



Deteksi Molekuler *Klebsiella pneumoniae* K1, K2, dan K5 yang Diisolasi dari Berbagai Spesimen Klinis

Molecular Detection of K1, K2, and K5 Klebsiella pneumoniae Isolated from Clinical Specimens

Aminah Aminah^{1*}, Citra Trisna¹, Dewi Lokida²

¹ Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Banten, Tangerang, Indonesia

² Laboratorium Infeksi, Rumah Sakit Umum Kabupaten Tangerang, Tangerang, Indonesia

* Corresponding author: aminah@poltekkesbanten.ac.id

Abstrak. *Klebsiella pneumoniae* adalah salah satu penyebab utama *healthcare-associated infections* dengan tingkat *multidrug resistance* (MDR) tinggi, terutama klon penghasil *extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL) dan *carbapenemase* (CP). Serotipe kapsul *Klebsiella pneumoniae* sangat bervariasi sesuai tingkat resistensinya terhadap serum dengan K1, K2, dan K5 menjadi penanda strain hipervirulen yang berbeda dari *Klebsiella pneumoniae* klasik dalam masyarakat pada umumnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengaplikasikan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) untuk mendeteksi genotipe kapsul K1, K2, dan K5 *Klebsiella pneumoniae* asal pasien Rumah Sakit Umum (RSU) Kabupaten Tangerang. Isolasi dan uji resistensi dilakukan oleh Laboratorium RSU Kabupaten Tangerang. Konfirmasi spesies *K. pneumoniae* dan deteksi genotipe kapsul dengan metode PCR dilakukan di Laboratorium Molekuler Poltekkes Kemenkes Banten. Sebanyak delapan isolat (26,7%) merupakan *K. pneumoniae* resistan *Carbapenem* dan 11 (36,7%) penghasil *extended spectrum beta-lactamase* (ESBL). Dari total 31 sampel yang diperoleh, hanya satu isolat yang tidak dapat dikonfirmasi. Seluruh isolat yang terkonfirmasi *K. pneumoniae* diproses untuk tahap selanjutnya. Pemeriksaan PCR menggunakan primer untuk mendeteksi genotipe kapsul K1, K2, dan K5 menunjukkan hanya satu isolat (3,3%) yang diduga merupakan strain hipervirulen dengan genotipe kapsul K2. Tidak ada genotipe K1 dan K5 pada semua isolat yang diperiksa.

Kata kunci: *Klebsiella*, resistan, K1, K2, K5

Abstract. *Klebsiella pneumoniae* is one of the primary cause of *healthcare-associated infections* with high *multidrug resistance* (MDR) incidence, especially the *extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL) and *carbapenemase* (CP) producing clones. *Klebsiella pneumoniae* capsular serotype is highly variable according to its serum resistance with K1, K2, and K5 marking the difference between the hypervirulent strain and the classical community-acquired *Klebsiella pneumoniae*. This research aimed to apply the *polymerase chain reaction* (PCR) technique to detect *K. pneumoniae* capsular genotypes K1, K2, and K5 from patients of Tangerang District General Hospital. Bacterial isolation and antimicrobial susceptibility tests were done by the Hospital Laboratory. Confirmatory and capsular genotype detection PCR tests were conducted at the Molecular Laboratory of Banten Health Polytechnic. Eight isolates (26,7%) were *Carbapenem-resistant* and 11 (36,7%) isolates were *extended spectrum beta-lactamase* (ESBL) producing *K. pneumoniae*. Only one out of the total 31 samples was not confirmed as *K. Pneumoniae* by PCR. All confirmed isolates were processed for the next step. PCR test using primers to detect capsular genotype K1, K2, and K5 resulted in one isolate (3,3%) detected as hypervirulent strain with K2 capsule type. There was no K1 and K5 genotypes detected in all isolates.

