan namun temuan serologi secara definitif *leptospira* masih menggunakan metode MAT.<sup>5,20</sup>

### Microscopic agglutination test (MAT)

Metode rujukan diagnosis serologis leptospirosis adalah MAT yang mana serum pasien direaksikan terhadap suspensi antigen beberapa serovarian *leptospira*. Beberapa laboratorium menggunakan 22 serovarian *leptospira*. Sesudah inkubasi (selama 1,5 jam) campuran serum-antigen diperiksa dengan mikroskop untuk aglutinasi dan titernya. Beberapa modifikasi pemeriksaan ini dilakukan seperti pembacaan *microtiter trays*. MAT dibaca menggunakan mikroskop medan gelap. Spesimen diencerkan serial dalam 96 sumur. Titik akhir larutan yang paling encer adalah dimana terjadi aglutinasi sebesar 50%. Oleh karena kesulitan dalam pengamatan adanya 50% aglutinasi, ditetapkan adanya *leptospira* yang bebas atau tidak teraglutinasi sebesar 50%. *Leptospira* yang tidak teraglutinasi dibandingkan dengan suspensi kontrol.<sup>2,19</sup>

Kelemahan Metode MAT dalam subyektifitas pengamatan aglutinasi perlu

diperhatikan. Beberapa laboratorium menggunakan cut of point titer sebesar > 1:200 untuk daerah non endemis dan >1:800 untuk daerah endemis. Laboratorium yang berbeda menggunakan perbedaan *cut off* dari range titer dari 1/100 hingga 1/800 untuk diagnosis mungkin menghasilkan *overdiagnosis* dan *overestimation* dari beban penyakit. Kepentingan penentuan titer ini untuk menghindari perhatian yang berlebihan di masyarakat.<sup>2,19</sup>

Interpretasi pemeriksaan MAT sangatlah rumit dikarenakan adanya reaksi silang yang tinggi diantara serogroup yang berbeda terutama pada sampel fase akut. Hal ini menimbulkan perkiraan yang luas, dan pasien sering memiliki titer yang mirip pada semua serovarian. Dijumpai adanya titer paling tinggi terdeteksi terhadap suatu serogroup yang tidak berhubungan dengan jenis yang menginfeksi. Reaksi silang yang luas pada fase akut disebabkan oleh deteksi MAT terhadap antibodi IgM maupun IgG dan keberadaan beberapa antigen umum diantara leptospira.<sup>2,19</sup>

MAT merupakan uji yang rumit dalam hal kontrol, pelaksanaan dan interpretasinya. Kehidupan semua serovarian yang diperlukan sebagai antigen membutuhkan perawatan khusus. Kekurangan lain dari metode MAT adalah risiko kontaminasi terhadap antigen kultur yang mana memerlukan verifikasi periodik untuk masing-masing serovarian. Titer MAT juga dipengaruhi oleh pertumbuhan antigen dalam medium kultur. Subkultur yang diulang mingguan dari sejumlah besar strains memunculkan bahaya terhadap pekerja laboratorium.<sup>2,19</sup>

#### **Tes Serologi lain**

Dikarenakan rumitnya pemeriksaan MAT, telah dikembangkan pemeriksaan penyaring yang cepat (*rapid screening tests*) untuk mendeteksi antibodi leptospirosis pada kasus infeksi akut seperti: *Complement fixation test* *Sensitized erythrocyte lysis* *Macroscopic slide agglutination* *Immunofluorescence*, *Patoc slide agglutination test*, *Indirect hemagglutination*, *Dot-ELISA* *IgM dipstick*, *Counterimmunoelectrophoresis*, *ELISA*,

*Microcapsule agglutination*, *Latex agglutination*. Fiksasi komplemen / *Complement fixation (CF)* secara luas telah digunakan namun tidak terstandarisasi. Metode fiksasi komplemen banyak digunakan dalam diagnosis leptospirosis ternak. Metode ini telah digantikan metode ELISA.<sup>21</sup>

