

DETEKSI BAKTERI *Klebsiella pneumoniae*

Nimas Tika Inas Tarina, Sri Agung Fitri Kusuma

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

Jl. Raya Bandung-Sumedang KM. 21, Jatinangor 45363

Telepon (022)7796200, Faksimile (022)7796200

E-mail : fmunpad@telkom.net

Abstrak

Klebsiella pneumoniae merupakan salah satu jenis bakteri patogen oportunistik gram negatif yang dapat menyebabkan infeksi pernapasan, infeksi saluran kemih, infeksi nosokomial, bahkan kematian hingga 10% pada manusia. Bakteri jenis ini mudah ditemukan di cairan tubuh manusia, antara lain darah, urin, dan dahak. Telah banyak metode yang telah digunakan dan dibuktikan dalam penelitian untuk mengidentifikasi keberadaan bakteri ini, namun di antara metode tersebut terdapat salah satu metode yang lebih baik dibandingkan metode lainnya berdasarkan faktor spesifisitas, sensitifitas, waktu pengujian, hasil positif palsu, serta keakuratan hasil yang diperoleh. Dari berbagai metode identifikasi, seperti SPC (*Standard Plate Count*), *western blot*, *Epsilon meter test*, dan PCR, maka disimpulkan bahwa metode PCR *real time* merupakan metode yang paling baik digunakan untuk identifikasi bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Kata kunci: *Klebsiella pneumoniae*, identifikasi, PCR *real time*

Abstract

Klebsiella pneumoniae is one kind of the negative-gram opportunistic pathogenic bacteria which cause respiratory infection, urinary tract infection, nosocomial infection, and death up to 10% in human. This bacteria easily found in human biologic fluid, such as blood, urine, and sputum. There have been many methods used and proved experimentally to identify this bacteria, but there is a method that better to used than the other methods based on factors of specificity, sensitivity, time needed, false positive result, also accuracy. From those methods, such as SPC, western blot, Epsilon meter test, and PCR, inferred that PCR real time method is the best method used to identify *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, identification, PCR *real time*

PENDAHULUAN

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri gram negatif (-), berbentuk batang pendek, memiliki ukuran 0,5-0,5 x 1,2 μ . Bakteri ini memiliki kapsul, tetapi tidak membentuk spora. *Klebsiella pneumoniae* tidak mampu bergerak karena tidak memiliki flagel tetapi mampu memfermentasikan karbohidrat membentuk asam dan gas. Berdasarkan kebutuhannya akan oksigen,

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri fakultatif anaerob. *Klebsiella pneumoniae* dapat memfermentasikan laktosa. Spesies *Klebsiella pneumoniae* menunjukkan pertumbuhan mucoid, kapsul polisakarida yang besar dan tidak motil¹.

Pneumonia menjadi penyebab kematian nomor 6 di Indonesia, nomor 9 di Brunei, nomor 7 di Malaysia, nomor 3 di Singapura, nomor 6 di Thailand, dan nomor

3 di Vietnam. WHO menyebutkan bahwa penyebab kematian tertinggi akibat infeksi di dunia adalah infeksi saluran napas akut. Secara historis, *Klebsiella pneumoniae* digambarkan sebagai agen *Friedlander's pneumoniae*, yaitu radang paru-paru berat dari pneumonia lobar dengan angka kematian yang tinggi. *Klebsiella pneumoniae* masih menjadi salah satu penyebab utama pneumonia komunitas di beberapa negara².

Beberapa jenis *Klebsiella pneumoniae* dapat diobati dengan antibiotik, khususnya antibiotik yang mengandung cincin beta-laktam^{1,2}. Antibiotik tersebut, di antaranya adalah meropenem, kloramfenikol, siprofloksasin, dan ampisilin. Dari hasil penelitian diketahui bahwa bakteri ini memiliki sensitivitas 98,4% terhadap meropenem, 98,2% terhadap imipenem, 92,5% terhadap kloramfenikol, 80% terhadap siprofloksasin, dan 2% terhadap ampisilin. Namun, saat ini bakteri ini telah resisten terhadap beberapa antibiotik³.

Klebsiella pneumoniae dapat menghasilkan enzim betalaktamase sehingga dapat menghidrolisis cincin betalaktam yang terdapat pada antibiotik betalaktam dan menyebabkan resistensi terhadap antibiotik tersebut. Selain itu, *Klebsiella pneumoniae* juga memiliki enzim urease dan enzim sitrat permiase serta enzim ESBL (Extended Spektrum Beta Lactamase) sehingga

menyebabkan resistensi terhadap antibiotik penisilin, sefalosporin, dan aztreonam³. Kapsul polisakarida yang mengelilingi bakteri ini melindungi terhadap aksi fagositosis dan bakterisidal serum dan dapat dianggap sebagai faktor virulensi terpenting dari *Klebsiella pneumoniae*³.

