

Identifikasi Gen SHV pada Enterobacteriaceae Produsen Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)

Yuwono

Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya/RSUP Moh.Hoesin Palembang Sumatera Selatan Indonesia

Abstrak

Salah satu problem resistensi terhadap antimikroba terutama di rumah sakit adalah kelompok Enterobacteriaceae yang memproduksi Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi gen SHV pada Enterobacteriaceae produsen ESBLs pada pasien yang dirawat di RSUP Mohammad Hoesin Palembang. Didapatkan 75 sampel Enterobacteriaceae berdasarkan uji Double Disk Approximation dan PCR. Spesies yang ditemukan adalah *Klebsiella pneumoniae* 30 (40,00%), *Escherichia coli* 17 (22,66%), *Enterobacter sp* 14 (18,67%), *Proteus Sp* 12 (16,00%), dan *Acinetobacter calcoaceticus* 2 (2,67%). Berdasarkan hasil PCR didapatkan 32 sampel mengandung gen SHV. Distribusi gen SHV adalah 20 (62,50%) pada *Klebsiella pneumoniae*, 7 (21,87%) pada *Escherichia coli*, 4 (12,50%) pada *Enterobacter sp* dan 1 (3,13%) pada *Proteus sp*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Klebsiella pneumoniae* dominan pada Enterobacteriaceae produsen ESBLs dan gen SHV juga dominan ditemukan pada spesies ini.

Kata Kunci: ESBL, Enterobacteriaceae, gen SHV

Identification of SHV Gene among Enterobacteriaceae Produce Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs)

Yuwono

Abstract

One of major antimicrobial resistance problem especially in hospital were Enterobacteriaceae produce Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs). The aim of this research was to identify SHV gene on Enterobacteriaceae produce ESBLs from inpatients in Moh.Hoesin General Hospital Palembang. There were 75 specimen Enterobacteriaceae identified based on Double Disk Approximation test and PCR. Distribution of spesies were *Klebsiella pneumoniae* 30 (40,00%), *Escherichia coli* 17 (22,66%), *Enterobacter sp* 14 (18,67%), *Proteus Sp* 12 (16,00%), and *Acinetobacter calcoaceticus* 2 (2,67%). PCR result showed 32 specimen were SHV gene positive. The distribution of this gene were 20 (62,50%) in *Klebsiella pneumoniae*, 7 (21,87%) in *Escherichia coli*, 4 (12,50%) in *Enterobacter sp* and 1 (3,13%) in *Proteus sp*. This result showed that *Klebsiella pneumoniae* was dominant in Enterobacteriaceae produce ESBLs and also SHV gene was dominant in this species.

Keywords: ESBL, Enterobacteriaceae, SHV gene

Pendahuluan

Sekitar tahun 1944 ditemukan penicilin yang merupakan anggota kelompok antibiotik betalaktam. Sayangnya dalam waktu 5 tahun telah ditemukan galur Gram positif resisten terhadap antibiotik ini hingga 90%. Berbagai terobosan untuk menemukan antibiotik baru dan memodifikasi antibiotik yang ada terus dilakukan. Hasilnya cukup baik. Hanya saja masalah resistensi terhadap antibiotik betalaktam terus berkembang dengan dua mekanisme yaitu bakteri mengubah reseptor yang dimilikinya atau memproduksi enzim β laktamase yang dapat menghidrolisis obat tersebut. Resistensi karena produksi enzim β laktamase berkembang demikian pesat menjadi *Extended-Spectrum β Lactamases* (ESBLs). Kemampuan galur ESBL menghidrolisis antibiotik β laktam secara luas disebabkan adanya sejumlah mutasi pada beberapa gen seperti SHV, TEM, OXA dan sebagainya. Mutasi tersebut umumnya mengenai daerah *active site* dari enzim sehingga aktivitas enzim tersebut meningkat¹.

