

Analisis Tipe *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*) Isolat *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Sunarjati Sudigdoadi

Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

Abstrak

Resistensi *methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) terhadap berbagai antimikrob terutama didasari adanya insersi *mobile genetic elements* yang disebut *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*) pada kromosom *Staphylococcus aureus*. SCC*mec* tersusun atas gen rekombinase (*ccr*), gen kompleks *mec*, gen resisten tambahan, dan *insertion sequences*. Struktur gen rekombinase memungkinkan SCC*mec* dapat berpindah dari satu bakteri ke bakteri lainnya. Identifikasi dan analisis SCC*mec* sangat diperlukan untuk mengetahui dasar genetik resistensi dan memperkirakan penyebaran bakteri ini. Penelitian ini bertujuan menganalisis tipe SCC*mec* dan hubungannya dengan pola kepekaan MRSA terhadap berbagai antimikrob. Penelitian ini adalah penelitian observasional analitik dengan pendekatan molekuler berupa *typing* SCC*mec* dan uji kepekaan terhadap antimikrob, periode Juli–Desember 2007. Pembiakan dan identifikasi 45 isolat MRSA dilakukan di Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Unpad, sedangkan penentuan gen *mecA* dan PCR multipleks SCC*mec* dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Palembang. Seluruh 45 isolat MRSA yang diteliti, dipastikan memiliki gen *mecA*. Analisis PCR multipleks menunjukkan 40 isolat memiliki SCC*mec* tipe III dan 5 isolat memiliki tipe IV. Semua isolat dengan SCC*mec* tipe III bersifat multiresisten, sedangkan tipe IV tidak bersifat multiresisten. Dapat disimpulkan bahwa MRSA dengan genotip SCC*mec* tipe III berhubungan, sedangkan tipe IV tidak berhubungan dengan sifat multiresisten. [MKB. 2010;42(4):149–54].

Kata kunci: *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), pola kepekaan, tipe SCC*mec*

Staphylococcal Casette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Type Analysis of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates

Abstract

Resistance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were based mainly on insertion of mobile genetic elements namely *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*) in the chromosome of *Staphylococcus aureus*. SCC*mec* consists of recombinase genes (*ccr*), *mec* genes complex, additional resistance genes, and insertion sequences. Recombinase genes structure mediates transfer of SCC*mec* from one bacteria to another. Identification of SCC*mec* is very important to know basic genetic resistance and to predict spreading of MRSA. The aim of this research was to analyze SCC*mec* type and antimicrobial susceptibility patterns. The design of this study was observational analytic study by typing SCC*mec* and antimicrobial susceptibility testing on July– December 2007. Isolation and identification of 45 MRSA isolates was performed in the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Padjadjaran, whereas identification of *mecA* gene and typing of SCC*mec* by multiplex PCR was performed in the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Sriwijaya University, Palembang. The result showed that all isolates contained *mecA* gene. Multiplex PCR revealed that 40 MRSA isolates had SCC*mec* type III and 5 isolates with type IV. All SCC*mec* type III isolates were multiresistant and all of the type IV were not multiresistant. In conclusion, MRSA isolates with SCC*mec* type III was associated with multiresistant whereas type IV was not. [MKB. 2010;42(4):149–54].

Key words: *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), susceptibility patterns, type of SCC*mec*

Korespondensi: Dr. Sunarjati Sudigdoadi, dr., MS., Sp.MK, Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, jalan Raya Bandung-Sumedang Km. 21 Jatinangor Sumedang, telepon (022) 7794557, *mobile* 0811225351, *e-mail*: titi_sa@hotmail.com

Pendahuluan

Staphylococcus aureus merupakan bakteri kokus gram positif, memiliki genom kromosom sirkuler sekitar 2.800 kb (kilobasa) yang dapat membawa plasmid dan transposon. Infeksi yang ditimbulkan bakteri ini dapat diatasi dengan pemberian antimikrob golongan betalaktam seperti penisilin. Antimikrob betalaktam mengikat *penicillin binding protein* (PBP) sehingga sintesis dinding sel gagal dan bakteri mengalami lisis.^{1,2}

Galur resisten *S. aureus* memiliki gen *blaZ* yang menyandi enzim betalaktamase, yaitu enzim yang mampu mendegradasi penisilin dengan cara memecah cincin betalaktam. Pada akhir tahun 1950-an, masalah resistensi terhadap betalaktam ini dapat diatasi dengan pemberian antimikrob yang tahan betalaktamase, yaitu metisilin. Isolat *S. aureus* yang peka terhadap metisilin disebut *methicillin sensitive Staphylococcus aureus* (MSSA). Sekitar satu tahun setelah penggunaan metisilin di rumah sakit, di Inggris ditemukan isolat *S. aureus* resisten metisilin yang disebut *methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).³