Antibodi IgM paling awal terdeteksi 2 hari setelah *onset* sedangkan Ig G paling awal terjadi setelah 7 hari *onset* penyakit. Antibodi IgM leptospira dapat dideteksi dalam minggu pertama sakit yang dapat menjadi dasar diagnosis maupun terapi inisiasi, yang sementara ini dinilai paling efektif. Kadar antibodi yang rendah atau negatif terjadi selama infeksi awal. Deteksi IgM yang dilakukan berulang menunjukkan sensitifitas yang lebih baik dibanding MAT pada spesimen pertama yang diambil pada fase akut penyakit.<sup>22</sup>

Paling banyak yang tersedia adalah kit metode ELISA yang menggunakan strain non-pathogenic *L.biflexa patoc 1* sebagai antigen. Kekurangan tes ini adalah serovarian yang infeksiif tidak dapat dinilai. Tes ini lebih sensitif dibanding MAT namun kurang spesifik.<sup>2</sup>

Infeksi akut diyakini dari peningkatan titer pemeriksaan tunggal pada febris akut. Kekuatan konfirmasi diagnostik ini tergantung pada latar belakang paparan dan seroprevalensi. CDC menetapkan peningkatan titer > 200 dengan klinis yang sesuai sebagai diduga (*probable*) leptospirosis. Peningkatan titer ini lebih sesuai untuk individu dengan tanpa riwayat paparan. Pada daerah endemis peningkatan titer > 800 dengan klinis sesuai umumnya diindikasikan sebagai leptospirosis. Kenaikan titer sama atau lebih dari 1600 diyakini sebagai leptospirosis.<sup>2,12</sup>

Pemeriksaan IgM-specific dot-ELISA telah dikembangkan, dimana antigen polyvalen leptospira dilabelkan (*dotted*) pada *nitrocellulosa filter disks* dalam sumur mikrotiter (penggunaan volume reagen yang lebih kecil). Modifikasi lebih lanjut adalah pendeteksian IgG and IgA. IgM dot-ELISA dalam bentuk dipstick dikembangkan dengan sensitifitas yang sama dengan

mikrotiter plate, selanjutnya penggunaan dipstik ini menjadi lebih meluas. Uji immunoblot menggunakan *colloidal gold conjugate* telah dikembangkan, dengan kecepatan pemeriksaan hanya 30 menit.<sup>2,23</sup>

Sejumlah metode yang menggunakan eritrosit yang disensitisasi telah diperkenalkan. Ekstraksi substansi eritrosit yang tersensitisasi memelopori perkembangan pemeriksaan hemolitik yang memerlukan komplemen dan pemeriksaan hemaglutinasi. Uji ini mendeteksi antibodi IgM maupun IgG. *Indirect hemagglutination assay* (IHA) yang dikembangkan CDC memperlihatkan sensitifitas dan spesifisitas sebesar 92% dan 95% dibandingkan MAT. Sensitifitas dan spesifisitas tergantung pada dua faktor yakni prevalensi penyakit dan kriteria klinik yang digunakan untuk menseleksi populasi yang diuji.<sup>19</sup>

Tes aglutinasi mikrokapsul yang menggunakan polimer sintesis yang dilabelkan eritrosit telah diteliti secara luas. Metode ini dilaporkan memiliki sensitifitas yang lebih baik dibanding salah satu MAT atau IgM-ELISA pada awal fase akut, tetapi gagal dalam mendeteksi infeksi yang disebabkan oleh beberapa serovarian. Keuntungan dari metode aglutinasi langsung ini adalah dapat diterapkan tanpa modifikasi serum dari spesies binatang lain.<sup>19</sup>

Dalam suatu penelitian perbandingan sensitifitas beberapa tes serologi terhadap IgM yang dilakukan Mary, menunjukkan tidak lebih dari 20% terdeteksi pada hari 3, dan mendekati 100% terdeteksi pada hari ke 10-12. Secara bertahap uji sensitifitas menunjukkan penurunan (gambar 1).<sup>24</sup>

