

Analisis Resiko Kejadian Akut Rekuren Demam Tifoid dan Hubungannya dengan Kadar Protein *Nucleotide Binding Oligomerization Domain 2* (NOD2)

Sri Wahyuni^{1*}, Mochammad Hatta², Firdaus Hamid³, Rosdiana Natzir⁴, Ahyar Ahmad⁵, Burhanuddin Bahar⁶, Ade Rifka Junita², Ressay Dwiyantri⁷, Nur Indah Purnamasari⁸, Muhammad Reza Primaguna⁹, Muhammad Sabir⁷

¹Magister Program of Biomedical Sciences, Graduate School, Universitas Hasanuddin, Makassar

²Molecular Biology and Immunology Laboratory for Infectious Disease, Faculty of Medicine, Universitas Hasanuddin, Makassar

³Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Hasanuddin, Makassar

⁴Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universitas Hasanuddin, Makassar

⁵Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Science, Universitas Hasanuddin, Makassar

⁶Department of Biostatistics and Public Health, Faculty of Public Health, Universitas Hasanuddin, Makassar

⁷Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Tadulako, Palu

⁸Faculty of Medicine, Universitas Haluleo, Kendari, Indonesia

⁹Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Universitas Hasanuddin, Makassar

E-mail: sriwahyuni04091996@gmail.com

Abstract

Typhoid fever is an infectious disease caused by *Salmonella typhi* bacteria and is endemic. The NOD2 gene is one of the host susceptibility genes in people with typhoid fever. NOD2 acts as an intracellular receptor that binds to the muramyl dipeptide ligand derived from bacterial peptidoglycan. The purpose of this study was to determine the levels of NOD2 protein in Acute Recurrent of Typhoid Fever (ARTF), typhoid fever (TF) patients, and healthy people (HP). Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to analyze NOD2 levels. The data analysis used was the student t-test. A significant difference of NOD2 level was found between the ARTF and TF group compared HP group ($p < 0.001$). Then there is a negative correlation between NOD2 levels and widal titer with R^2 coefficient of -0.262 and p value = 0.013. There was a decrease in NOD2 protein expression in patients with TF and ARTF, so it can be concluded that the lower the NOD2 levels, the higher the likelihood of TF and ARTF. Then the negative correlation between NOD2 and widal titer indicates that the higher the widal titer, the lower the NOD2 level results.

Keywords: acute recurrent of typhoid fever, ELIS, typhoid fever

PENDAHULUAN

Demam tifoid merupakan penyakit infeksi sistemik akut yang mengenai sistem retikuloendotelial, kelenjar limfe, saluran cerna, dan kantung empedu (Hatta, dkk., 2007; Hatta, dkk., 2011). Hal ini terutama disebabkan oleh *Salmonella typhi* dan ditularkan melalui jalur fecal-oral (Hatta, dkk., 2009). Di Indonesia penyakit demam tifoid merupakan penyakit yang masih endemik. Demam tifoid menempati urutan kedua dari 10 besar penyakit di Indonesia dengan 81,116 kasus dan menurun pada tahun 2010 dengan 41,081 kasus demam tifoid. Jika demam tifoid tidak diobati secara efektif, angka kematiannya adalah 10-30%. Setelah pemulihan awal, 5% sampai 10% pasien yang diobati dengan antibiotik akan mengalami kekambuhan akut / kambuh demam tifoid (Akut Rekuren Demam Tifoid) setelah pemulihan awal (Grossman, *et al.*, 1995; Hatta, dkk., 2008; Vanessa, dkk., 2015; Alba, dkk., 2016;) ARDT biasanya terjadi sekitar 1 minggu setelah terapi tidak di lanjutkan.

