

Perbandingan uji diagnostik *GeneXpert MTB/RIF* untuk mendeteksi resistensi rifampicin *Mycobacterium tuberculosis* pada pasien Tb paru di RSUP dr. Moh. Hoesin Palembang

Erizka Rivani¹, Tia Sabrina^{1*}, Venny Patricia²

¹Departemen Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya,

²Departemen Mikrobiologi Klinik/RSUP dr. Moh Hoesin Palembang

Abstrak

Tuberkulosis (TB) masih menjadi masalah global. TB menduduki peringkat kedua penyebab kematian dari seluruh penyakit infeksi di dunia. Kelemahan dalam mendiagnosis dan pengobatan cepat selain dapat berdampak pada pasien, juga terhadap perkembangan resistensi sekunder dan penyebaran dari penyakit ini. Sebagai alternatif, teknik molekuler diagnostik dapat mempercepat TAT dan meningkatkan sensitifitas dan spesifisitas. Tes GeneXpert MTB/RIF merupakan mesin otomatis dengan penggunaan mudah dan cepat yang menggunakan prinsip *nested real-time* PCR dan teknologi molekuler untuk mendeteksi *M. tuberculosis* (MTB) dan resistensi obat rifampicin (RIF). Penelitian ini merupakan studi observasional analitik di laboratorium dengan pendekatan *purposive sampling*. Penilaian hasil sensitivitas dan spesifisitas GE memiliki nilai 97% dan 93% terhadap mikroskopis BTA; Sensitivitas dan spesifisitas GE memiliki nilai 97% dan 62% terhadap kultur MTBC; Persentase deteksi Rifampisin resisten pada GE sebesar 167(31%) lebih tinggi dari pada kultur MTBC sebesar 103(21.7%); Ada 3 sampel dari 5 sampel yang hasil BTA positif dan GE negatif yang memiliki gen hsp65 yang menunjukkan adanya bakteri MOTT

Kata kunci: Sensitifitas, Spesitifitas, GeneXpert, MOTT

Abstract

Comparison of the MTB/RIF GeneXpert diagnostic test to detect resistance rifampicin *Mycobacterium tuberculosis* in patients with pulmonary tuberculosis at RSUP dr. Moh. Hoesin Palembang. Tuberculosis (TB) is still a global problem. TB is ranked second cause of death from all infectious diseases in the world. Weaknesses for diagnosing and rapid treatment can also affect the patient, as well as the development of secondary resistance and the spread of the disease. Alternatively, molecular diagnostic techniques can accelerate TAT and increase sensitivity and specificity. The GeneXpert MTB / RIF test is an easy-to-use, automated machine that uses the real-time PCR and nested molecular nested principles to detect *M. tuberculosis* (MTB) and rifampicin (RIF) drug resistance. **Method:** This researches is an observational analytic study in laboratory with purposive sampling approach. **Results:** The sensitivity and specificity of GE had 97% and 93% of microscopic smear; The sensitivity and specificity of GE have a value of 97% and 62% of the culture of MTBC; The percentage of Rifampicin-resistant detection at GE was 167 (31%) higher than in the MTBC culture of 103 (21.7%); There were 3 samples from 5 samples with positive smear and negative GE which had a hsp65 gene that showed the presence of MOTT bacteria

Keywords: Sensitivity, Specificity, GeneXpert, MOTT

1. Pendahuluan

Tuberkulosis (TB) masih menjadi masalah global. TB menduduki peringkat kedua penyebab kematian dari seluruh penyakit infeksi di dunia. Menurut data pada tahun 2013 ada sekitar 8,6 juta kasus TB baru dan 1,5 juta kematian yang disebabkan oleh TB. Pada tahun 2012, ada sekitar 3,6% kasus TB baru dan 20,2% kasus TB MDR (*Multi Drugs Resistant Tuberculosis*). Selain itu sekitar 170.000 kematian disebabkan oleh TB MDR dan telah menjadi TB XDR (*Extensively Drug Resistant Tuberculosis*) yang dilaporkan oleh 105 negara di tahun 2014.¹

