

## Patogenisitas Streptokokus Grup B pada Mencit Neonatus

(PATHOGENICITY OF GROUP B STREPTOCOCCI ON NEONATAL MOUSE)

Zinatul Hayati<sup>1</sup>, Teuku Fadrial Karmil<sup>2</sup>

1. Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Syiah Kuala Darussalam Banda Aceh, Telp./Fax 0651-7551843, email: hayatikarmil@yahoo.com
2. Lab Klinik Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala Jl Syech Abdul Rauf No 4, Nangroe Aceh Darussalam, Banda Aceh, 23111.

### ABSTRACT

Group B Streptococci (GBS) are the major cause of serious infections in neonates, including pneumonia, septicemia and meningitis. Considering that GBS bacteria founded in Indonesia in our previous study is dissimilar as what have been found in foreign country particularly in its serotype distribution, therefore this research is extremely essential to be conducted in Indonesia in order to searching the vaccine candidate to be used in Indonesia. This research focused in pathogenicity test of each GBS isolates on animal model. Pathogenicity experiment has been done by *early onset* septicemia model approach to neonatal mouse. Pathogenicity test result that SR-7 isolates can cause the death of neonatal mouse 100% in *early-onset infection*. Whereas, SV-2 isolates cannot cause the neonatal mouse neither in *early-onset* nor in *late-onset*. From the serotype determination result at previous research found that SR-7 isolates is serotype isolates VI whilst SV-2 isolates is serotype III. This result has shown that SR-7 (serotype VI) isolates is the most pathogen and the SV-2 isolates is less pathogen.

Key words: Grup B Streptococci, septicemia, meningitis, mice.

### PENDAHULUAN

Meningkatnya kejadian infeksi neonatal yang disebabkan oleh SGB akhir-akhir ini telah dilaporkan oleh banyak peneliti. Schuchat *et al.*, (2000) melaporkan angka kejadian infeksi neonatal *early-onset* yang disebabkan oleh SGB adalah 1,4 kasus per 1000 kelahiran. Infeksi SGB *early-onset* biasanya terjadi akibat penularan melalui transmisi vertikal dari maternal. Sekitar 75% dari kasus infeksi SGB adalah infeksi dalam bentuk *early-onset* yaitu infeksi yang terjadi pada usia 1-6 hari. Kejadian infeksi *early-onset* meningkat pada infan prematur, hal tersebut mungkin disebabkan karena adanya defisiensi opsonin dan terbatasnya transfer antibodi maternal. Infeksi *late-onset* terjadi setelah minggu pertama kelahiran hingga usia 2-3 bulan. Kapsul polisakarida sebagai antigen permukaan dan hialuronidase sebagai produk ekstraseluler bakteri dapat berperan sebagai faktor virulensi (Edwards dan Baker 1995; Tumbaga dan Philip 2003, Hayati 2004, Hayati *et al.*, 2007).

Manifestasi klinik infeksi dalam bentuk *early-onset* yang paling sering terjadi adalah

pneumonia (35-55% kasus). Pada keadaan yang lebih berat dapat terjadi sepsis yang disertai dengan kegagalan pernafasan (*respiratory distress*), perfusi yang jelek dan syok. Septikemia terjadi pada 25-40% kasus, keadaan tersebut dapat menimbulkan kematian dalam beberapa jam. Manifestasi klinik yang lain adalah meningitis yang terjadi pada 5-10% kasus (Edwards dan Baker 1995; Tumbaga dan Philip 2003). Manifestasi klinik infeksi *late-onset* yang paling sering terjadi adalah meningitis. Pada bayi-bayi yang selamat dari kematian, 25-50% kasus akan meninggalkan gejala neurologik yang permanen (*sequele*) seperti kemunduran/retardasi mental, kebutaan dan ketulian (Edwards dan Baker, 1995; Gibbs dan Sweet, 1994; Eriksen dan Blanko 1993; Tissi *et al.*, 1998).

Imunisasi aktif untuk wanita yang akan melahirkan telah diteliti dalam beberapa dekade. Konsep tersebut dibuat berdasarkan pemikiran tentang adanya antibodi IgG Ibu yang dapat melintas secara transplasental ke janinnya (Baker *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2003). Penelitian tersebut dilakukan untuk mengetahui tingkat patogenisitas Streptokokus

Grup B (SGB) pada hewan percobaan sebagai landasan pemilihan kandidat vaksin untuk imunoprofilaksis infeksi neonatal.

## METODE PENELITIAN

### Isolasi dan Identifikasi Bakteri

Bakteri SGB diisolasi dari *swab vagina* (SV) dan *swab rektum* (SR) Ibu hamil yang mengalami komplikasi obstetri dengan menumbuhkannya pada media *agar base* yang ditambah darah domba 5%. Identifikasi dilakukan dengan uji *Christie, Atkins and Munch Petersen* (CAMP) dan uji imunodifusi melalui *Agar Gel Precipitation Test* (AGPT) (Hayati *et al.*, 2004).