Infeksi yang disebabkan oleh berbagai macam jenis bakteri diantaranya *S. typhi*, *M. leprae*, *M. tuberculosis* sangat berhubungan dengan *host susceptibility* dari penderita itu sendiri (Ogura, *et al.*, 2001; Ferrand, *et al.*, 2019; Hatta, dkk., 2010). Beberapa penelitian membuktikan hubungan gen NOD2 sebagai gen *host susceptibility* dengan penyakit infeksi (Rose, *et al.*, 2005; Dwiyanti, dkk., 2017). NOD2 merupakan salah jenis gen yang menyandi protein NOD2. NOD2 berperan sebagai reseptor intraseluler yang mengikat ligan muramil dipeptida yang berasal dari peptidoglikan bakteri. Stimuli yang berupa ikatan NOD2 dengan muramil dipeptida akan mengaktifkan faktor transkripsi NF κ B dan terjadi induksi sintesis sitokin proinflamasi. Gen NOD2 juga berperan dalam memediasi respon sistem imun alami terutama makrofag dan umumnya menunjukkan pada bagian sitoplasma sehingga dapat menjaga kekebalan host terhadap infeksi bakteri (Rose, *et al.*, 2005; Weiss, *et al.*, 2015; Athman, *et al.*, 2004).

Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa terdapat polimorfisme gen NOD2 sebesar 6,7% dari penderita suspek demam tifoid sehingga bisa di simpulkan bahwa faktor genetik berkaitan dengan penyakit yang terinfeksi bakteri salah satunya bakteri *S.thypi* yang menyebabkan penyakit demam tifoid (Dwiyanti, dkk., 2017; Mukherjee, *et al.*, 2019). Berdasarkan uraian diatas maka dilakukanlah penelitian tentang analisis risiko kejadian akut rekuren demam tifoid (ARDT) dan hubungannya dengan kadar protein NOD2.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel serum penderita ARDT dan DT dan serum orang sehat dari UTD Makassar berdasarkan file dokumen laboratorium bank sampel dan ditentukan kadar soluble protein NOD2 dengan Teknik ELISA. Reagen kit yang dipakai ialah Human NOD2 ELISA Kit; Sandwich ELISA, Catalog No. Cat. No: LS-F68704-1 (Cusabio Inc, USA).

Identifikasi dan Kultur *S.typhi*

Pengumpulan Data sampel pasien suspek ARDT dan DT yaitu: pertama, melakukan pencatatan identitas penderita yang memenuhi kriteria sampel dan memberikan penjelasan lengkap mengenai hal apa yang akan dilakukan pada pasien. Lalu dilakukan anamnesis mengenai lama demam, suhu demam, riwayat penyakit sebelumnya dan pernah diterapi atau tidak sesuai dengan kuesioner yang telah disiapkan. Kemudian pengambilan sampel darah vena sebanyak 9 cc kemudian dibagi kedalam mikrocup sebanyak 1 cc dan kedalam botol transport yang berisi medium Ox Bile Broth 9 ml (Bactec®) sebanyak 8 cc. Kemudian mikrocup yang telah berisi sampel disentrifus untuk mendapatkan serum yang digunakan untuk pemeriksaan serologi Widal tes sedangkan sampel yang

ada didalam botol Bactec di inkubasi selama 4×24 jam pada suhu 37°C (Mcdonal, *et al.*, 1996; Hatta, dkk., 2011; Jamilah, dkk., 2020).

Persiapan Sampel Darah

Diambil secara aseptik sebanyak 8 ml dan dimasukkan ke dalam botol transport yang berisi medium Ox Bile Broth 9 ml (Bactec®), dicampur perlahan-lahan hingga homogen, kemudian di inkubasi selama 4×24 jam pada suhu 37°C . Selanjutnya inokulum diambil sebanyak 1 ml dari inokulasi ke dalam cawan petri yang berisi medium SSA yang telah memadat, lalu di inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C . Koloni bakteri yang diduga *Salmonella typhi* berdasarkan ciri-ciri pertumbuhan koloninya (koloni berwarna hitam), kemudian untuk pemastian maka di inokulasi kembali pada medium TSIA dan dilakukan uji IMViC serta uji gula-gula lalu di inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C . Jika positif *Salmonella typhi* pada kultur maka tampak koloni berwarna hitam yang muncul pada medium TSIA (Hatta, dkk., 2002; Flayhart, *et al.*, 2007).