Nama lain MRSA, yaitu *healthcare acquired MRSA* atau *healthcare associated MRSA* (HA-MRSA), menyebar cepat ke seluruh rumah sakit di dunia dan memiliki fenotip multiresisten, yaitu resisten terhadap semua antimikrob betalaktam dan dua atau lebih antimikrob nonbetalaktam.⁴ Obat pilihan untuk terapi infeksi MRSA adalah vankomisin, tetapi pada tahun 1996 ditemukan penyebaran MRSA yang menurun kepekaannya terhadap vankomisin.⁵

Data tahun 1998–1999 menunjukkan bahwa sekitar 25% isolat *S. aureus* penyebab infeksi di rumah sakit di Amerika Serikat adalah MRSA.⁶ Prevalensi MRSA di berbagai rumah sakit di dunia berkisar 2–70% dengan angka rata-rata 20%.^{6–8} Prevalensi <5% dijumpai di Belanda dan beberapa negara Skandinavia karena ketatnya penggunaan antimikrob serta keberhasilan program pengendalian infeksi MRSA.⁸ Noviana⁹ melaporkan bahwa prevalensi MRSA di Rumah Sakit Atmajaya Jakarta pada tahun 2003 mencapai 47%. Pada 1998, di Amerika Serikat ditemukan *community-acquired MRSA* atau *community-associated MRSA* (CA-MRSA)¹⁰ yang tidak menunjukkan fenomena multiresisten serta lebih virulen dibandingkan dengan HA-MRSA karena membawa faktor virulen tambahan, yaitu protein

panton valentin leukocidin (PVL).^{9,10}

Ito dkk.¹¹ menemukan, faktor yang mendasari resistensi MRSA adalah elemen genetik yang disebut *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*). Mekanisme integrasi elemen genetik tersebut dan asalnya belum sepenuhnya diketahui. Gen *mecA* adalah bagian *conserved* pada elemen genetik SCC*mec* MRSA, menyandi PBP mutan PBP2a atau PBP2' seberat 76 kDa. Eksperimen dan eksplorasi genetik menunjukkan bahwa mekanisme resistensi MRSA terhadap antimikrob betalaktam diperankan oleh operon *mecA* yang memiliki organisasi, struktur, fungsi, dan mekanisme serupa dengan operon *blaZ* pada plasmid *S. aureus* produsen betalaktamase. Gen *mecA* menjadi baku emas identifikasi MRSA dengan *polymerase chain reaction* (PCR).^{11,12}

Mekanisme resistensi MRSA terhadap antimikrob nonbetalaktam diduga didasari adanya bukti bahwa SCC*mec* mengandung transposon seperti Tn554 pada ujung 5' *mecA* dan *insertion sequences* seperti IS431 pada ujung 3' *mecA*.¹³ *Insertion sequences* IS431 memiliki kemampuan rekombinasi dan menjadi determinan resistensi terhadap merkuri, kadmium, dan tetrasiklin. Gen lain yang berada di sekitar SCC*mec* seperti gen *gyrA* juga diduga berinteraksi dengan SCC*mec* mengakibatkan resistensi terhadap kuinolon.¹³

Berbagai temuan dalam 10 tahun terakhir menunjukkan perubahan pola distribusi MRSA, kepekaan terhadap berbagai antimikrob, dan kemungkinan perubahan pada tipe SCC*mec*.^{14,15} Berdasarkan uraian di atas, analisis tipe SCC*mec* dan hubungannya dengan pola kepekaan MRSA terhadap berbagai antimikrob penting dilakukan.

Metode

Desain penelitian adalah observasional analitik terhadap pembiakan MRSA, uji kepekaan antimikrob, dan *typing* SCC*mec*. Isolasi, identifikasi, dan deteksi MRSA dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Bandung, sedangkan penentuan gen *mecA* dan *typing* SCC*mec* di Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Palembang, periode Juli–Desember 2007.