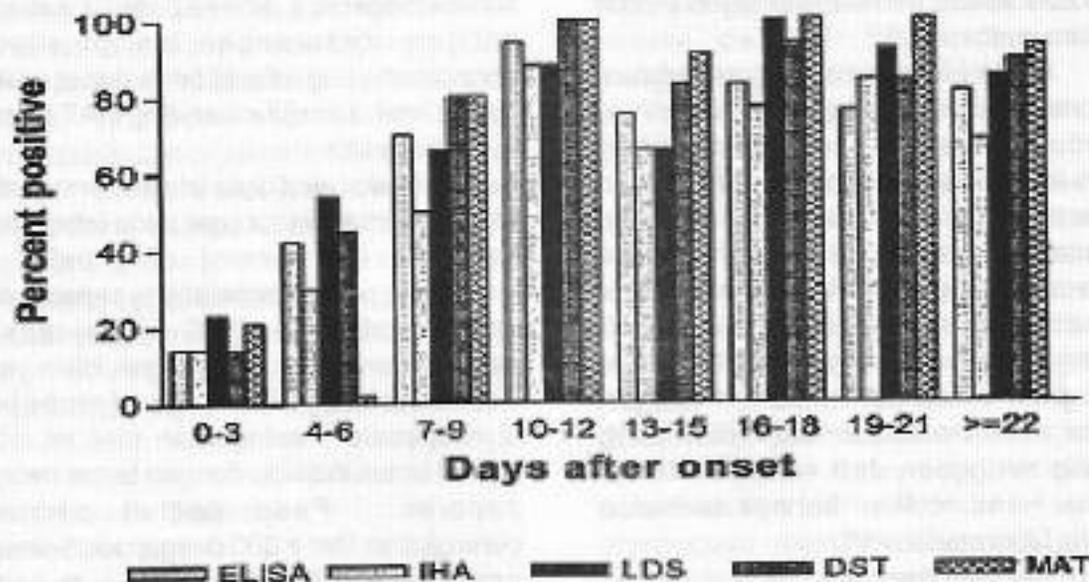


FIG. 1. Effect of specimen timing on the sensitivity of serologic assays for diagnosis of acute leptospirosis.

Gambar 1. Sensitifitas beberapa uji serologi (ELISA, IHA, LDS, DST dan MAT) pada leptospirosis akut

Teknik lain yang diterapkan untuk deteksi antibodi leptospira adalah *immunofluorescence*, *RIA*, *counterimmuno-electrophoresis*, dan *thin-layer immunoassay*. Metode-metode ini tidak digunakan secara luas.<sup>2,19</sup>

#### Diagnosis Molekuler

DNA Leptospira telah dideteksi pada spesimen klinik dengan *dot-blotting* dan hibridisasi in-situ. Sensitivitas *probes* <sup>32</sup>*subP-labeled* yang digunakan kira-kira sebesar 10<sup>3</sup> sub leptospira/ml, terlampaui rendah bila dibanding sensitivitas PCR. Selanjutnya metode ini tidak digunakan secara luas untuk diagnosis karena keberadaan PCR.<sup>2,19</sup>

Beberapa pasang primer untuk pendeteksian melalui PCR didasarkan atas *specific gene targets*, yang terbanyak 16S atau gen rRNA dan *repetitive gene*. Metode ini terbukti memperkuat DNA leptospira dari spesimen manusia atau hewan dan telah diterapkan secara luas untuk keperluan klinis. Metode ini lebih sensitif dibanding kultur.<sup>2,19</sup>

Dalam suatu penelitian perbandingan, kultur dan PCR masing-masing 48 % dan 62 % positif namun pemeriksaan positif serologi 97%, meskipun PCR positif pada dua pasien yang meninggal sebelum serokonversi. Pada penelitian itu didapatkan pula 18% positif menggunakan PCR pada seronegatif fase akut.<sup>19</sup>

Keterbatasan PCR untuk keperluan diagnosis adalah ketidamampuannya untuk mendeteksi serovarian yang menginfeksi. Kelemahan ini tidak bermakna dalam pengelolaan pasien, namun bernilai untuk kepentingan epidemiologi. Strategi yang dikembangkan untuk permasalahan ini termasuk *restriction endonuclease digestion*, *direct sequencing of amplicons*, dan analisa konfirmasi rantai tunggal (*single-strand conformation analysis/SSCP*). Genome spesies leptospira dapat dibedakan melalui PCR dengan elektroforesis pada *non-denaturing polyacrylamide gels*, yang diikuti pengecatan *silver* tanpa penambahan tahap purifikasi dan denaturasi.<sup>2,19</sup>

PCR dapat digunakan untuk membedakan serovarian patogen terhadap non patogen. Pemeriksaan PCR *fluorescent-probe 5' exonuclease* terbukti dapat mendeteksi secara cepat leptospira patogen.<sup>2,19</sup>