Famili *Enterobacteriaceae* termasuk kelompok bakteri utama penyebab infeksi yang berkaitan dengan perawatan (*health care*) di rumah sakit maupun infeksi pada populasi (komunitas). Infeksi karena galur ESBL makin sulit diterapi karena pilihan antibiotik menjadi sangat terbatas dan munculnya berbagai mutan baru. Beberapa penelitian di Amerika dan Eropa menunjukkan bahwa prevalensi bakteri produsen ESBLs mencapai 60% dari isolat klinis yang ada^{2,3}.

Identifikasi terhadap *Enterobacteriaceae* produsen ESBLs sangat diperlukan untuk perbaikan manajemen terapi dan untuk pengendalian infeksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi *Enterobacteriaceae* galur ESBLs di RSUP Dr. Mohammad Husein (RSMH) dan determinan genetik dalam hal ini gen SHV.

Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian observasional deskriptif dengan pendekatan genotipe molekuler. Spesimen diambil dari penderita *suspect* infeksi oleh *Enterobacteriaceae* produsen ESBLs dari seluruh bagian rawat inap di RSMH. Sampel diambil secara *consecutive* yaitu semua penderita dengan *suspect* infeksi tersebut diambil sebagai subyek. Penelitian dilakukan di laboratorium mikrobiologi klinik RSMH. Semua pasien diberi penjelasan dan kesediaan menandatangani *informed consent* untuk mengikuti penelitian ini. Diagnosis klinis ditegakkan untuk mengetahui adanya infeksi atau tidak. Jika terindikasi infeksi maka spesimen dari pasien tersebut dibiakan dalam media perbenihan. Dilakukan identifikasi bakteri *Enterobacteriaceae*.

Identifikasi *Enterobacteriaceae* produsen ESBLs dilakukan dengan metode *double-disk approximation test*. Uji ini menggunakan antibiotik *cefotaxime*, *ceftazidime*, *cefepime* yang diletakkan sekitar 15 mm dari *Amoxicillin clavulanic* (AMC). Perluasan zona cakram *cefotaxime*, *ceftazidime*, *cefepime* di sekitar (*side facing*) cakram AMC

diinterpretasikan sebagai hasil positif bakteri produsen ESBL. Uji konfirmasi dilakukan dengan uji PCR dengan mendeteksi adanya gen SHV.⁴

Ekstraksi dan isolasi DNA dilakukan dengan metode DNA *chelex-100 extraction* menggunakan *Phosphate Buffer Saline (PBS)* pH 7,4; safonin 0,5% dalam PBS; dan *chelex 20%* dalam ddH₂O pH 10,5. PCR dengan volume total 50 µl terdiri dari 1 µl primer (1,5 µg/ml), 1 µl (200 µM) *deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs), 5 µl *buffer* PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3), 1,5 µl (2,5 mM) MgCl₂ dan 0,2 µl (1 unit) *Taq polymerase*, 5 µl DNA *SHVplate* dan ditambahkan air sampai volumenya 50 µl. Campuran tersebut diproses dalam mesin PCR *i-cycler Biorad (Biorad sysSHV, USA)*. Primer spesifik yang digunakan adalah SHVF 5'TCAGCGAAAAACACCTTG 3' dan SHVR 5'TCCCGCAGATAAATCACCC3'. Kondisi PCR yang digunakan sebagai berikut: Suhu denaturasi 94°C selama 2 menit, diikuti dengan 30 siklus 1 menit pada suhu 94°C, *annealing* 52°C selama 30 detik, *extention* 72°C selama 45 detik, lalu diikuti ekstensi akhir 72°C selama 5 menit. Amplikon hasil PCR di-elektroforesis kemudian visualisasi pada *geldoc (Biorad sysSHV, USA)* sekitar 768 bp untuk gen SHV⁵.