Klebsiella pneumoniae dapat menyebabkan pneumonia, yang menyerang jaringan paru-paru (alveoli). *Klebsiella pneumoniae* yang menyebabkan penyakit paru-paru memberikan penampakan berupa pembengkakan paru-paru sehingga lobus kiri dan kanan paru-paru menjadi tidak sama, demam (panas-dingin), batuk-batuk (bronkhitis), penebalan dinding mukosa dan dahak berdarah. Selain itu, bakteri ini juga dapat menyebabkan infeksi saluran kemih, dan infeksi nosokomial³. Sejauh ini, cara untuk mencegah penularan penyakit dengan cara menjaga sanitasi dan pola hidup yang baik, di samping mengonsumsi antibiotik.

Klebsiella pneumoniae bisa didapatkan dari sampel darah, urin, cairan pleura, dan luka untuk pewarnaan Gram. Berbagai metode yang telah ada dilakukan untuk mendeteksi keberadaan bakteri jenis ini, di antaranya adalah pewarnaan gram, difusi cakram, PCR, SPC, *western blot*, *kit diagnostic*, dan *Epsilometer test*. Namun, dari metode konvensional dan instrumental tersebut perlu dipilih satu metode yang paling baik dan cocok untuk mendeteksi

Klebsiella pneumoniae ini agar dapat memudahkan dalam proses identifikasi *Klebsiella pneumoniae* sehingga

METODE

Pertama, dengan metode konvensional menggunakan kultur bakteri. Metode ini dilakukan dengan mengencerkan sampel mengandung *Klebsiella pneumoniae* kemudian dikultur pada media biakan agar selektif bakteri gram negatif (McConkey Agar dan EMB Agar) dengan tujuan seleksi bakteri gram negatif dan positif dapat teridentifikasi pertumbuhannya melalui seleksi media agar. Kemudian, diinkubasi pada suhu 25-30°C yang merupakan suhu optimal bagi pertumbuhan bakteri gram negatif selama 1-2 hari, kemudian koloni yang timbul diamati dan dianalisis menggunakan SPC (*Standard Plate Count*). Hasil positif menunjukkan adanya koloni bakteri berwarna merah muda^{2, 16}.

Selanjutnya, metode imunositokimia, yaitu dengan tahapan awal mengisolasi protein dari *outer membrane protein Klebsiella pneumoniae* dengan cara penambahan PBS dan NOG 0,5%, kemudian disentrifugasi 12000 rpm dan diambil supernatannya. Selanjutnya, dilakukan metode SDS-PAGE untuk menentukan spesifitas bakteri ini dengan membandingkan hasilnya dengan bakteri lain. Selanjutnya, dilakukan elektroelusi untuk mendapatkan protein sampel murni

pertumbuhan dan penyebaran bakteri ini pun dapat dihambat agar menurunkan prevalensi penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini. dengan cara memotong horizontal gel protein yang dimaksud. Lalu, setiap potongan dipotong kembali vertikal dan dimasukkan ke dalam membran dialisis berisi *buffer* elektroforesis. Hasil elusi didialisis selama 48 jam dengan cairan H₂O pada 24 jam pertama dan PBS pH 7,4 pada 24 jam kedua masing-masing pada suhu 4°C. Hasil elektroforesis diamati dan dibandingkan dengan standard sebagai kontrol positif^{1,9}.

Metode selanjutnya adalah menggunakan *kit diagnostic* bernama *Primerdesign genesig Kit for K. pneumoniae*. Kit ini ditujukan untuk identifikasi seluruh jenis isolat *Klebsiella pneumoniae*, termasuk jenis baru *Klebsiella* yang memiliki strain mirip dengan yang sudah ada. Konten dari kit ini adalah primer spesifik (150 reaksi coklat), template kontrol positif (merah), RNase/DNase bebas air (putih), dan template *buffer* (kuning). Metode ini menggunakan prinsip PCR *real time*, yaitu dengan menggunakan primer *forward* dan *reverse* yang dihibridisasi terhadap bakteri, serta campuran mengandung zat fluorogenik yang mengandung DNA probe berlabelkan 5'-dye dan 3'-quencher. Selama proses PCR, probe dibelah dan dye-quencher dipisahkan.