#### Molecular typing

Kesulitan dalam mengidentifikasi dan menentukan sub tipe leptospira menghendaki dikembangkannya metode molekuler. Metode yang digunakan adalah digesti kromosom DNA dengan restriksi endonuklease (*restriction endonucleases/REA*), restriksi rantai panjang polimorfi (*restriction fragment length polymorphism/ RFLP*), *ribotyping*, *pulsed field gel electrophoresis (PFGE)*, dan sejumlah pendekatan lain yang didasarkan pada PCR.<sup>2,19</sup>

Metode REA telah diteliti secara luas. Perbedaan genotif dari serovarian hardjo telah ditunjukkan. Isolat dari sapi telah dibedakan (genotif hardjobovis) menjadi sub tipe A, B dan C.<sup>2,19</sup>

Metode *ribotyping* telah menunjukkan hubungan yang baik pada klasifikasi filogenetik leptospira menjadi 11 genom species. Penggunaan EcoRI untuk digesti dan 16S dan 23Sr RNA dari *Escherichia Coli* sebagai *probe* telah dilakukan.<sup>2,19</sup>

PFGE telah terbukti berguna dalam menggambarkan serovarian leptospira. *Leptospira interrogans* memberikan pola unik untuk serovarian yang berbeda. Meskipun terdapat beberapa serovarian yang sulit dibedakan, PFGE masih menjadi standar *defacto* penggambaran molekuler isolat leptospira.<sup>2,19</sup>

Sebuah faktor yang membatasi dalam semua metode analisa kromosom DNA adalah diperlukannya jumlah yang besar DNA murni. Upaya mengatasi masalah ini ditempuh analisa seksi amplifikasi PCR dari DNA leptospira dengan menggunakan sidik jari DNA (*DNA fingerprinting*) yang memakai arbitrari primer yang telah dipelajari secara luas, dimana menggunakan primer dan kondisi yang berbeda. Namun reproduibilitasnya sukar untuk tercapai dan tanpa standarisasi

absolut prosedur percobaan. Penampilannya dipengaruhi secara bermakna oleh primer yang digunakan, kuantitas dan kualitas cetakan DNA dan kondisi elektroforesis.<sup>2,19</sup>

### Kesimpulan

Dari paparan pembahasan dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. *Leptospira* memiliki pembagian serogroup maupun serovarian yang sangat luas.
2. Penetapan diagnosis laboratoris dapat ditetapkan melalui pemeriksaan mikroskopis secara langsung, kultur, serologi, dan analisa molekular.
3. Pemeriksaan secara langsung menggunakan mikroskop medan gelap memiliki sensitifitas yang rendah dan memiliki positif maupun negatif palsu yang besar.
4. Pemeriksaan kultur tidak dapat digunakan untuk konfirmasi diagnostik infeksi akut.
5. Metode MAT merupakan standar pemeriksaan melalui deteksi antibodi, pelaksanaan sangat rumit dan tidak semua laboratorium menyediakannya.
6. Pemeriksaan deteksi antibodi selain MAT dikembangkan untuk deteksi leptospirosis fase akut.
7. Metode analisa DNA maupun molekular memiliki sensitifitas lebih baik namun perlu pengembangan dalam spesifisitas.
8. Sensitifitas maupun sensitifitas uji diagnostik leptospirosis untuk tiap-tiap metode bergantung pada onset klinis, waktu pengambilan sampel dan seroprevalensi.

### Daftar Pustaka

1. Peter, H., 1998, *Leptospirosis*. Harrison's principle of internal medicine, 14 th., Vol 1 : 1036-38
2. Levvet, 2001, *Leptospirosis*. Clinical Microbiological Review, 14(2) 296-326
3. Chin, J., 2000, Control of Communicable Disease Manual (17<sup>th</sup> ed.), Washington D.C.