Keywords: *Klebsiella*, resistant, K1, K2, K5

Pendahuluan

Klebsiella pneumoniae secara klasik bersifat patogen oportunistik yang dapat menimbulkan berbagai infeksi seperti pneumonia, infeksi saluran kemih, dan bakteremia pada individu dengan sistem kekebalan tubuh rendah (1). *Klebsiella pneumoniae* merupakan salah satu penyebab utama *healthcare-associated infections* dengan tingkat *multidrug resistance* (MDR) tinggi, terutama klon penghasil *extended-spectrum beta-lactamase* (ESBL) dan *carbapenemase* (CP) (2,3) sehingga menjadi target *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System* (GLASS) (4). Salah satu faktor virulensi yang paling penting dalam menentukan kemampuan *K. pneumoniae* untuk bertahan dalam serum dan menghindari fagositosis adalah kapsul polisakarida, sehingga *K. pneumoniae* yang tidak memiliki kapsul cenderung memiliki virulensi rendah (5,6).

Serotipe kapsul *K. pneumoniae* bervariasi sesuai tingkat kemampuannya menghindari fagositosis (7). Tipe kapsul K1, K2, dan K5 merupakan penanda yang cukup baik untuk membedakan *K. pneumoniae*

hipervirulen dengan *K. pneumoniae* klasik dalam masyarakat dengan tingkat akurasi 0,90, sensitivitas 0,93, dan spesifisitas 0,88 (8). *Klebsiella pneumoniae* hipervirulen (hvKp) memiliki kemampuan untuk menginfeksi individu sehat (9). Bakteri hvKp hidup di saluran pencernaan dan dapat menyebar ke bagian tubuh lainnya (10). Sejak pertama kali dilaporkan di Taiwan pada tahun 2008, hvKp telah ditemukan secara luas di negara-negara Asia, Amerika, dan Eropa dengan kasus terbanyak di Asia (11) namun belum banyak informasi yang tersedia mengenai penyebarannya di Indonesia. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi genotipe kapsul K1, K2, dan K5 *K. pneumoniae* asal pasien di Rumah Sakit Umum Kabupaten Tangerang.

Metode

Pengumpulan Sampel

Sebanyak 30 sampel isolat *K. pneumoniae* dikumpulkan dari RSUD Kabupaten Tangerang pada bulan Juli – September 2022.

Isolasi dan Identifikasi *K. pneumoniae*

Sampel klinis dikumpulkan dan diperiksa oleh Laboratorium RSUD Kabupaten Tangerang. Isolat *K. pneumoniae* yang diperoleh dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Banten dalam media *lactose broth* kemudian digoreskan pada plat MacConkey agar (MCA) dan diinkubasi pada 37°C selama 18–24 jam untuk mendapatkan koloni tunggal. Koloni tunggal yang diperoleh kemudian disubkultur pada plat MCA yang baru dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam.

Uji konfirmasi *K. Pneumoniae* hasil subkultur dilakukan dengan metode PCR di Laboratorium Molekuler Poltekkes Kemenkes Banten. DNA diekstraksi dengan metode perebusan (12). Gen *rpoB* yang spesifik untuk spesies *K. pneumoniae* diamplifikasi menggunakan pasangan primer F-CAACGGTGTGGTTACTGACG dan R-TCTACGAAGTGCCGTTTTTC dengan ukuran ampikon 108 bp (13).

Amplifikasi dilakukan menggunakan GoTaq® Green Master Mix (Promega). Reagen yang digunakan untuk PCR konfirmasi spesies ini adalah: 12,5 µl GoTaq® Green Master Mix 2X, 0,5 µl primer *forward* 20 µM, 0,5 µl primer *reverse* 20 µM, 4 µl templat DNA, dan 7,5 µl *nuclease-free water*.

Proses PCR menggunakan *thermal cycler* GTC96S 96 well (Cleaver Scientific) dengan tahap denaturasi awal 95°C selama 1 menit, diikuti 35 siklus amplifikasi (denaturasi 95°C 15 detik, *annealing* 55°C 30 detik, dan ekstensi 72°C 10 detik), dan ekstensi akhir 72°C selama 4 menit. Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarose 1%, bufer Tris-acetate-EDTA (TAE) konsentrasi 1X, GelRed® Biotium, dan DNA *ladder* VC 100 bp (Vivantis).

Ekstraksi DNA

Isolat hasil subkultur diekstraksi dengan metode perebusan (12) dan sedikit modifikasi. Koloni diambil menggunakan ose steril dan disuspensikan ke dalam 50 µl *nuclease-free water* dalam tabung *microcentrifuge* 1,5 ml. Suspensi divorteks hingga homogen kemudian direbus selama 10 menit dalam *waterbath* kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 1 menit.