Hasilnya berupa fluoresensi yang dapat dideteksi pada platform PCR. Hasil positif ditunjukkan dengan perbandingan dengan standard atau primer dan menunjukkan hasil yang serupa pada panjang gelombang tertentu⁴.

Epsilometer test dilakukan dengan uji *chi square* dan dilakukan perbandingan dengan metode difusi cakram^{2,16}.

Selain itu, terdapat pula metode uji Hodge⁵ dan uji menggunakan senyawa asam boronat¹¹ untuk mendeteksi KPCs ini.

HASIL

Metode yang dapat digunakan untuk identifikasi *Klebsiella pneumoniae carbapenem* (KPCs) adalah metode genotip uji Hodge yang dimodifikasi⁵. Uji inaktivasi *carbapenem* ini memiliki sensitivitas dan spesifitas yang dapat diterima untuk produksi *carbapenemase*⁵. Namun, metode ini bukan merupakan uji fenotipik yang ideal untuk KPC karena interpretasi data yang cukup sulit terhadap beberapa isolat dan terdapat hasil positif palsu dari beberapa penelitian sebelumnya yang telah dilakukan^{5,6,7}. Hasil positif palsu tampaknya paling umum terjadi pada isolat yang menghasilkan spektrum BX, spektrum CTX-M (ESBLs), dan hiperproduksi AmpC β -laktamase^{6,8-10}. Maka dari itu, pada area isolat penghasil ESBL lazim, metode alternatif mungkin terbukti dapat lebih bermanfaat.

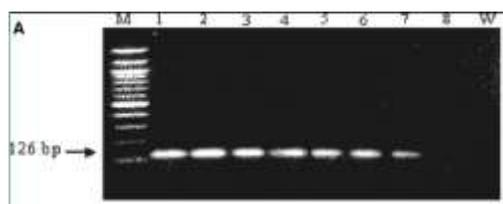
Metode selanjutnya yang terbukti dapat dilakukan untuk identifikasi KPC, yaitu menggunakan senyawa berbasis asam boronat (BA). BA pada awalnya diperkenalkan pada tahun 1980an sebagai inhibitor reversibel dari β -laktamase kelas C dan telah digunakan dalam tes cakram kombinasi untuk identifikasi isolat penghasil AmpC¹¹⁻¹³. Baru-baru ini, beberapa *disc test* (tes cakram) yang menggabungkan senyawa BA, asam fenilolidat, dan 3-aminophenyl boronic acid (APB), terbukti sangat sensitif dan spesifik untuk mendeteksi produksi KPC.

Tsakris dkk¹⁴ menguji cakram berisi 400 μ g asam fenilolidon sebagai penghambat dan beberapa β -laktam sebagai substrat antibiotik terhadap 57 isolat penghasil KPC. Mereka menemukan diameter zona inhibisi yang mengalami peningkatan secara signifikan (≥ 5 mm) bila digunakan dalam kombinasi dengan sefepime dan semua karbapenem (imipenem, meropenem, dan ertapenem) dibandingkan dengan zona yang dihasilkan oleh cakram β -laktam saja^{14,15}.

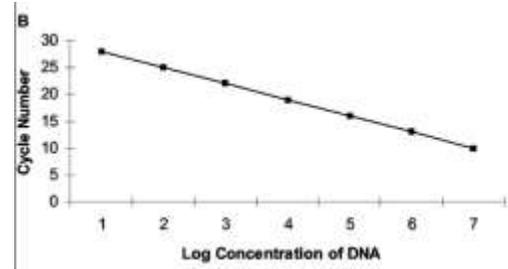
Meropenem, imipenem, dan sefepime adalah substrat antibiotik yang paling sensitif dan spesifik (100% untuk semua), sedangkan meropenem menunjukkan perbedaan terbesar dalam zona inhibisi.

Karena tingginya prevalensi strain penghasil KPC yang juga membawa gen ESBL, kelompok peneliti yang sama meneliti *BA-based double-disc synergy tests* (DDSTs) untuk mendeteksi gen ESBL pada produsen KPC¹⁶. Mereka menemukan bahwa CLSI ESBL yang dimodifikasi mengandung BA dan kalvulanat sebagai inhibitor dikonfirmasi paling akurat (100% spesifik dan sensitif) untuk 118 strain yang mengandung ESBL.