Sampel berupa isolat bakteri dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Bandung. Isolat standar atau kontrol

adalah *S. aureus* ATTC 25923. Isolasi *S. aureus* menggunakan media agar darah, diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Dari isolat dibuat preparat apus dengan pewarnaan Gram dan uji koagulase untuk membedakan dari koagulase negatif *staphylococcus* (CoNS). Uji kepekaan terhadap antimikrob menggunakan produk Oxoid, UK, dengan metode difusi cakram media *Mueller Hinton agar* (MHA). Inokulasi dilakukan dengan sengkelit steril pada permukaan medium kemudian diletakkan cakram oksasilin 1/5 µg dan diinkubasi 36 jam pada suhu 30°C.¹⁶ Oksasilin dipilih karena lebih stabil, sensitif terhadap isolat heteroresisten, dan secara komersial tersedia di pasaran dibandingkan dengan metisilin. Cakram antimikrob beta laktam lainnya juga digunakan, yakni penisilin dan amoksisilin serta beberapa nonbetalaktam, yaitu eritromisin, norflokasin, gentamisin, dan vankomisin. Pembacaan zona hambatan minimal dalam skala millimeter sesuai protokol CLSI tahun 2007.¹⁷

Identifikasi MRSA dikonfirmasi melalui deteksi gen *mecA* dengan PCR, kemudian dilakukan *typing SCCmec* dengan PCR multipleks sesuai metode yang digunakan oleh Zhang dkk.¹⁸ Amplifikasi dilakukan dalam mesin *i-cycler* Biorad (Biorad System, USA) dengan denaturasi inisial 94°C selama 5 menit, 10 siklus

94°C selama 45 detik, 65°C selama 45 detik, dan 72°C selama 90 detik, kemudian 25 siklus 94°C selama 45 detik, 55°C selama 45 detik, 72°C selama 90 detik diikuti ekstensi final 72°C selama 10 menit sampai 4°C. Pemeriksaan PCR pada target tunggal, misalnya SCC tipe III dilakukan dengan kondisi denaturasi inisial 94°C selama 5 menit diikuti 30 siklus 94°C selama 1 menit, 50°C selama 1 menit dan 72°C selama 2 menit serta ekstensi final 72°C selama 10 menit.

Hasil

Dilakukan uji kepekaan terhadap 45 isolat *S. aureus* pada media MHA untuk melihat pola kepekaan isolat tersebut terhadap tujuh macam antimikrob.

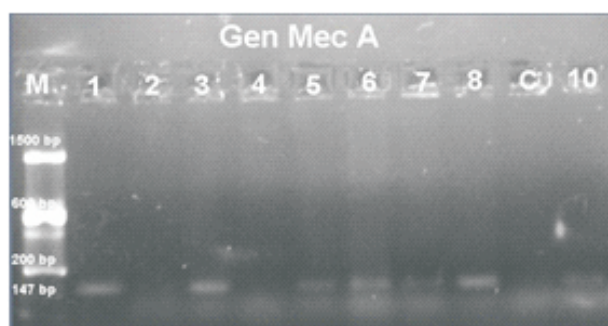
Presentase hasil uji kepekaan dapat dilihat pada Tabel 1. Semua isolat resisten terhadap oksasilin, berarti isolat tersebut adalah MRSA. Satu isolat ternyata telah resisten terhadap antimikrob golongan glikopeptida (vankomisin).

Ekstraksi DNA berhasil dilakukan pada semua isolat dengan metode *rapid DNA extraction* berdasarkan metode Zhang dkk.¹⁸ Identifikasi MRSA dilakukan dengan deteksi gen *mecA*, yaitu sebesar 147 bp (*base pair*). Hasil

Tabel 1 Jumlah (Presentase) Isolat yang Sensitif (S) atau Resisten (R) terhadap Berbagai Antimikrob

Kepekaan	Oxa	Pen	Amp	Van	Gen	Ery	Nor
Sensitif (S)	0 (0)	1 (2)	1 (2)	44 (98)	5 (11)	5 (11)	5 (11)
Resisten (R)	45 (100)	44 (98)	44 (98)	1 (2)	40 (89)	40 (89)	40 (89)

Keterangan: Oxa: oksasilin/metisilin, Pen: penisilin, Amp: ampisilin, Van: vankomisin, Gen: gentamisin, Ery: eritromisin, Nor: norflokasin