Kelemahan dalam mendiagnosis dan pengobatan cepat selain dapat berdampak pada pasien, juga terhadap perkembangan resistensi sekunder dan penyebaran dari penyakit ini. Dalam situasi ini tidak hanya deteksi cepat kasus TB tetapi juga mengetahui lebih awal status MDR adalah faktor yang sangat penting. Diagnosis konvensional dari TB paru memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang rendah dibandingkan kultur. Kultur identifikasi *M. tuberculosis* masih menjadi *gold standard* dari diagnosis TB. Bagaimana pun, teknik kultur konvensional tidak dapat memberikan hasil diagnosa yang cepat dan memerlukan prosedur dan fasilitas laboratorium BSL II/III yang tidak dapat dipenuhi oleh semua pelayanan kesehatan. Sebagai alternatif, teknik molekuler diagnostik dapat mempercepat TAT dan meningkatkan sensitifitas dan spesifisitas.²

Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) telah meresmikan tes GeneXpert MTB/RIF untuk program TB nasional di negara berkembang. Tes GeneXpert MTB/RIF merupakan mesin otomatis dengan penggunaan mudah dan cepat yang menggunakan prinsip *nested real-time* PCR dan teknologi molekuler untuk mendeteksi *M. tuberculosis* (MTB) dan resistensi obat rifampicin (RIF). Hasil pemeriksaan dapat dilakukan dalam waktu 2 jam. Keunggulan dari tes GeneXpert MTB/RIF mengurangi kontaminasi silang, mengurangi penggunaan

fasilitas *Biosafety* dan memiliki sensitifitas yang tinggi pada preparat BTA yang negatif.

Pada penggunaan untuk sampel ekstra paru sangat membantu untuk menemukan BTA karena jumlah bakteri didalam spesimen dalam konsentrasi yang rendah. Selain itu kendala yang dihadapi sejak dahulu hasil preparat BTA kebanyakan selalu negatif dan harus menggunakan prosedur invasif dan membutuhkan volume sampel yang cukup banyak agar mendapat hasil preparat BTA yang sesuai.^{2,3} Selain kelebihan, adapun kekurangan dari uji GeneXpert ialah memiliki ambang batas tertentu dan waktu proses amplifikasi yang singkat sekitar 1,5 jam sehingga ada beberapa sampel tertentu pada preparat dinyatakan positif BTA tetapi dengan GeneXpert dinyatakan negatif. Dalam penelitian ini, peneliti akan mencoba mengkonfirmasi sampel yang dinyatakan negatif oleh GeneXpert menggunakan *real time* PCR untuk mengetahui apakah sampel yang dinyatakan negatif pada GeneXpert merupakan termasuk jenis bakteri MOTT (*Mycobacterium Other Than Tuberculosis*) atau memang benar negatif MTBC (*Mycobacterium tuberculosis*) dan mengevaluasi spesifisitas dan sensitivitas kerja GeneXpert dibandingkan dengan pewarnaan BTA dan hasil kultur MTBC di RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang.

2. Metode

Penelitian ini merupakan studi observasional analitik di laboratorium dengan pendekatan *purposive sampling*. Tahapan penelitian adalah pengumpulan sampel, isolasi DNA sputum, menganalisis dan membandingkan spesifisitas dan sensitifitas metode preparat BTA, GeneXpert, PCR MTB dan NTM dan kultur pada pasien TB di RSMH.

2.1 Preparat Basil Tahan Asam (BTA)

Pewarnaan Ziehl-Neelsen untuk pembacaan mikroskopis mengikuti prosedur standar dari WHO.^{4,5}

2.2 Xpert MTB/RIF

Pengolahan sampel sputum. Disinfeksi dilakukan pada area kerja. Bukalah penutup pot dahak, tambahkan reagen dengan perbandingan satu bagian volume sampel dan dua bagian volume reagen. Kocok dengan kuat 10-20 kali sampai homogen. Biarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Kocok kembali dengan kuat 10-20 kali, Diamkan selama 5 menit pada suhu kamar sampai dahak benar-benar homogen.

Persiapan Cartridge. Isap sampel dengan menggunakan pipet steril dari kit uji sampai menicous diatas tanda minimum (> 2 ml), Buka penutup cartridge, Masukkan contoh uji yang telah diproses seperti diatas kedalam lubang cartridge Xpert MTB/RIF,

Tes GeneXpert. Setelah masuk ke aplikasi genexpert DX sistem, scan barcode cartride sampel, ketik nama pasien dan identitas contoh uji pastikan identitas benar. dipakai kedalam wadah limbah infeksius. Apabila ada sampel sputum yang menyatakan dipreparat positif, sedangkan pada tes geneXpert dinyatakan negatif akan di konfirmasi ulang dengan uji realtime PCR untuk mengetahui apakah sampel tersebut memang benar positif MTBC (*Mycobacterium tuberculosis*) atau MOTT (*Mycobacterium Other Than tuberculosis*).