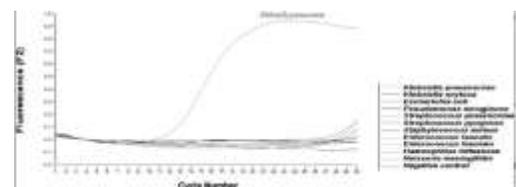
Metode lain yang dapat digunakan untuk identifikasi bakteri *Klebsiella pneumoniae*, yaitu menggunakan instrumen *PCR real time assay*. Sensitivitas metode ini dioptimalkan untuk 10 fg DNA KPC yang dimurnikan. Elektroforesis gel agarosa dari ampikon menunjukkan bahwa intensitas pita berkorelasi baik dengan konsentrasi amplitam yang dihitung¹⁷.



Optimasi sensitivitas PCR real-time yang dilakukan dengan menggunakan strain tipe *K. pneumoniae* (ATCC 13883) menghasilkan kurva regresi linier pada 107 sampai 1 genomik setara (10 ng sampai 1 fg DNA) dengan tingkat kesalahan <1% dan Sebuah koefisien korelasi pada -1¹⁸.

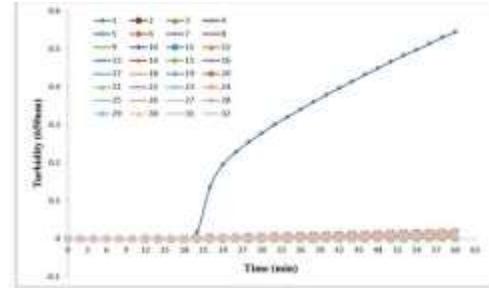


Spesifisitas uji PCR real-time untuk *K. pneumoniae* dengan primer yang spesifik untuk gen 16S rRNA diselidiki dengan menguji 1 ng DNA yang dimurnikan dari masing-masing dari 65 organisme kontrol negatif. Amplifikasi *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, dan *Neisseria meningitidis* tetap negatif saat diuji pada semua konsentrasi (10 ng sampai 1 fg), sedangkan nilai CT untuk *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, dan *Enterococcus faecium* Lebih besar dari 29 pada konsentrasi 1 ng / μ l. Sebagai perbandingan, nilai CT ≤ 13 dicapai untuk *K. pneumoniae* pada konsentrasi yang sama dengan 1 ng / μ l. Pada elektroforesis gel agarose dari campuran PCR yang berasal dari organisme kontrol negatif, tidak ada ampikon yang pernah diamati. Urutan target ditunjukkan sangat spesifik untuk *K. pneumoniae*, karena gagal mendeteksi bakteri lain yang diketahui menyebabkan bakteremia¹⁸.



Pengujian berbasis PCR terhadap 259 sampel darah secara real-time PCR menunjukkan sensitivitas 100% (146 dari 146) dan spesifisitas 100% (113 dari 113). Tidak ada kontaminasi yang diamati sewaktu-waktu selama penelitian berlangsung. Tidak ada sinyal positif palsu yang terdeteksi saat kontrol negatif (yang terdiri dari air steril, primer, dan probe) dalam kapiler reaksi¹⁸. Berbeda dengan metode PCR konvensional, dimana metode tersebut kurang sensitif terhadap kontaminan karena penanganan postamplifikasi dieliminasi¹⁹. Pendekatan berbasis PCR real-time untuk identifikasi *K. Pneumoniae* menghasilkan penghematan waktu yang signifikan dibandingkan dengan identifikasi biokimia *K. pneumoniae* tradisional dari BACTEC 9240 kultur darah positif.

Uji lainnya yaitu menggunakan metode LAMP assay (*loop-mediated isothermal amplification*). *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 digunakan sebagai kontrol positif dan air suling ganda sebagai kontrol negatif saat mengevaluasi spesifisitas LAMP untuk mendeteksi *K. pneumoniae*. Semua strain lainnya, termasuk kontrol kosong, diuji negatif, menunjukkan bahwa uji LAMP spesifik untuk *K. Pneumoniae*²⁰.



Untuk uji sensitifitasnya, batas deteksi kekeruhan real-time dan deteksi visual adalah 0,1115 pg / μ l, yang 100 kali lipat lebih sensitif daripada pengujian PCR tradisional²⁰.

Namun, kelemahan metode LAMP adalah bahwa ia memiliki tingkat hasil positif positif yang relatif tinggi. Hal ini karena efisiensi amplifikasi uji LAMP sangat tinggi, dan 20 μ g DNA spesifik dapat disintesis dalam campuran reaksi 25 μ l dalam waktu 60 menit²⁰.