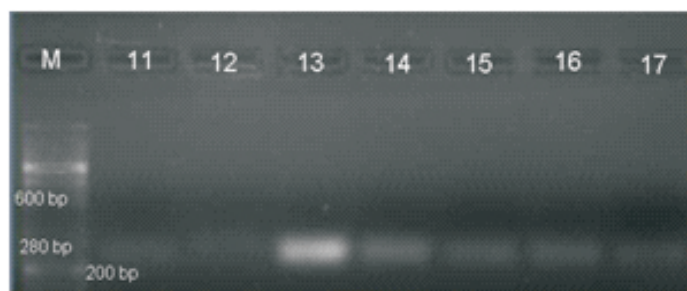


Gambar 1 Hasil Identifikasi Gen *mecA* dengan Metode PCR

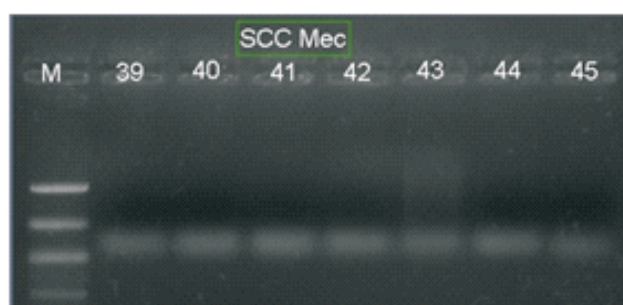
Identifikasi ini dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarosa 2% dan etidium bromida. Visualisasi dilakukan dengan alat *Biorad Geldoc*. Tampak amplikon sebesar 147 bp pada semua lajur kecuali lajur kontrol negatif (C) serta lajur 2 dan 4 (sampel MSSA sebagai pembanding) isolat tidak memiliki gen *mecA*

Tabel 2 Hasil PCR Multipleks Tipe SCCmec Isolat MRSA

Tipe SCCmec	Jumlah	
	Frekuensi	Persentase
I	0	0
II	0	0
III	40	89
IV	5	11



Gambar 2 Hasil PCR Multipleks Menunjukkan Pita DNA Sekitar 280 bp, yaitu SCC Tipe III



Gambar 3 Hasil Identifikasi Gen SCCmec dengan Metode PCR Multipleks Menggunakan Sepasang Primer. Amplikon Terlihat dengan Jelas pada Posisi 490 bp yang Menunjukkan SCCmec Tipe IV

yang didapatkan menunjukkan bahwa dari 45 isolat, seluruhnya (100%) positif memiliki pita amplikon 147 bp yang berarti seluruh isolat tersebut memiliki gen *mecA*. Seluruh amplikon kemudian diidentifikasi dengan PCR multipleks. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil *typing* SCCmec dengan metode PCR multipleks terlihat pada Tabel 2 dan gambaran tipe SCCmec III dan IV terlihat pada Gambar 2 dan 3.

Tabel 3 memperlihatkan bahwa mayoritas isolat pada penelitian ini bersifat multiresisten.

Pembahasan

Semua isolat *S. aureus* resisten terhadap oksasilin dan >80% resisten terhadap antimikrob lainnya, kecuali hanya satu isolat yang resisten terhadap

vankomisin. Temuan ini sejalan dengan penelitian di Thailand, Singapura, serta beberapa negara Asia lainnya. Di Indonesia hal ini cukup menarik karena vankomisin belum digunakan secara luas, berarti paparan vankomisin terhadap populasi bakteri masih minimal. Isolat yang resisten tersebut kemungkinan karena mengalami mutasi spontan, terjadi akuisisi faktor resisten dari tempat lain, atau dari populasi bakteri enterokokus di sekitarnya.⁵

Penelitian ini juga menggambarkan bahwa jumlah isolat yang resisten terhadap antimikrob nonbetalaktam cukup tinggi. Resistensi terhadap aminoglikosida (gentamisin) dan makrolida (eritromisin) mencapai lebih dari 80%. Resistensi terhadap kuinolon (norfloksasin) juga tinggi, lebih dari 70%. Resistensi terhadap antimikrob nonbetalaktam terjadi terutama karena adanya

interaksi berbagai determinan resisten pada *SCCmec* atau interaksi determinan resistensi yang berada di luar *SCCmec* dengan *SCCmec*. Gen *aac6'* dan gen *erm* pembawa resistensi terhadap eritromisin merupakan suatu bagian integral dari *SCCmec*. Gen *gyr* penentu resistensi terhadap kuinolon tidak berada dalam *SCCmec* tetapi berada di kromosom yang insersinya berdekatan dengan *SCCmec*.¹³