Penentuan serotipe kapsul dengan PCR

Amplifikasi dengan PCR multipleks dilakukan untuk mendeteksi keberadaan serotipe K1, K2 dan K5 (14). Primer spesifik untuk K1, K2, dan K5 disajikan pada

Tabel 1. Reagen yang digunakan untuk PCR kapsul ini adalah: 12,5 µl GoTaq® Green Master Mix 2X, masing-masing 0,5 µl primer *forward* dan *reverse* 20 µM, 4 µl templat DNA, dan *nuclease-free water* hingga 25 µl. Kondisi PCR yang digunakan adalah: denaturasi awal 94°C selama 1 menit, diikuti 35 siklus amplifikasi (denaturasi 94°C 30 detik, *annealing* 59°C 45 detik, dan ekstensi 72°C 1 menit 30 detik), dan ekstensi akhir 72°C selama 6 menit. Visualisasi ampikon dilakukan menggunakan gel agarose 1%, bufer TAE 1X, GelRed® Biotium, dan DNA *ladder* VC 100 bp (Vivantis).

Tabel 1. Pasangan primer untuk deteksi serotipe kapsul *Klebsiella pneumoniae*

Nama Primer	Sekuen DNA	Serotipe Kapsul	Amplikon (bp)	Referensi
magA_for	(F) 5'- GGTGCTCTTTACATCATTGC-3'	K1	1283	(15)
magA_rev	(R) 5'- GCAATGGCCATTTGCGTTAG-3'			
K2_for	(F) 5'- CAACCATGGTGGTTCGATTAG-3'	K2	531	(16)
K2_rev	(R) 5'- TGGTAGCCATATCCCTTTGG-3'			
K5wzxF360	(F) 5'- TGGTAGTGATGCTCGCGA-3'	K5	280	(15)
K5wzxR639	(R) 5'- CCTGAACCCACCCAATC-3'			

Lolos Kaji Etik

Keterangan lolos kaji etik dikeluarkan oleh Komite Etik Penelitian Rumah Sakit Umum (RSU) Kabupaten Tangerang dengan nomor 445/035 – KEP-RSUTNG.

Hasil

Sebanyak 30 isolat *K. pneumoniae* dari berbagai spesimen klinis seperti sputum, darah, pus, dan jaringan telah dikumpulkan. Lima belas isolat (50%) merupakan *K. pneumoniae* penghasil ESBL (Tabel 2).

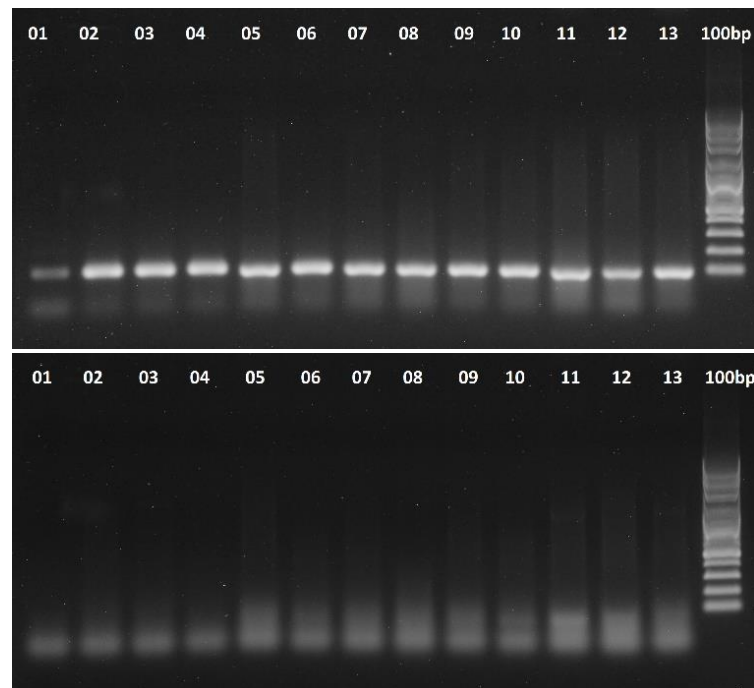
Tabel 2. Karakteristik isolat *Klebsiella pneumoniae* asal spesimen klinis