Metode epsilometer dan difusi cakram memiliki perbandingan hasil spesifitas yang jauh berbeda, yaitu E-test memiliki hasil 66,67%, sedangkan difusi cakram memiliki hasil 100%. Maka dari itu, dapat dikatakan bahwa metode epsilometer kurang efektif digunakan untuk mendeteksi *K. pneumoniae*.

SIMPULAN

Berdasarkan beberapa metode identifikasi bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang telah ada, maka disimpulkan bahwa metode menggunakan instrumen PCR *real time* merupakan metode yang paling baik dimana memiliki beberapa kelebihan

dibandingkan dengan metode lainnya, di antaranya adalah membutuhkan waktu pengujian yang singkat, sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi untuk bakteri KPC, diperoleh hasil berupa data spesifik berupa grafik sehingga dapat dikatakan lebih akurat, serta tidak didapatkan hasil positif palsu.

SARAN

Metode PCR *real time* memungkinkan untuk mendeteksi lebih banyak patogen dengan menggunakan instrumen PCR *real time multiplex* dimana metode ini dapat menjadi teknologi yang sesuai untuk diterapkan di laboratorium diagnostik rutin dan laboratorium yang menghadapi tingkat isolasi yang tinggi untuk *Klebsiella pneumonia* atau pada situasi wabah.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Anderson, K.F., Lonsway, D.R. & Rasheed, J.K., 2007. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 45, pp.2723-5.
- ²Anderson, K.F., Patel, J.B. & Wong, B., 2009. Characterization of Enterobacteriaceae with a false-positive modified Hodge test, Abstracts of the Forty-ninth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *American Society for Microbiology*, pp.719-41.
- ³Beesley, T., Gascoyne, N. & Knott-Hunziker, V., 1983. The inhibition of class C β -lactamases by boronic acids. *Biochem J*, 209, pp.229-33.
- ⁴Genesig. 2016. Quantification of *Klebsiella pneumoniae* genomes. Genesig Standard Kit Handbook HB 10.04.08
- ⁵Carvalhaes, C.G., Picao, R.C. & Nicoletti, A.G., 2010. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chem*, 65, pp.249-51.
- ⁶Coudron, P.E., 2005. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol*, 43, pp.4163-7.
- ⁷Dong, D. et al., 2015. Survey and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples targeting the *rcaA* gene in Beijing, China. *Front Microbiol*, 6, p.519.
- ⁸Kurupati, P., Chow, C., Kumarasinghe, G. & Poh, C.L., 2004. Rapid Detection of *Klebsiella pneumoniae* from Blood Culture Bottles by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 42(3), pp.1337-40.
- ⁹Lee, K., Chong, Y. & Shin, H.B., 2001. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*, 7, pp.88-91.
- ¹⁰Logan, J.M.J., Edwards, K.J., Saunders, N.A. & Stanley, J., 2001. Rapid identification of *Campylobacter* spp. by melting peak analysis of biprobes in real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 39, pp.2227-32.
- ¹¹Moland, E.S., Hanson, N.D. & Overman, S.B., 2009. Concerns about KPC screening and confirmatory tests, Abstracts of the Forty-ninth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *American Society for Microbiology*, pp.729-40.

- ¹²Nordmann, P., Cuzon, G. & Naas, T., 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, 9, pp.228-36.
- ¹³Nouvellon, M. et al., 1994. Clonal outbreaks of extended-spectrum β -lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* demonstrated by antibiotic susceptibility testing, β -lactamase typing, and multilocus enzyme electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 32, pp.2625-27.
- ¹⁴Pasteran, F., Mendez, T. & Guerriero, L., 2009. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 47, pp.1631-9.
- ¹⁵Pedersen, G., Schonheyder & Sorensen, 1997. Antibiotic therapy and outcome of monomicrobial gram-negative bacteremia: a 3-year population-based study. *Scand. J. Infect. Dis.*, 29, pp.601-06.
- ¹⁶Podschun & Ullmann, 1998. *Klebsiella* spp. As Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, pp.589-603.
- ¹⁷Tsakris, A., Kristo, I. & Poulou, A., 2008. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc test. *J Antimicrob Chemother*, 62, pp.1257-60.
- ¹⁸Tsakris, A., Kristo, I. & Poulou, A., 2009. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*, 47, pp.362-7.
- ¹⁹Tsakris, A., Poulou, A. & Themeli-Digalaki, K., 2009. Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 47, pp.3420-6.
- ²⁰Yagi, T., Wachino, J. & Kurokawa, H., 2005. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 43, pp.2551-8.