Hasil Penelitian

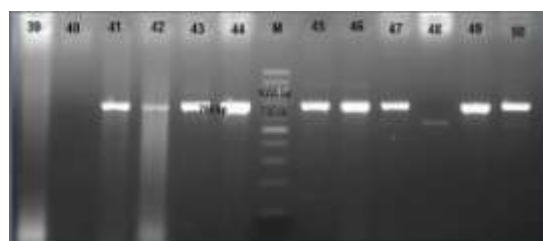
Pada penelitian ini didapatkan 75 spesimen dengan distribusi asal spesimen, jenis bakteri dan genotip seperti terlihat pada beberapa tabel berikut.

Tabel 1. Distribusi frekuensi Jenis Spesimen dan Bakteri

Variabel	Frekuensi
Spesimen	
Pus	19 (25,34)
Sputum	18 (24,00)
Darah	13 (17,33)
Urin	11 (14,67)
Swab Tenggorok	6 (8,00)
Tinja	4 (5,33)
Ulkus Dekubitus	2 (2,67)
Bilasan Lambung	1 (1,33)
Drain	1 (1,33)

Tabel 2. Distribusi frekuensi Gen SHV

Bakteri	SHV (%)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	20 (62,50)
<i>Escherichia coli</i>	7 (21,86)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2 (6,25)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (3,13)
<i>Enterobacter cloacae</i>	0
<i>Proteus rettgeri</i>	0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1 (3,13)
<i>Enterobacter hafnia</i>	1 (3,13)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0
<i>Proteus morgani</i>	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0



Gambar 1. Hasil PCR gen SHV dengan amplikon sebesar 768 bp. M adalah marker DNA, sampel pada alur 39 – 50, sebagian sampel yaitu no 39, 40 dan 48 bukan ESBL sehingga tidak terdeteksi gen tersebut.

Pembahasan

Jumlah sampel yang berhasil dikumpulkan dalam kurun waktu 3 bulan yaitu Agustus– Oktober 2012 cukup besar. Hal ini dimungkinkan karena RSMH merupakan rumah sakit rujukan tersier di

wilayah Sumatera Selatan. Spesimen dengan jumlah banyak adalah pus, sputum, darah dan urin. Spesimen tersebut umumnya berasal dari Bangsal Rawat Intensif (ICU) yang mengindikasikan bahwa infeksi kelompok *Enterobacteriaceae* produsen ESBLs kebanyakan terjadi pada penderita dengan imunitas lemah atau kemungkinan merupakan *Healthcare Associated Infections* (HAIs). Jenis penyakit infeksi yang ditimbulkannya pun kemungkinan berhubungan dengan spesimen tersebut yaitu kemungkinan infeksi berat hingga sepsis termasuk infeksi pada saluran kemih⁶.

Hasil uji *double disc diffusion* menunjukkan semua sampel menunjukkan hasil positif ESBLs. Konfirmasi dengan *polymerase chain reaction* (PCR) menunjukkan bahwa 32 sampel (42,67%) mengandung gen SHV atau yang benar-benar ESBLs secara genotip. Jumlah yang tidak terlalu tinggi ini bukan berarti sisanya bukan ESBLs karena kemungkinan sampel lainnya adalah ESBLs yang mengandung gen TEM yang juga dominan pada kelompok *Enterobacteriaceae* produsen ESBLs⁷.

Pada penelitian ini, didapatkan hasil biakan kuman infeksi ESBLs paling banyak ditemukan *Klebsiella pneumoniae* yaitu 30 sampel (40,00%), diikuti *E. coli* sebanyak 17 sampel (22,66%). Hal ini sesuai dengan penelitian sejenis di India yang menyebutkan bahwa enzim β laktamase paling banyak diproduksi oleh

kuman famili *Enterobacteriaceae*, terutama *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae*⁸.

Hasil penelitian didapatkan 32 dari 75 sampel ESBLs (42,67%) dinyatakan positif bergenotip gen SHV. Distribusi terbanyak adalah pada *Klebsiella pneumoniae* 20 (62,50%) dan pada *E. coli* 7(21,86%). Persentase hasil ini sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa SHV merupakan salah satu jenis gen terbanyak yang ditemukan pada galur ESBL, selain TEM. Prevalensi gen SHV hasil penelitian lebih besar dibandingkan prevalensi gen serupa penelitian di Turki⁹⁻¹⁰.