### Uji *Christie, Atkins and Munch Petersen* (CAMP)

Bakteri yang morfologi koloninya mirip dengan morfologi koloni SGB yang diperoleh dari hasil isolasi primer dipilih untuk isolasi sekunder. Preidentifikasi terhadap kandidat SGB tersebut dilakukan dengan uji CAMP. Untuk melakukan uji CAMP dibutuhkan agar darah domba 5% (Merck, Darmstadt, German). *Staphylococcus aureus* strain K-39 digoreskan secara vertikal, kemudian tegak lurus dengan goresan tersebut dibuat goresan dari semua isolat kandidat SGB berjarak kira-kira 3- 5 mm. Biakan diinkubasi dalam inkubator selama 18 – 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri menunjukkan reaksi positif bila adanya hemolisis sempurna berbentuk kepala panah (*arrowhead*) atau bentuk setengah bulan di daerah zona hemolitik *S. aureus*. Bakteri-bakteri yang menunjukkan reaksi positif pada uji ini selanjutnya ditentukan serogrupnya dengan menggunakan uji imunodifusi.

### Penentuan Serogrup

#### a. Ekstraksi Antigen Autoklaf.

Preparasi antigen dilakukan dengan cara ekstraksi menggunakan autoklaf. Bakteri ditumbuhkan dalam 50 ml *Todd Hewitt Broth* (THB) (Gibco, Karlsruhe, German) pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam lalu disentrifus 3000 rpm selama 10 menit, pelet yang diperoleh dicuci sebanyak 2 kali dengan 5 cc NaCl 0,14 M. Pelet yang terakhir dilarutkan dengan 0,35 ml NaCl 0,14 M dan dihomogenkan. Suspensi tersebut kemudian ditetesi dengan indikator *phenol red* dan dinetralkan dengan menggunakan NaOH 1 N dengan pH netral sehingga suspensi

berwarna merah jambu/merah. Suspensi selanjutnya diautoklaf selama 15 menit pada suhu 120°C kemudian disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm dan supernatan yang dihasilkan digunakan sebagai antigen. Sebelum digunakan antigen tersebut disimpan pada suhu –20°C.

#### b. Produksi Antibodi Monospesifik-grup terhadap SGB

Bakteri referens dibiakkan dalam 50 ml THB selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Sedimen bakteri yang diperoleh setelah disentrifus 3000 rpm selama 10 menit, disuspensikan ke dalam PBS 5 ml kemudian diagitasi. Hal tersebut dilakukan 3 kali dan untuk sedimen yang terakhir ditambahkan 5 ml *phosphate buffer saline* (PBS)/NaCl fisiologis lalu diagitasi. Untuk melakukan inaktivasi, suspensi tersebut ditangas dalam *waterbath* selama 1-2 jam pada suhu 60°C. Suspensi tersebut siap digunakan sebagai immunogen.

Minggu pertama hari ke-1, kelinci disuntik secara intravena (vena auricularis) dengan 1 ml vaksin. Pada minggu kedua dan ketiga hari ke-1, 2 dan 3 kelinci diberikan *booster* masing-masing sebanyak 1 ml. Pada minggu ketiga hari ke-7 dilakukan pengambilan darah dari arteri aurikularis sebanyak 2 ml, masukkan dalam inkubator selama 2 jam kemudian disimpan dalam *freezer* selama satu malam. Cairan bening yang terbentuk dimasukkan dalam tabung baru, lalu spesifisitas antibodi terhadap grup diuji dengan mereaksikan antiserum dengan antigen ekstraksi autoklaf melalui AGPT. Jika belum memberikan reaksi positif maka vaksinasi dilanjutkan pada minggu keempat. Pada hari ke-7 serum diuji kembali, jika hasil uji ini memberikan reaksi positif maka darah kelinci dapat dipanen seluruhnya.

#### c. Uji serogrup melalui AGPT.

Untuk membuat media agar, ke dalam sebuah *erlenmeyer* dicampur 0,4 gram *agarose* (Serva, Heiderberg, German) dan 1,2 gram *polyetylen-glycol* (PEG 6000, Serva), kemudian dilarutkan dalam 20 ml akuades dan 20 ml PBS 0,5 M, pH 7,2. Suspensi tersebut ditangas pada air mendidih sehingga campuran tersebut larut secara sempurna. Dengan menggunakan pipet ukur 10 ml agar cair suam-suam kuku dituangkan pada 6 buah gelas objek dan ditunggu sampai mengeras. Pada agar tersebut dibuat sumur-sumur untuk antigen dan anti-sera homolognya dengan menggunakan *gel puncter*. Ke dalam sumur di bagian tengah

diisikan anti-sera sedangkan antigen-antigen yang diuji dimasukkan pada sumur-sumur yang mengelilinginya. Rak yang berisi gelas objek tersebut kemudian ditaruh pada tempat tertutup yang telah diberi alas kertas saring basah untuk menjaga kelembabannya. Reaksi tersebut dibaca setelah 18 – 48 jam dengan melihat garis presipitasi pada daerah antara antigen dan antisera yang homolog.