Mayoritas isolat pada penelitian ini bersifat multiresisten, hal ini sejalan dengan teori bahwa isolat yang berasal dari rumah sakit lebih bersifat multiresisten. Penelitian sebelumnya menyatakan demikian, bahkan studi di India menyebutkan bahwa sampai tahun 2004 semua isolat MRSA rumah sakit bersifat multiresisten.¹⁴ Temuan ini sesuai dengan hasil penelitian di 11 negara Asia termasuk Indonesia yang menyebutkan bahwa MRSA dari Indonesia (isolat dari Jakarta), India, Filipina, Saudi Arabia, Srilanka, China, Thailand, Singapura, serta Vietnam mayoritas mengandung *SCCmec* tipe III, sedangkan dari Korea dan Jepang *SCCmec* tipe II.^{19,20} Di luar Asia, *SCCmec* tipe III lazim ditemukan pada populasi Amerika Selatan, sedangkan *SCCmec* tipe II lazim ditemukan pada populasi Eropa.⁷ Makna penting dari hasil penelitian ini bahwa MRSA yang ditemukan mayoritas adalah isolat multiresisten, memiliki *SCCmec* yang lazim ditemukan di sebagian besar negara Asia dan Amerika Selatan. Secara umum dikatakan bahwa penggunaan antimikrob di wilayah tersebut tidak sebaik di Eropa Barat maupun Amerika Serikat. Regulasi dan penggunaan rasional antimikrob di klinik merupakan keadaan yang sudah sangat mendesak, supaya tidak terjadi induksi resistensi yang demikian cepat. Kekhawatiran tentang peningkatan isolat resisten, hasil tersebut juga mengindikasikan bahwa secara genetik MRSA dengan *SCCmec* tipe III bersifat lebih stabil dibandingkan dengan *SCCmec* tipe lainnya. Argumentasi yang ada sejauh ini adalah karena *SCCmec* tipe III berukuran paling besar sehingga relatif lebih stabil dari waktu ke waktu.¹¹

Disimpulkan bahwa 40 isolat *S. aureus* memiliki *SCCmec* tipe III dan 5 isolat memiliki *SCCmec* tipe IV. Semua isolat yang memiliki *SCCmec* tipe III bersifat multiresisten dan semua isolat yang memiliki *SCCmec* tipe IV bersifat nonmultiresisten. Dari simpulan ini dapat dikatakan bahwa MRSA dengan genotip *SCCmec* tipe III berhubungan dengan sifat multiresisten,

sedangkan MRSA dengan genotip *SCCmec* tipe IV berhubungan dengan sifat nonmultiresisten.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan kolaborasi dengan Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya Palembang, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada Yuwono yang telah membantu pelaksanaan pemeriksaan molekuler isolat pada penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med*. 1998; 339:520-32.
2. Grayson ML. The treatment triangle for *Staphylococcal* infections. *N Engl J Med*. 2006;355:724.
3. Chambers HF. Methicillin resistant in *Staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10: 781-9.
4. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*. 2003; 111:1265-73.
5. Trakulsomboon S, Danchaiwijitr S, Rongrungruang Y, Dhiraputra C, Susaemgrat W, Ito T, dkk. First report of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* reduced susceptibility to vancomycin in Thailand. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:591-5.
6. Bell JM, Turnidge JD. High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Asia-Pacific and South Africa: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998-1999. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:879-81.
7. Denis O, Deplano A, Nonhoff C, De Ryck R, de Mendonca R, Rottiers S, dkk. National Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgian Hospitals indicates rapid diversification of epidemic clones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:3625-9.
8. Vos MC, Ott A, Verbrugh HA. Successful search-and-destroy policy for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Netherlands *J Clin Microbiol*. 2005;43:2034-5.
9. Noviana H. Isolasi dan uji kepekaan isolat klinis ORSA dan nonORSA terhadap vankomisin dan antibiotik lainnya. *J Mikrob Indon*. 2004; 9:51-4.
10. Fey PD, Salim BS, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, dkk. Comparative molecular analysis of community or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:196-203.
11. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N,

- Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, dkk. Structural comparison of three types of *Staphylococcal cassette chromosome mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45: 1323-36.
12. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, dkk. Novel type of *staphylococcal cassette chromosome mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:1147-52.
 13. Schmitz FJ, Fluit AC, Hafner D, Beeck A, Perdikouli M, Boos M, dkk. Development of resistance to ciprofloxacin, rifampin and mupirocin in methicillin susceptible and resistant *S. aureus* isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44: 3229-31.
 14. Arakere G, Nadig S, Swedberg G, Macaden R, Amarnath SK, Raghunath D. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Strains from two hospitals in Bangalore, South India. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3198-202.
 15. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, dkk. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:4289-94.
 16. Brown D, Cookson B. Detection of MRSA. Dalam: Fluit AC, Schmitz FJ, editor. *MRSA: current perspectives*. Norfolk England: Caister Academic Press; 2003. hlm. 11-30.
 17. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth Informational Supplement. 2007;27 (1):M100-S17.
 18. Zhang K, McClure J, Elsayed S, Louie T, Conly J. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of *staphylococcal cassette chromosome mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5026-33.
 19. Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, dkk. *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian Countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:1001-12.
 20. Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai K, Jamklang M, dkk. Novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis*. 2002;186:1344-7.