ESBL								
Kode Sampel	ESBL	KP	Kapsul K1, K2, K5	Kode Sampel	ESBL	KP	Kapsul K1, K2, K5	
HP12 01	+	+	-	HP12 16	-	+	-	
HP12 02	+	+	-	HP12 17	-	+	-	
HP12 03	-	+	-	HP12 18	-	+	-	
HP12 04	+	+	-	HP12 19	-	+	-	
HP12 05	+	+	-	HP12 20	-	+	-	
HP12 06	+	+	-	HP12 22	+	+	-	
HP12 07	+	+	-	HP12 23	+	+	-	
HP12 08	-	+	-	HP12 24	-	+	-	
HP12 09	+	+	-	HP12 25	+	+	-	
HP12 10	+	+	-	HP12 26	-	+	-	
HP12 11	+	+	-	HP12 27	+	+	-	
HP12 12	+	+	-	HP12 28	-	+	K2	
HP12 13	-	+	-	HP12 29	-	+	-	
HP12 14	-	+	-	HP12 30	+	+	-	
HP12 15	-	+	-	HP12 31	-	+	-	

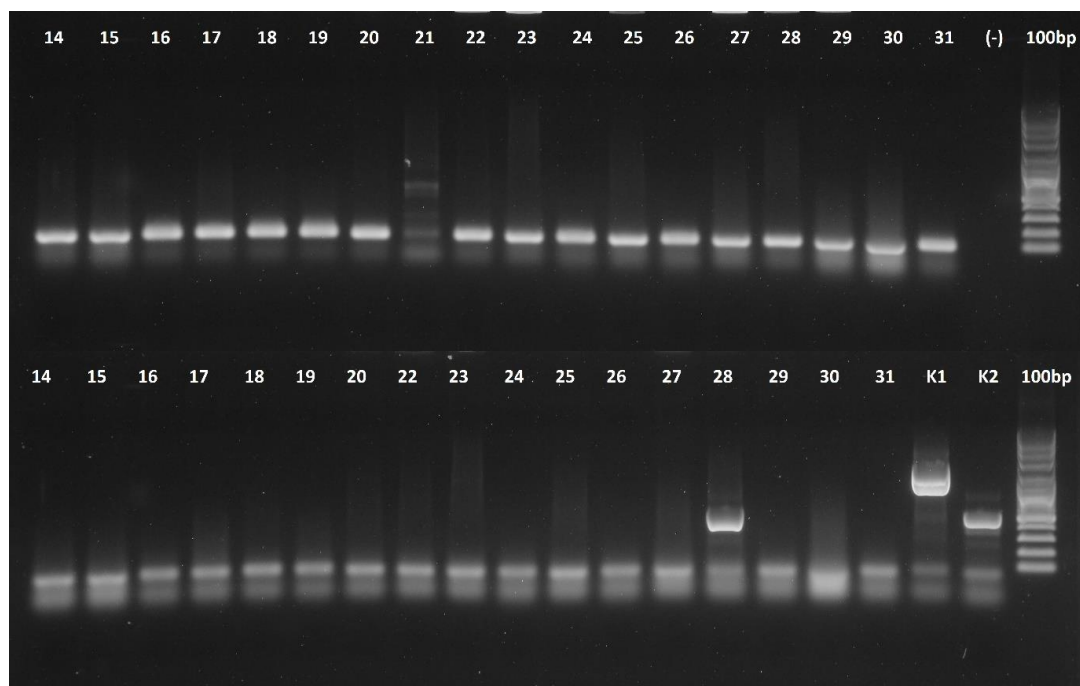
Dari total 31 sampel yang diperoleh, hanya satu isolat yang tidak dapat dikonfirmasi dengan PCR yaitu sampel dengan kode HP12 21 (nomor urut 21) pada

Gambar 2 atas. Seluruh isolat yang terkonfirmasi *K. pneumoniae* (30) diproses untuk tahap selanjutnya. Pemeriksaan PCR menggunakan primer untuk mendeteksi genotipe kapsul K1, K2, dan K5 menunjukkan hanya satu isolat yang positif memiliki genotipe kapsul K2 (

Gambar 2 bawah) sedangkan serotipe K1 dan K5 tidak ditemukan.