Hampir seluruh ESBLs merupakan derivat dari enzim TEM atau SHV. Saat ini terdapat lebih dari 90 tipe TEM dan lebih dari 25 tipe SHV. Pada kedua kelompok enzim ini terdapat *point mutation* pada lokus tertentu pada genomnya sehingga menimbulkan *extended-spectrum phenotype*. TEM dan SHV hampir selalu ditemukan pada *E. coli* dan *K. pneumoniae*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, serta bakteri yang masuk dalam famili *Enterobacteriaceae*. Enzim β laktamase SHV sangat umum ditemukan pada *K. pneumoniae* dan merupakan 20% dari *plasmid-mediated ampicillin resistance* pada spesies ini. Hal ini sesuai dengan temuan pada riset ini dimana gen SHV dominan pada *K. Pneumoniae*. Pada beberapa galur *K. pneumoniae*, gen *blaSHV* atau gen yang bersangkutan dengannya (*related gene*)

terintegrasi dalam kromosom. Hipotesis yang menyebutkan bahwa gen penyandi SHV merupakan bagian dari *transposable element* sejauh ini belum terbukti. Hanya terdapat beberapa derivat SHV dan hanya beberapa mutasi gen *blaSHV* yang menghasilkan varian SHV. Mayoritas varian SHV yang memiliki fenotif ESBLs menunjukkan adanya substitusi glisin menjadi serin pada posisi asam amino ke-238. Residu serin pada posisi 238 merupakan penentu efisiensi kemampuan menghidrolisis *ceftazidime*, sedangkan residu lisin 240 merupakan penentu efisiensi kemampuan menghidrolisis *cefotaxime*¹¹⁻¹².

Secara epidemiologi penyebaran ESBL di berbagai negara di dunia berbeda-beda. Di Amerika latin 42,7%, Amerika Utara 5,8%, Eropa 2% - 31%, di negara-negara Asia prevalensi ESBLs yang diproduksi oleh *E.coli* dan *K. pneumoniae* bervariasi antara 4,8% - 12%. Di Indonesia prevalensi infeksi oleh bakteri penghasil ESBLs mencapai 29% pada *E.coli* dan 36% pada *K. pneumoniae*. Penelitian ini berdasarkan konfirmasi gen SHV, prevalensi ESBLs mencapai 42,67%¹³⁻¹⁵.

Tingginya prevalensi ESBLs terutama karena penggunaan antibiotik yang tidak rasional. Selain itu faktor resiko terjadinya kolonisasi bakteri ESBLs akibat lamanya perawatan di *Intensive Unit Care* (ICU) dan rumah sakit, instrumentasi/kateter dan penyakit berat termasuk HIV-AIDS turut berkontribusi. Pasien infeksi galur ESBLs

akan mengalami peningkatan resiko kegagalan terapi menggunakan *expanded-spectrum β -lactam antibiotic*. Untuk itu organisme yang dikonfirmasi berdasarkan tes kepekaan merupakan ESBLs sesuai kriteria NCCLS dapat dilaporkan sebagai resisten terhadap seluruh *expanded-spectrum β -lactam antibiotic*. Sebagian galur produsen ESBLs akan tampak *over resistance* terhadap *expanded-spectrum β -lactam antibiotic* tetapi sebagian lagi secara fenotif tidak resisten sesuai kriteria NCCLS. Oleh sebab itu tiap laboratorium mikrobiologi klinik harus waspada pada isolat yang menunjukkan kenaikan kadar hambat minimal (MIC) terhadap *oxymino-cephalosporins*. Meskipun tidak dilaporkan sebagai resisten, galur bakteri ini sangat mungkin ini adalah produsen ESBLs¹⁶⁻¹⁷.