4. Tappero JW, Ashford DA, Perkins BA., 2000, *Leptospira species (leptospirosis)*, In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 5th edn. Philadelphia:Churchill Livingstone;. p. 2495-501.
5. Angela P, Brandão AP, Camargo ED, da Silva ED, Marcos V, Silva MV, et al., *Macroscopic Agglutination Test for Rapid Diagnosis of Human Leptospirosis*, 1998, J. Clin. Microbiol.;36:3138-42,
6. Effler PV, Domen HY, Bragg SL, Aye T, Sasaki DM, 2000, *Evaluation of the Indirect Hemagglutination Assay for Diagnosis of Acute Leptospirosis in Hawaii*. J Clin Microbiol;38:1081-4.
7. O'Keefe JS., 2002, *A brief review on the laboratory diagnosis of leptospirosis*. N Z Vet J 50:9-13,
8. Gasem M.H., 2002, *Gambara Klinik dan Diagnostik Leptospirosis pada manusia*. Kumpulan Makalah Simposium Leptospirosis, Semarang 3 Agustus 2002
9. Shah I, Warke S, Deshmukh CT, Kamat JR., 1999, *Leptospirosis - an under-diagnosed clinical condition*. J Postgrad Med;45:93-4
10. Everard, C., Bennet, S., Edward, C., 1992, *An Investigation of some risk factor for severe Lepstospirosis on Barbado*. Am J Trpo Med Hyg, 95 : 13-22
11. Bovet, P., Yersin, C., Merien, F., C.E., dan Perolat, P., 1999, *Factor associated with clinical leptospirosis: a population based control study in Seychelles ( Indian Ocean)*, In. Epid. Ass 28, 583-90
12. Centers for Disease Control and Prevention, 1994, *Summary of notifiable diseases, United States*, Morb Mortal Wkly Rep. 1994;43(53):1-80.
13. Thorney, C.N., Baker, B.G., Weistein, P., Maas, E.W., 2002, *Changing epidemiology of human leptospirosis in NewZaeland*, *Epidemiol. Infect*, 128(1), 29-36)

14. Child, J., Brian, S., Swarts, S., 1992, *Risk Factor Associated with antibodies to leptospires In inner-city Resident of Baltimore: A Protective Role for cats.* Am J Publ Health, 82 : 597-9
15. Simanjutak, G., 1997 *Leptospirosis Epidemiologi dan Penanggulanganny.* Makalah Pertemuan Ilmiah Penanggulangan Leptosiprosis, RSCM Jakarta
16. Widarso, H.S., Purba, W., 2002, *Kebijaksanaan Departemen Kesehatan dalam Penanggulangan Leptospirosis di Indonesia.* Kumpulan Makalah Simposium Leptospirosis, Semarang 3 Agustus 2002.
17. Turner L H., 1970, *Leptospirosis III, Maintenance, isolation and demonstration of leptospires.* Trans R Soc Trop Med Hyg.;64:623-646
18. Kramer K J, Pang L W, Minette H P, Perrone J B., 1994, *Evaluation of the quantitative buffy coat analysis (QBC) system for the detection of leptosira in human blood.* Southeast Asian J Trop Med Public Health.;25:788-789.
19. Ahmad SN, Shah S, H Ahmad FM, 2005, *Laboratory diagnosis of leptospirosis.* Journal of Postgraduate Medicine Vol; 51, 3 : 195-200
20. Arimitsu Y, Kmety E, Ananyina Y, Baranton G, Ferguson IR, Smythe L, et al., 1994, *Evaluation of the one-point microcapsule agglutination test for diagnosis of leptospirosis;*72:395-9.
21. Park K-H, Chang W-H, Lee J-S, Choi K-W, Park K-H, Oh H-B., 1986, *Diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assay.* J Korea Soc Microbiol.;21:181-189.
22. Winslow W E, Merry D J, Pirc M L, Devine P L., 1997, *Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection.* J Clin Microbiol.;35:1938-1942
23. Cumberland PC, Everard CO, Levett PN., 1999, *Assessment of the efficacy of the IgM enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis.* Am J Trop Med Hyg;61:731-4
24. Mary D. Bajani, David A. Ashford, Sandra L. Bragg, Christopher W. Woods, Tin Aye, Richard A. Splegel, Brian D. Plikaytis, Bradley A. Perkins, Maureen Phelan, Paul N. Levett, and Robbin S. Weyant, 2003, *Evaluation of Four Commercially Available Rapid Serologic Tests for Diagnosis of Leptospirosis.* J. Clinical Microbiology Vol 41, 2 : 803-809