Gambar 1. Elektroforesis gel isolat HP12 01–13. Atas: Hasil PCR konfirmasi *K. pneumoniae*. Bawah: Hasil PCR multipleks serotipe kapsul K1, K2, dan K5



Gambar 2. Elektroforesis gel isolat HP12 14–31. Atas: Hasil PCR konfirmasi *K. pneumoniae*. Bawah: Hasil PCR multipleks serotipe kapsul K1, K2, dan K5

Diskusi

Angka *K. pneumoniae* penghasil ESBL dalam penelitian ini (50%) lebih tinggi dibandingkan di negara-negara maju di Eropa (27–42%) dan Amerika Utara (9,3–11%) (17). Hal ini mengundang perhatian terutama jika infeksi terjadi di fasilitas pelayanan kesehatan (18). Di Asia Tenggara dan Asia Timur sendiri angka *K. pneumoniae* penghasil ESBL adalah 15–60% (19). Di antara bakteri Gram negatif oportunistik, *K. pneumoniae* memiliki keragaman distribusi ekologi, komposisi DNA, gen resisten antimikroba, dan plasmid yang lebih tinggi sehingga berpotensi besar menularkan gen resisten ke patogen penting lainnya (20). Gen-gen ESBL biasanya disandi dalam plasmid yang dapat berpindah

secara spontan antar- dan sesama spesies dalam famili *Enterobacteriaceae* melalui transfer gen horizontal (21). Sehingga keberadaan *K. pneumoniae* penghasil ESBL ini dapat menjadi sumber penularan resistensi ke patogen lainnya. Penelitian tentang *K. pneumoniae* penghasil ESBL di Cina pada tahun 2008–2012 menunjukkan bahwa cKP penghasil ESBL (50%) secara signifikan lebih umum ditemukan dibanding hvKP penghasil ESBL (9,09%) (22). Demikian juga dengan penelitian yang dilakukan tahun 2013, meskipun ada peningkatan persentase (12,6%), hvKP penghasil ESBL masih lebih jarang ditemukan dibandingkan cKP penghasil ESBL (42,7%) (23).

Deteksi serotipe kapsul K1, K2, dan K5 sebagai penanda hvKP dalam penelitian ini menunjukkan bahwa satu-satunya isolat yang terdeteksi memiliki serotipe K2 tidak menghasilkan ESBL. Tidak ditemukannya serotipe K1 dalam penelitian ini sejalan dengan studi sebelumnya yang mengukur prevalensi *K. pneumoniae* serotipe K1 di Asia di mana frekuensi K1 lebih tinggi di Cina, India, Jepang, Korea, Singapura, Taiwan, dan Vietnam namun tidak ditemukan pada isolat asal Indonesia, Sri Lanka, dan Thailand (15). Akan tetapi hasil penelitian yang sama menunjukkan bahwa serotipe yang dominan ditemukan di Indonesia adalah K5 dengan prevalensi 68%, bertolak belakang dengan temuan dalam penelitian ini di mana tidak ada serotipe K5 yang terdeteksi (15). Penelitian terbaru pada isolat *K. pneumoniae* yang dikumpulkan pada tahun 2019 di empat rumah sakit di Uganda menunjukkan bahwa prevalensi serotipe K5 lebih tinggi dibandingkan serotipe lainnya (24). Variasi temuan dalam berbagai penelitian dalam rentang waktu yang berbeda menunjukkan bahwa kolaborasi penelitian perlu dilakukan dengan cakupan wilayah yang lebih luas di Indonesia untuk mendapatkan gambaran yang lebih komprehensif tentang status penyebaran dan beban kesehatan yang ditimbulkan oleh *K. pneumoniae*.