Isolasi DNA Sampel Sputum. Isolasi dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi DNA *chelex-100* dengan menggunakan *Phospate Buffer Saline (PBS)* pH 7,4; safonin 0,5% dalam PBS; an *chelx* 20% dalam ddH₂O pH 10,5

PCR Gen IS6110 dan Gen hsp65. Ada dua gen yang akan diidentifikasi dengan PCR untuk mendeteksi gen IS6110⁶ yang menyatakan positif MTBC dan gen hsp65⁷ yang menyatakan positif MOTT yang tabel dapat dilihat pada lampiran (Tabel 1).

PCR gen IS6110 dilakukan dengan rincian : denaturasi 94°C, 2 menit; diikuti dengan 35 siklus denaturasi 95°C selama 1 menit; anneling 62°C, 45 detik; ekstensi 72°C selama 1 menit dan ekstensi akhir 72°C selama 10 menit. Sedangkan PCR untuk gen Hsp65 dilakukan dengan rincian : denaturasi 94°C, 2 menit; diikuti dengan 35 siklus denaturasi 95°C selama 1 menit; anneling 53°C, 45 detik; ekstensi 72°C selama 1 menit dan ekstensi akhir 72°C selama 10 menit. Volume total reaksi PCR ini adalah 25 µl terdiri atas: 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 0.2 mM dNTPs, 1U enzim taq polymerase, 5 µl DNA template dan ddH₂O.

3. Hasil

Analisis data GeneXpert diambil selama ± 3 tahun yaitu dari tahun 2015-2017 dengan total sebanyak 1.103 sampel, sedangkan sampel GeneXpert yang dikonfirmasi menggunakan uji kultur sebanyak 162 sampel. Data perbandingan uji GeneXpert dengan kedua metode lainnya dapat dilihat pada tabel 2-5.

Tabel 1. Urutan Primer Gen hsp65 dan IS6110

Gen target	Primer set	Untaian nukleotida
Primer PCR <i>IS6110</i>	PR1 (forward)	5'-CCT GCG AGC GTA GGC GTC GGT-3
	PR2 (reverse)	5'-CTC CTC CAG CCC CCC CTT CCC-3
<i>Hsp65</i>	PR3 (forward)	5'-ATC GCC AAG GAG ATC GAG CT-3'
	PR4 (reverse)	5'-AAG GTG CCG CGG ATC TTG TT-3'

Tabel 2. Perbandingan Hasil Uji GeneXpert Terhadap Mikroskopis BTA

GeneXpert (GE)	Mikroskopis BTA		Total
	Positif (+)	Negatif (-)	
Positif (+)	632(96.9%)	32(7.0%)	664
Negatif (-)	20(3.0%)	419(92.9%)	439
Total	652	451	1103

Tabel 3. Sensitifitas dan Spesifitas Uji GeneXpert Terhadap Mikroskopis BTA

Variabel	Total
Sensitivitas	97%
Spesifitas	93%
NPV	95%
PPV	95%
Keakuratan	95%

Keterangan : NPV: *Negative Predictive Value*; PPV: *Positive Predictive Value*

Tabel 4. Perbandingan Hasil Uji GeneXpert Terhadap Kultur MTBC

GeneXpert (GE)	Kultur MTBC		Total
	Positif (+)	Negatif (-)	
Positif (+)	143(97.2%)	423(36%)	566
Negatif (-)	4(2.7%)	752(64%)	756
Total	147	1175	1322