Cara Kerja ELISA Soluble NOD2

Serum yang didapat dari bank sampel yang diperlukan dikeluarkan dari freezer -80°C dan disimpan dalam es sebelum digunakan. Setiap sampel dilakukan secara duplicate untuk menjamin kebenaran/validitas hasil ELISA. Tahap pertama dilakukan penambahan 100 μL standard, blank dan sampel pada masing-masing well/sumur, kemudian di tutup menggunakan plastik dan dilakukan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C . Isap cairan di setiap well/sumur. Kemudian tambahkan 100 μL biotinylated detection antibodi, lalu dilakukan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C . Isap cairan disetiap well/sumur dan dicuci dengan PBS steril. Proses pencucian ini dilakukan 3 kali secara berturut turut. Kemudian ditambahkan 100 μL cairan Conjugate yang berisi streptavidin HRP kedalam setiap well/sumur dan tutup dengan penutup plastik dan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C . Cairan diisap dan selanjutnya dilakukan pencucian ulang sebanyak 5 kali dengan menggunakan PBS steril. Proses berikutnya ditambahkan 90 μL Substrate Solution yang berisi TMB kedalam setiap well/sumur dan di inkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C . Kemudian di tambahkan 50 μL stop solution dan selanjutnya dibaca dengan menggunakan ELISA Reader 270 (Biomerieux, Perancis) (Hatta, dkk., 2002; Abdoel, *et al.*, 2007).

Cara Kerja Uji Widal

Persiapkan enam buah slide tes widal dan buat lingkaran pada masing-masing slide. Kemudian beri label lingkaran slide “H”, “O”, “A”, “B”, kontrol negatif (-) dan kontrol positif (+). Teteskan satu tetes serum undilusi 20 ul pada empat lingkaran pertama dengan menggunakan pipet pastur steril. Satu tetes serum kontrol positif (+) dan serum kontrol negatif (-) diteteskan pada masing-masing lingkaran kelima dan keenam. Teteskan satu tetes antigen H *Salmonella enterica serotype typhi* (flagellar) pada lingkaran pertama, satu tetes anigen O *Salmonella enterica serotype typhi* (somatik) ditambahkan pada lingkaran kedua. Satu tetes antigen A dan B *Salmonella enterica serotype paratyphi* ditambahkan pada masing-masing lingkaran ketiga dan keempat. Teteskan satu tetes antigen H *Salmonella enterica serotype typhi* (flagellar) pada lingkaran kelima dan keenam. Maka akan didapatkan campuran serum dan antigen. Dengan menggunakan separate applicator stick, serum dan antigen dicampur bersama-sama secara rata dan disebarakan sampai mengisi keseluruhan permukaan lingkaran. Kemudian rotator selama satu menit. Lakukan observasi untuk melihat ada tidaknya aglutinsai makroskopis. Jika dengan pencampuran 20 μl serum dan satu tetes antigen terjadi aglutinasi maka titernya adalah 1:80. Kemudian dilakukan pengenceran dengan pencampuran 10 ul serum dan satu tetes antigen, jika terjadi aglutinasi maka titernya adalah 1:160. Lakukan pengenceran sampai

tidak terjadi aglutinasi lagi. Aglutinasi terakhir dipakai sebagai titer (Hatta, dkk., 2002; Abdoel, *et al.*, 2007; Pastoor, *et al.*, 2007).

Analisa Data

Analisa data kadar soluble protein NOD2 pada Akut rekuren demam tifoid (ARDT) dan DT dibuat dalam bentuk univariat yang disertai dengan penjelasan dan perbedaan kadar kadar soluble protein NOD2 pada Akut rekuren demam tifoid (ARDT) dan DT dengan menggunakan Uji student t test dan tingkat kemaknaan $p < 0,05$ dengan fasilitas komputer dengan program SPSS For Windows Release.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perbandingan Hasil Kadar Protein NOD2 pada Penderita Akut Rekuren Demam Tifoid (ARDT), Demam Tifoid (DT) dan Orang Sehat (OS)

Pada tabel 1 terlihat hasil kadar protein NOD2 ARDT dan DT dan orang sehat (kontrol negatif) dengan menggunakan uji *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) dengan satuan ng/mL. Jumlah sampel yang digunakan pada ARDT, DT dan orang sehat masing-masing sebanyak 30 sampel yang diambil secara acak pada bank sampel Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi, FK UNHAS; dimana sampel serum ini dikoleksi dari Unit Transfusi darah (UTD) Makassar.