Peran Instalasi Laboratorium Mikrobiologi Klinik dan Dokter Spesialis Mikrobiologi Klinik dalam pengendalian infeksi dan pengendalian resistensi antimikroba menjadi sangat penting. Surveilans peta kuman, peta antibiogram, standar penanganan pasien infeksi dan penggunaan antibiotik yang rasional merupakan tugas utama laboratorium dan dokter tersebut. Penelitian ini telah mengkonfirmasi bahwa prevalensi *Enterobacteriaceae* produsen ESBLs sangat tinggi dan sudah tentu menjadi masalah serius di rumah sakit.

Daftar Pustaka

1. Bradford P. 2001. Extended spectrum β lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14: 933-951
2. Nathisuwan S, Burgess DS, Lewis II JS. 2001. Extended Spectrum β Lactamases : Epidemiology, Detection, and Treatment. *Pharmacotherapy*. 21(8); 920-8
3. Winokur PL, Canion R, Casellas JM, et al., 2001. Variations in the prevalence of strains expressing an ESBL phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clin infect Dis* 32 suppl, 2: s94-103
4. Thomson KS, Sanders CC, Moland ES. 1992. Detection of extended spectrum β Lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* comparison of the double disk and three dimensional test. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1877-82
5. Bali EB, et al., 2010. Phenotypic and Molecular Characterization of TEM, SHV, CTX-M and extended spectrum β Lactamases Produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii*, and *Klebsiella* isolates in a Turkish Hospital. Turkey: Department of Biology and Microbiology, Gazi University.
6. Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended spectrum β -lactamase: a clinican update. *Clin Microbiol Rev*. 18(4): 657-86
7. Batchoun, R.G et al.. 2009. ESBL among Gram-Negative Bacterial Isolates from Clinical Specimens in Three Major Hospitals in Northern Jordan. Jordan :Department of Medical Laboratory Sciences University of Science and Technology Jordan.
8. Jacoby GA, Munoz-Prize LS. 2005. The New Beta-Lactamases. *England Journal of Medicine*. 352: 360-391.
9. Jain A, Mondal R. 2008. SHV dan SHV genes in Extended Spectrum β -Lactamase producing *Klabisella* spesies and Their Antimicrobial resistance Pattern. *Indian J Med*. 2009: 759-764.
10. D'Agata EL. Venkataranam P. DeGiorolami L. Weigel M. Samore F Tenover. 1998. The Molecular and clinical Epidemiology of Enterobacteriaceae- Producing Extended Spectrum Beta-lactamase in a Tertiary Care Hospital. *Journal Infection*. 36: 279-295.
11. Bermudes HC. Arpin FJ, El-Harrif C, Bebear CQ.1997. Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a French hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 16: 523-529
12. Cotton MF, Wasserman E, Pieper CH. 2000. Invasive disease due to extended spectrum β lactamases producing *Klebsiella pneumonia* in a neonatal unit: the possible role of cockroaches. *J Hosp Infect* 44: 13-7
13. Sharma J, Meera S, Palap R. 2009. Detection of TEM and SHV in *Escherichia Coli* and *Klabisella Pneumonia* Isolates in a Tertiary Care Hospital from India. *Indian Journal Med Res*. 132: 332-336

14. Taslima Y. 2012. Prevalence of ESBL among *E. coli* and *Klebsiella* Sp in a Tertiary Care Hospital and Molecular Detection of Important ESBL Producing Genes by Multiplex PCR. Department Microbiology and Immunology Mymensingh Medical College. Mymensingh. Banglades. Hal, 66-85.
15. Emery CL, Weymouth LA. 1997. Detection and Clinical Significance of Extended Spectrum in Tertiary Care Medical centre. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2061-67.
16. Al-Jasser AM. 2006. Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs): A Global Problem. *Kuwait Medical Journal.* 38 (3): 171-185.
17. Branger C, Lesimple CA, Bruneu B, *et al.* 1998. Long term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended spectrum β lactamases (ESBL) in a university hospital. *J Med Microbiol* 47: 210-20.