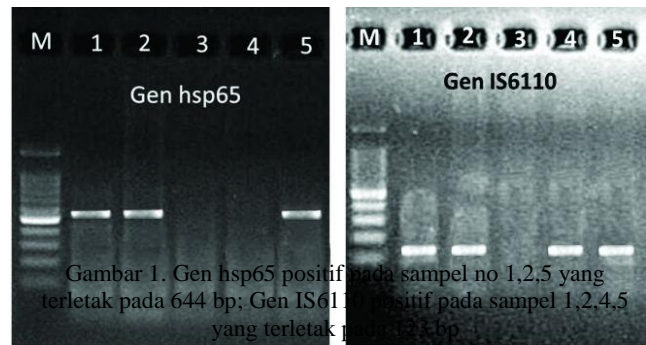
Tabel 5. Sensitifitas dan Spesifitas Uji GeneXpert Terhadap Kultur MTBC

Variabel	Total
Sensitivitas	97%
Spesifitas	62%
NPV	99%
PPV	25%
Keakuratan	66%

Keterangan : NPV: *Negative Predictive Value*; PPV: *Positive Predictive Value*

Tabel 6. Deteksi Rifampicin Resisten MTBC Dengan Uji Gen Expert dan Kultur & Resistensi MTBC

Metode	Rif Sensitif (SR)	Rif Resisten (RR)
GE	370	167(31%)
C & R MTBC	370	103(21.7%)



4. Pembahasan

Peningkatan kasus TB secara global merupakan sorotan bagi masing-masing negara didunia karena TB menduduki peringkat kedua penyebab kematian dari seluruh penyakit infeksi di dunia. Menurut data pada tahun 2013 ada sekitar 8,6 juta kasus TB baru dan 1,5 juta kematian yang disebabkan oleh TB. Pada tahun 2012, ada sekitar 3,6% kasus TB baru dan 20,2% kasus TB MDR (*Multi Drugs Resistant Tuberculosis*). Selain itu sekitar 170.000 kematian disebabkan oleh TB MDR dan telah menjadi TB XDR (*Extensively Drug Resistant Tuberculosis*) yang dilaporkan oleh 105 negara di tahun 2014.¹

Tes GeneXpert MTB/RIF merupakan mesin otomatis dengan penggunaan mudah dan cepat yang menggunakan prinsip *nested real-time* PCR dan teknologi molekuler untuk mendeteksi *M. tuberculosis* (MTB) dan resistensi obat rifampicin (RIF). Pada penelitian ini perbandingan antara uji GeneXpert dan mikroskopis BTA, hasil GE positif yang sejalan dengan hasil BTA sebanyak 632(96.9%) sampel, hasil GE yang sejalan dengan hasil BTA yang negatif sebanyak 419(92.9%) sampel, hasil GE positif dan BTA negatif sebanyak 32(7.0%) sampel dan terakhir hasil GE negatif dan BTA positif sebanyak 20(3.0%) sampel. Dari tabel tersebut didapatkan sensitivitas GE 97% dan Spesifitas 73%. Hal ini sejalan dengan penelitian Sharma⁸ dimana sensitifitas dan spesifitas GE lebih tinggi yaitu sebesar 95.7%(430/449) dan 99.3%(984/990).

Kultur MTBC masih menjadi *gold standard* dari diagnosis TB. Bagaimana pun,

teknik kultur konvensional tidak dapat memberikan hasil diagnosa yang cepat dan memerlukan prosedur dan fasilitas laboratorium BSL II/III yang tidak dapat dipenuhi oleh semua pelayanan kesehatan. Pada penelitian ini, perbandingan antara uji GeneXpert dan kultur MTBC, hasil GE positif yang sejalan dengan hasil kultur MTBC sebanyak 143(97.2%) sampel, hasil GE yang sejalan dengan hasil kultur MTBC yang negatif sebanyak 752(64%) sampel, hasil GE positif dan kultur MTBC negatif sebanyak 432(36%) sampel dan terakhir hasil GE negatif dan kultur MTBC positif sebanyak 4(2.7%) sampel. Dari tabel tersebut didapatkan sensitivitas GE 97% dan Spesifisitas 62%. Sedangkan persentase deteksi Rifampisin resisten pada GE senilai 167(31%) sedangkan pada kultur MTBC hanya 103(21.7%). Hal ini dikarenakan ada banyak faktor yang dapat mempengaruhi misal sampel yang tidak mencukupi sehingga waktu di kultur tidak tumbuh atau pun adanya kontaminasi sehingga tidak dapat di uji resistensinya. Hal ini sejalan dengan penelitian Zeka⁹; Iram¹⁰ dan Sharma⁸ yang menyatakan bahwa GE merupakan metode yang sederhana dan dapat digunakan rutin dengan penggunaan yang praktis. Uji GE tidak kalah sensitif dari kultur MTBC dengan hasil BTA positif.