Kesimpulan

Di antara *K. pneumoniae* yang diisolasi dari berbagai spesimen klinis, hanya satu isolat yang terdeteksi memiliki serotipe kapsul K2 (3%). Tidak ada serotipe K1 dan K5 yang ditemukan dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Hu Y, Anes J, Devineau S, Fanning S. *Klebsiella pneumoniae*: Prevalence, Reservoirs, Antimicrobial Resistance, Pathogenicity, and Infection: A Hitherto Unrecognized Zoonotic Bacterium. *Foodborne Pathog Dis*. 2021 Feb 1;18(2):63–84.
- Ashurst J V., Dawson A. *Klebsiella Pneumonia* [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Oct 5]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30085546>
- De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(3).
- WHO. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report: 2021 [Internet]. 2021 [cited 2022 Oct 5]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027336>
- Wang L, Shen D, Wu H, Ma Y. Resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* to both intracellular and extracellular killing of neutrophils. *PLoS One*. 2017 Mar 1;12(3).
- Doorduyn DJ, Rooijackers SHM, van Schaik W, Bardoel BW. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology*. 2016 Oct 1;221(10):1102–9.
- Huang X, Li X, An H, Wang J, Ding M, Wang L, et al. Capsule type defines the capability of *Klebsiella pneumoniae* in evading Kupffer cell capture in the liver. *PLoS Pathog*. 2022 Aug 1;18(8):e1010693.
- Russo TA, Olson R, Fang CT, Stoesser N, Miller M, MacDonald U, et al. Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2018 Sep;56(9).
- Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jun 19;32(3).
- Yang J, Li Y, Tang N, Li J, Zhou J, Lu S, et al. The human gut serves as a reservoir of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Gut Microbes*. 2022 Dec 31;14(1).
- Lee CR, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha CJ, et al. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Nov 21;7.
- Dashti A, Jadaon M, Abdulsamad A, Dashti H. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Medical Journal*. 2009 Jun 1;41.
- Chander Y, Ramakrishnan M, Jindal N, Hanson K, Goyal S. Differentiation of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine, The*. 2011 Jan 1;9:138–42.
- Compain F, Babosan A, Brisse S, Genel N, Audo J, Ailloud F, et al. Multiplex PCR for Detection of Seven Virulence Factors and K1/K2 Capsular Serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2014 Dec;52(12):4377–80.

15. Chung DR, Park MH, Kim SH, Ko KS, Kang CI, Peck KR, et al. Prevalence and molecular characterization of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* strains from various clinical specimen sources in 11 Asian countries. *Journal of Infection*. 2012 Jun;64(6):622–5.
16. Yu W, Fung C, Ko W, Cheng K, Lee C, Chuang Y. Polymerase Chain Reaction Analysis for Detecting Capsule Serotypes K1 and K2 of *Klebsiella pneumoniae* Causing Abscesses of the Liver and Other Sites. *J Infect Dis*. 2007 Apr 15;195(8):1235–6.
17. Lob SH, Biedenbach DJ, Badal RE, Kazmierczak KM, Sahm DF. Antimicrobial resistance and resistance mechanisms of Enterobacteriaceae in ICU and non-ICU wards in Europe and North America: SMART 2011–2013. *J Glob Antimicrob Resist*. 2015 Sep;3(3):190–7.
18. Yamasaki S, Shigemura K, Osawa K, Kitagawa K, Ishii A, Kuntaman K, et al. Genetic analysis of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from UTI patients in Indonesia. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2021 Jan;27(1):55–61.
19. Jean SS, Coombs G, Ling T, Balaji V, Rodrigues C, Mikamo H, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of pathogens causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2010–2013. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Apr;47(4):328–34.
20. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2018;45:131–9.
21. Doi Y, Adams-Haduch JM, Peleg AY, D'Agata EMC. The role of horizontal gene transfer in the dissemination of extended-spectrum beta-lactamase–producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in an endemic setting. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Sep;74(1):34–8.
22. Liu YM, Li B Bin, Zhang YY, Zhang W, Shen H, Li H, et al. Clinical and molecular characteristics of emerging hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in mainland China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(9):5379–85.
23. Zhang Y, Zhao C, Wang Q, Wang X, Chen H, Li H, et al. High Prevalence of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Infection in China: Geographic Distribution, Clinical Characteristics, and Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Oct;60(10):6115–20.
24. Ssekatawa K, Byarugaba DK, Nakavuma JL, Kato CD, Ejobi F, Tweyongyere R, et al. Prevalence of pathogenic *Klebsiella pneumoniae* based on PCR capsular typing harbouring carbapenemases encoding genes in Uganda tertiary hospitals. *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. 2021;10(1):57. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13756-021-00923-w>