Kadar protein serum penderita ARDT, DT dan OS ditentukan dengan menggunakan Teknik *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) dengan satuan ng/mL. Mean \pm standar deviasi kadar protein NOD2 pada sampel ARDT ditemukan sebesar $2.95 \pm 0,60$ ng/mL. Sedangkan mean \pm standar deviasi kadar protein NOD2 pada sampel DT ditemukan sebesar 4.79 ± 0.55 ng/mL. Nilai kadar protein NOD2 pada ARDT lebih rendah dibandingkan kadar protein NOD2 pada DT. Perbedaan nilai kadar protein NOD2 signifikan secara statistik antara sampel ARDT dan DT yaitu $p < 0.001$. Sebagai kontrol negatif atau pembanding yaitu orang sehat dengan mean \pm standar deviasi kadar protein NOD2 sebesar 6.91 ± 0.62 ng/mL. Bila dibandingkan nilai kadar protein NOD2 antara sampel ARDT dan DT ditemukan perbedaan signifikan yaitu $p < 0.001$; kemudian antara sampel ARDT dan OS juga ditemukan perbedaan yang signifikan yaitu $p < 0.001$; demikian juga antara sampel DT dan OS juga ditemukan perbedaan signifikan yaitu $p < 0.001$.

Table 1. Perbandingan Hasil Kadar Protein NOD2 pada ARDT, DT dan Orang Sehat

Group	Kadar NOD2 Mean \pm SD	Sig.
Akut Rekuren Demam Tifoid (ARDT)	2,95 \pm 0,60 ng/mL	
Demam Tifoid (DT)	4,79 \pm 0,55 ng /mL	
Orang sehat (OS)	6,91 \pm 0,62 ng /mL	

Berdasarkan hasil penelitian dapat dikatakan bahwa ditemukan nilai kadar protein NOD2 berbeda signifikan antara ARDT dan DT dan orang sehat. Dimana kadar protein NOD2 pada sampel orang sehat lebih tinggi dari DT dan kadar protein NOD2 pada sampel DT lebih tinggi dari ARDT. Yang berarti semakin rendah kadar protein NOD2, maka semakin tinggi kemungkinan terjadinya DT ataupun ARDT. Sehingga besar kemungkinan resiko terjadinya ARDT ketika nilai kadar protein NOD2 rendah. Nucleotide Binding Oligomerization 2 (NOD2) merupakan famili dari reseptor bakteri intraseluler yang mampu mengenali bakteri dengan baik. Gen NOD2, terletak dikromosom 16 (16q12) (Rose dkk. 2005; Weiss dkk. 2015). NOD2 terdiri dari dua NH₂-terminal Caspase Recruitment domains (CARDs), sentral nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) dan multiple COOH-terminal Leusin rich repeat (LRRs). Hal inilah yang menyebabkan gen NOD2 mampu mengenali lipopolisakarida dan peptidoglikan (Ogura, *et al.*, 2001; Mukherjee, *et al.*, 2019). NOD2 adalah reseptor pengenalan bakteri yang penting dalam respon awal terhadap patogen enterik, termasuk bakteri *S. typhimurium* dan *Citrobacter rodentium* (Weiss, *et al.*, 2015).