Hasil GE yang dinyatakan negatif tetapi di preparat BTA positif dikonfirmasi dengan menggunakan gen hsp65 yang merupakan gen pada bakteri MOTT. Dari hasil penelitian sampel yang terduga MOTT ada sebanyak 20 sampel hanya bisa didapatkan sputum nya 5 sampel saja dikarenakan ada pasiennya yang telah meninggal atau tidak bisa dihubungi. Karena keterbatasan waktu penelitian, peneliti hanya mengisolasi sebanyak 5 sampel yang didapat dari 5 sampel tersebut ada 3 sampel yang terdeteksi gen hsp65, 2 sampel dinyatakan negatif. 2 sampel tersebut negatif bisa disebabkan karena sedikitnya sampel atau pun kualitas sputum nya yang tidak baik sehingga tidak terisolasi DNA nya atau pun bukan termasuk ke golongan bakteri MOTT yang menjadi standar

dari gen hsp65. Karena pada gen hsp65 hanya bisa mendeteksi kemungkinan 10 bakteri MOTT yaitu: *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum* dan *M. abscessus*. Perlu penelitian lebih lanjut untuk membuktikan spesies masing-masing dari ke 5 sampel tersebut dan membuktikan obat OAT apa saja yang telah resisten dari sampel tersebut, karena dari salah satu pasien pada sampel tersebut ada yang sudah diobati dengan obat OAT lini ke dua. Pada Gen IS110 dari 5 sampel tersebut didapat 4 sampel yang positif MTBC, berarti diduga pasien tersebut terinfeksi bakteri MTBC dan MOTT. Perlu penelusuran lebih lanjut untuk mengetahui spesifik spesies bakteri tersebut.

5. Kesimpulan

Persentase deteksi Rifampisin resisten pada GE sebesar 167(31%) lebih tinggi dari pada kultur MTBC sebesar 103(21.7%); Ada 3 sampel dari 5 sampel yang hasil BTA positif dan GE negatif yang memiliki gen hsp65 yang menunjukkan adanya bakteri MOTT

Daftar Pustaka

1. Jahan Hosne, Sanya Tahmina J, Zakir H. Habib et al. Diagnostic Evaluation of GeneXpert MTB/RIF Assay for the detection of Rifampicin Resistant *Mycobacterium tuberculosis* among Pulmonary Tuberculosis Patients in Bangladesh. *Journal of Tuberculosis Research*. 2016; 4: 55-60.
2. Shagufta Iram, Asyia Zeena, Shahida Hussain et al. Rapid Diagnosis of Tuberculosis Using Xpert MTB/RIF Assay – Report from a Developing Country. *Journal Medicine Science*. 2015;31 (1): 105-110.
3. Vadwai V, Boehme C, Nabeta P, Shetty A, Alland D, Rodrigue C. Xpert MTB/RIF: a new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis?. *J Clin Microbiol*. 2011;49(7): 2540-2545.

4. Organization WH. The global plan to stop TB 2011–2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis. 2010.
5. Organization WH. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MT. 2011.
6. Amin Iram, Muhammad Idress, Zunaira Awan, *et al.* PCR Could be a Method of Choice for Identification of Both Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis. Biomed Central. 2011, 4: 332.
7. Kim Hong, Sun-Hyun Kim, Tae-Sun Shim *et al.* Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65). J. Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005,55: 1649-1656.
8. Sharma Surendra K, Mikashmi Kohli, Raj Narayan Y, Jigyasa Chaubey, Dinkar Bhasin, Vishnubhatia Sreenivas, Rohini Sharma, Binit K Singh. Evaluating the Diagnostic Accuracy of Xpert MTB/RIF Assay in Pulmonary Tuberculosis. Plos One. 2015.
9. Zeka Arzu N, Sezai Tasbakan and Cengiz Cavusoglu. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF Assay for Rapid Diagnosis of Tuberculosis and Detection of Rifampin Resistance in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens. J. Clin Microbiol. 2011;p. 4138-4141.
10. Iram, Muhammad Idress, Zunaira Awan, *et al.* PCR Could be a Method of Choice for Identification of Both Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis. Biomed Central. 2011.