

Optimasi uji duplex real-time PCR untuk deteksi *Corynebacterium Diphtheriae* Potensial Toksigenik dan penerapan pada spesimen usap tenggorok pasien tersangka difteri = Optimization of duplex real-time PCR assay for detection of potentially Toxigenic *Corynebacterium Diphtheriae* and application using throat swab of suspected diphtheria patient.

Luh Inta Prilandari, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20503688&lokasi=lokal>

Abstrak

Latar belakang: Difteri merupakan penyakit infeksi bakteri yang diperantarai oleh toksin. *Corynebacterium diphtheriae* adalah penyebab tersering difteri. Diagnostik laboratorium harus dilakukan dengan cepat untuk menunjang diagnosis klinis difteri. Pemeriksaan mikroskopik tidak direkomendasikan karena tidak spesifik, kultur dan uji toksin yang merupakan uji baku emas cukup memakan waktu, membutuhkan keterampilan dan pengalaman serta hanya dilakukan di laboratorium rujukan. PCR merupakan metode pemeriksaan yang cepat, sensitif dan spesifik. Duplex real-time PCR dapat mendeteksi bakteri penyebab tersering dan gen pengkode toksin secara simultan. Tujuan penelitian: Melakukan optimasi uji duplex real time PCR untuk deteksi *C. diphtheriae* potensial toksigenik dan menerapkannya pada spesimen usap tenggorok pasien tersangka difteri.

Metode: Duplex real-time PCR menggunakan dua pasang primer dan probe dengan target gen *rpoB* *C. diphtheriae* dan toksin difteri subunit A Tox. Parameter yang dioptimasi adalah suhu penempelan, konsentrasi masing-masing primer dan probe, inhibitor, reaksi silang dengan patogen lain dan ambang batas deteksi uji. Kemudian uji diaplikasikan pada spesimen usap tenggorok pasien tersangka difteri yang dirawat di RSPI Sulianti Saroso pada periode 2018-2019. Sebagai perbandingan dilakukan uji Elek untuk konfirmasi toksigenitas dan analisa data klinis pasien.

Hasil: Kondisi optimal uji didapat pada suhu penempelan 55°C, konsentrasi primer Cd 0,4 M, primer Tox 0,6 M, probe Cd 0,5 M dan probe Tox 0,625 M, volume elusi ekstraksi DNA 50 L, volume cetakan DNA 5 L dan ambang batas deteksi 2 CFU/ml. Uji tidak bereaksi silang dengan mikroorganisme lain yang dicobakan. Dari 89 sampel, proporsi positif *C. diphtheriae* potensial toksigenik dengan uji duplex real-time PCR adalah 21,3%, sedangkan proporsi positif *C. diphtheriae* toksigenik menggunakan uji baku emas adalah 11,2%.

Kesimpulan: Duplex real time PCR untuk deteksi *C. diphtheriae* potensial toksigenik telah dioptimasi dan diaplikasikan pada pasien tersangka difteri. Diharapkan uji ini dapat meningkatkan diagnosis laboratorium kasus difteri.

.....Background: Diphtheria is toxin-mediated bacterial infection. The most common etiology is *Corynebacterium diphtheriae*. Laboratory diagnostic should be done immediately to support clinical diagnosis. Microscopic examination is not recommended, culture followed by toxin test is considered gold standard but time-consuming, requires experience and is only done in referral laboratory. PCR is fast, sensitive and specific. Duplex real-time PCR can detect bacteria and toxin-encoding gene simultaneously.

Objective: Optimizing duplex real-time PCR assay for detection of potentially toxigenic *C.diphtheriae* and applying the assay on throat swab of suspected diphtheria patient.

Method: Two pairs of primers and specific probe targeting *rpoB* gene of *C.diphtheriae* and A-subunit of diphtheria toxin gene were used in this study. Parameters including annealing temperature, concentration of primers and probes, inhibitors, cross reaction and detection limit were being optimized to receive optimal condition. The optimized assay was applied on throat swab of suspected diphtheria patient in Sulianti Saroso Infectious Disease Hospital at 2018-2019. Elek toxinogenicity test was used for comparison and clinical data of the patient were analyzed.

Result: The optimum condition for duplex real-time PCR was received upon the annealing temperature 60°C, concentration of Cd primer 0,4 M, Tox primer 0,6 M, Cd probe 0,5 M, Tox probe 0,625 M, DNA elution volume 50 L, DNA template volume 5 L and detection limit 2 CFU/ml. There was no cross reaction found with other tested microorganisms. Of 89 samples, proportion of potentially toxigenic *C.diphtheriae* was 21,3% and proportion of toxigenic *C.diphtheriae* confirmed by gold standard was 11,2%.

Conclusion: Duplex real time PCR has been optimized for detection of potentially toxigenic *C.diphtheriae*. This method can be used to detect *C.diphtheriae* and Tox simultaneously and increase supporting diagnosis.