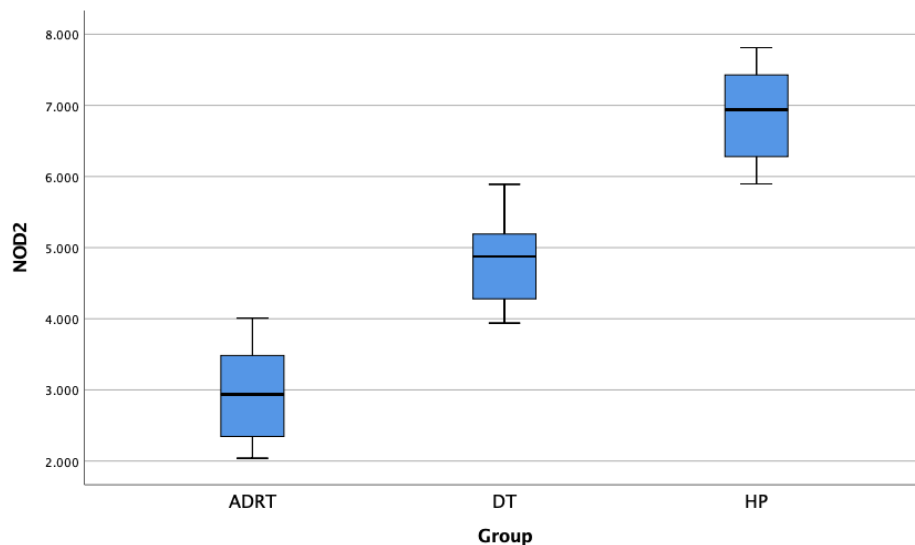
Gen NOD2 merupakan penyusun protein NOD2 yang berperan mengaktifkan NFκβ (nuclear factor kappa-beta) yang dapat mengaktifasi pembentukan respon imun dan memicu terjadinya apoptosis (Ogura, *et al.*, 2001). Adanya mutasi pada gen NOD2 dapat mengakibatkan kegagalan pengenalan dinding sel bakteri yang masuk terutama bagian muramil dipeptida akibatnya NF-κβ juga mengalami kegagalan untuk mengaktifasi system imun lainnya sehingga semakin banyak bakteri yang masuk dan berpotensi mengakibatkan reaksi inflamasi (Mukherjee, *et al.*, 2019).

Beberapa penelitian tentang hubungan gen host susceptibility dengan berbagai penyakit termasuk penyakit yang disebabkan oleh infeksi mikroorganisme telah dilakukan. Seperti penelitian tentang mutasi NOD2 pada manusia yang pernah mengalami gangguan inflamasi, seperti asma dan Chron's disease (Ogura, *et al.*, 2001). Penelitian lain pada gen NOD2 pada penyakit selain demam tifoid dilakukan oleh Rose *et al.* (2005) yang menemukan adanya mutasi pada gen NOD2 pada pasien Blau sindrom yang menyebabkan perubahan asam amino arginin menjadi triptofan pada posisi kodon ke-334 (Rose, *et al.*, 2005). Untuk demam tifoid itu sendiri, penelitian Dwiyanti dkk., (2017) telah menemukan polimorfisme gen NOD2, terhadap kerentanan keparahan Demam Tifoid.

Penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi penurunan ekspresi protein NOD2 pada pasien ARDT dan pasien DT, sejalan dengan fungsi NOD2 yaitu untuk mengenali dinding sel bakteri (peptidoglikan), terutama bagian muramyl dipeptide (MDP), sehingga bahwa gen NOD2 merangsang sistem kekebalan tubuh seperti makrofag untuk mengeliminasi bakteri *Salmonella typhi* (Dwiyanti, dkk., 2017).

Box Plot kadar NOD2 pada ARDT, DT dan Orang Sehat

Pada gambar 1 terlihat box plot nilai kadar protein NOD2 antara ARDT, DT dan OS, dimana sampel ARDT lebih rendah dibandingkan sampel DT dan sampel DT lebih rendah dibandingkan dengan OS. Dari box plot tersebut maka dapat disimpulkan bahwa nilai kadar protein NOD2 pada sampel ARDT lebih rendah dibandingkan dengan DT dan sampel DT lebih rendah dibandingkan OS.



Gambar 1. Box plot kadar nod2 pada ARDT, DT dan orang sehat.

Korelasi Titer Widal dengan Kadar Protein NOD2

Untuk melihat korelasi antara kadar protein NOD2 dan titer widal digunakan analisis korelasi pearson (*pearson correlation*). Dari analisis korelasi antara kadar protein NOD2 dan titer widal ditemukan korelasi negatif dengan koefisien R² sebesar -0.262 dan p value = 0,013. yang berarti bahwa semakin tinggi titer widal, maka semakin rendah kadar protein NOD2.

KESIMPULAN

Nilai kadar protein NOD2 ARDT bermakna lebih rendah dibandingkan DT dan DT lebih rendah dibandingkan OS. Artinya terjadi penurunan ekspresi protein NOD2 pada penderita ARDT dan DT. Sehingga besar kemungkinan resiko terjadinya ARDT ketika nilai kadar protein NOD2 rendah.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdoel, T. H., Pastoor, R., Smits, H. L., and Hatta, M., 2007. *Laboratory evaluation of a simple and rapid latex agglutination assay for the serodiagnosis of typhoid fever*. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 101(10):1032-1038.
- Alba, S., Bakker, M. I., Hatta, M., Scheelbeek, P. F. D., Dwiyanthi, R., Usman, R., Sultan, A. R., Sabir, M., Tandirogang, N., Amir, M., Yadi, Y., Pastoor, R., Van Beers, S., and Smits, H. L., 2016. *Risk Factors of Typhoid Infection in the Indonesian Archipelago*. *PLOS One.* 11(6): e0155286.
- Athman, R., and Philpott, D., 2014. *Innate Immunity via Toll-Like Receptors and Nod Proteins*. *Curr Opin Microbiol.* 7(1): 25-32.
- Dwiyanthi, R., Hatta, M., Natzir, R., Pratiwi, S., Sabir, M., Yadi, Y., and Noviyanthi, R. A., 2019. *Seroprevalence Rates of Typhoid Fever Among Children in Endemic Areas, South Sulawesi, Indonesia*. *Indian J Pub Health Res Dev.* 10(10):1130-1134.
- Dwiyanthi, R., Hatta, M., Natzir, R., Pratiwi, S., Sabir, M., Yadi, Y., Noviyanthi, R. A., Junita, A. R., Tandirogang, N., Amir, M., Fias, M., Saning, J., and Bahar, B., 2017. *Association of Typhoid Fever Severity with Polymorphisms NOD2, VDR and NRAMP1 Genes in Endemic Area, Indonesia*. *J Med Sci.* 17(3): 133-139.
- Dunstan, S. J., Ho, V. A., Duc, C. M., Lanh, M. N., Phuong, C. X., Luxemburger, C., Wain, J., Dudbridge, F., Peacock, C. S., House, D., Parry, C., Hien, T. T., Dougan, G., Farrar, J.,

- Blackwell, J. M., 2001. *Typhoid Fever and Genetic Polymorphisms at the Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1*. J Infect Dis. 183(7):1156-60.
- Flayhart, D., Borek, A. P., Wakefield, T., Dick, J., and Carroll, K. C., 2007. *Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to BacT/Alert FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics*. Journal of Clinical Microbiology, 45(3), 816–821.
- Ferrand, A., Al Nabhani, Z., Tapias, N. S., Mas, E., Hugot, J. P., and Barreau, F., 2019. *NOD2 Expression in Intestinal Epithelial Cells Protects Toward the Development of Inflammation and Associated Carcinogenesis*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 7(2):357-369.
- Grossman, D. A., Witham, N. D., Burr, G. K., Schoolnik, and Parsonett, J., 1995. *Flagellar Serotypes of Salmonella typhi in Indonesia: Relationships among Motility, Invasiveness and Clinical Illness*. J Infect Dis. 171(6): 212-216.
- Hatta, M., Pastoor, R., Scheelbeek, P. F., Sultan, A. R., Dwiyantri, R., Labeda, I., and Smits, H. L., 2011. *Multi-Locus Variable-Number Tandem Repeat Profiling of Salmonella enterica serovar typhi Isolates from Blood Cultures and Gallbladder Specimens from Makassar, South-Sulawesi, Indonesia*. PLoS One. 6(9): e24983.
- Hatta, M., Sultan, A. R., Pastoor, R., and Smits, H. L., 2011. *New Flagellin Gene for Salmonella enterica serovar typhi from the East Indonesian Archipelago*. American J. Tropical Medicine and Hygiene. 2011; 84(3): 429-34.
- Hatta, M., Ratnawati, Tanaka, M., Ito, J., Shirakawa, T., and Kawabata, M., 2010. *NRAMP1/SLC11A1 Gene Polymorphisms and Host Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis and leprae in South Sulawesi, Indonesia*. Southeast Asian J. Trop Med Public Health. 41(2): 386-394.
- Hatta, M., Baker, M., Van Beer, S., Abdoel, T. H., and Smits, H. L., 2009. *Risk Factors for Clinical Typhoid Fever in Villages in Rural South Sulawesi, Indonesia*. Int J Trop Med. 4(3): 91-99.
- Hatta, M., dan Ratnawati., 2008. *Enteric Fever in Endemic Areas of Indonesia: An Increasing Problem of Resistance*. J. Infect Dev Countries. 2(4): 298-301.
- Hatta, M., and Smits, H. L., 2007. *Detection of Salmonella typhi by nested Polymerase Chain Reaction in Blood, Urine and Stool Samples*. Am J Trop Med Hyg. 76: 139-143.
- Hatta, M., Halim, M., Abdoel, T. H., and Smits, H. L., 2002. *Antibody Response in Typhoid Fever in Endemic Indonesia and Relevance of Serology and Culture to Diagnosis*. Southeast Asian J Trop Med Pub Health. 33(40): 182-191.
- Hatta, M., Goris, D. A., Heerkens, E., Gussenhoven, G. C., Goosken, J., and Smits, H. L., 2002. *Simple Dipstick Assay for the Detection of Salmonella typhi-Specific Immunoglobulin M Antibodies and the Evolution of the Immune Response in Patients with Typhoid Fever*. Am J. Trop Med Hyg. 66(4): 416-421.
- Jamilah, J., Hatta, M., Natzir, R., Umar, F., Sjahril, R., Agus, R., Junita, A. R., Dwiyantri, R., Primaguna, M. R., and Sabir, M., 2020. *Analysis of MDR H58 Gene Existence in Salmonella typhi Isolated from Typhoid Fever Patients in Makassar, Indonesia*. New Microbes and New Infections. 38 (C): 1-6.
- McDonald, L. C., Fune, J., and Gaido, L.B., et al., 1996. *Clinical Importance of Increased Sensitivity of BacT/Alert FAN Aerobic and Anaerobic Blood Culture Bottles*. Journal of Clinical Microbiol. 34(9): 2180-2184.
- Mukherjee, T., Hovingh, E. S., Foerster, E. G., Abdel-Nour, M., Philpott, D. J., and Girardin, S. E., 2019. *NOD1 and NOD2 in Inflammation, Immunity and Disease*. Arch Biochem Biophys. 30(670): 69-81.

- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nuñez, G., and Cho, J. H., 2001. *A Frameshift Mutation in NOD2 Associated with Susceptibility to Crohn's Disease*. *Nature*. 31:603-6.
- Pastoor, R., Hatta, M., Abdoel, T. H., and Smits, H. L., 2008. *Simple, Rapid, and Affordable Point-of-Care Test for the Serodiagnosis of Typhoid Fever*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 61(2):129-34.
- Rose, C. D., Doyle, T. M., McIlvain-Simpson, G., Coffman, J. E., Rosenbaum, J. T., Davey, M. P., Martin, T. M., 2005. *Blau Syndrome Mutation of CARD15/NOD2 in Sporadic Early Onset Granulomatous Arthritis*. *J Rheumatol*. 32(2): 373-5.
- Vanessa, K., Wong, Stephen, B., Derek, P., Hatta, M., and Dougan, G., 2015. *Phylogeographic Analysis of the Dominant Multidrug Resistant H58 Clade of Salmonella typhi Identifies Unappreciated Inter-and Intra-Continental Transmission Events*. *Nature Genetics*. 47(6):632-639.
- Weiss, G., and Schaible, U. E., 2015. *Macrophage Defense Mechanisms Against Intracellular Bacteria*. *Immunol Rev*. 264(1):182-203.