**Uji Patogenisitas**

Uji patogenisitas dilakukan dengan pendekatan model *septicemia early-onset* pada mencit neonatus yang dilakukan oleh Rodewald *et al.*, (1992). Bakteri SGB yang digunakan adalah SGB yang telah diisolasi dari penderita komplikasi obstetri yaitu *strain* SV-1, SV-2, SR-6, SR-7, SV-14, SV-17, SR-21, SR-22, SV-24 dan SR-30. Hewan coba yang digunakan adalah mencit *strain* DDY yang diperoleh dari PT. Biofarma Bandung. Mencit neonatus usia 0-48 jam dibagi menjadi 10 kelompok, tiap kelompok perlakuan menggunakan 5 ulangan. Masing-masing kelompok diberikan injeksi suspensi bakteri dengan masing-masing *strain* SGB. Pengamatan terhadap kematian akibat infeksi *early-onset* dilakukan hingga 48 jam kemudian, sedangkan pengamatan terhadap infeksi *late-onset* dilakukan 48 jam hingga 2 minggu kemudian (Rodewald *et al.*, 1992; Mancuso *et al.* 1994).

**a. Preparasi Inokulum.** Setiap *strain* bakteri diinokulasi dalam 50 ml *Todd-Hewitt broth* pada suhu 37°C selama semalam, kemudian disentrifus 3000 rpm selama 10 menit dan dibilas 2 kali dengan PBS. Pelet terakhir diresuspensi dalam PBS dan dikalibrasi hingga setara dengan larutan Mc. Farlan 0.5. Suspensi tersebut kemudian diencerkan secara bertingkat hingga sebanyak 5 kali hingga setara dengan 10<sup>4</sup> bakteri/ml.

**b. Penyuntikan bakteri SGB.** Mencit neonatus usia 0-48 jam diinfeksi dengan SGB secara intraperitoneal. Sepuluh kelompok mencit masing-masing diberikan injeksi suspensi bakteri dengan masing-masing *strain* SGB sebanyak 0,1 ml yang mengandung 10<sup>4</sup> bakteri/ml. Kelompok kontrol diberikan injeksi PBS 0,1 ml (Rodewald *et al.*, 1992; Mancuso *et al.*, 1994).

**c. Kultur Darah.** Untuk membuktikan adanya septikemia, 4-8 jam pascainfeksi darah

mencit neonatus diambil dengan cara punksi *percutaneous cardiac* dengan jarum berukuran 27G. Darah yang diperoleh dimasukkan dalam larutan *tryptic soy agar* yang masih hangat-hangat kuku (46°C) dalam *plate* steril lalu dicampur sambil memutar-mutar *plate*. Koloni yang representatif dikonfirmasi dengan uji CAMP.

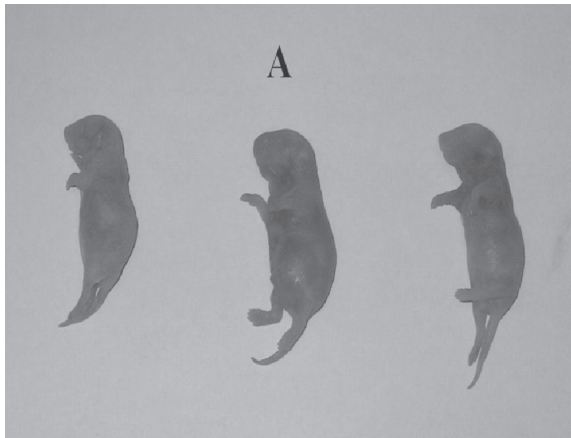
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Hasil Uji Patogenisitas**

Hasil uji patogenisitas SGB memperlihatkan bahwa isolat SR-7 dapat menimbulkan kematian mencit neonatal 100% dalam bentuk *early-onset* (Tabel 1). Sebaliknya isolat SV-2 tidak menimbulkan kematian pada mencit neonatal baik dalam bentuk *early-onset* maupun *late-onset*, demikian pula dengan kelompok kontrol. Hasil tersebut menunjukkan bahwa isolat SR-7 adalah isolat yang paling patogenik sedangkan SV-2 adalah sebaliknya. Hasil penentuan serotipe pada penelitian sebelumnya didapat bahwa isolat SR-7 adalah isolat dengan serotipe VI sedangkan isolat SV-2 adalah serotipe III. Di Amerika Serikat SGB serotipe III adalah serotipe yang paling sering terisolasi dari infeksi *late-onset* (Lin *et al.*, 1998).

Tabel. Hasil uji patogenisitas SGB isolat dari penderita komplikasi obstetri pada mencit neonatal

Kelompok Perlakuan	Jumlah Kematian/ Jumlah Perlakuan		
	Infeksi Early-onset	Infeksi Late-onset	Survive
SV-1 (serotipe III)	80%	0%	10%
SV-2 (serotipe III)	0%	0%	100%
SR-6 (serotipe VIII)	0%	20%	60%
SR-7 (serotipe VI)	100%	0%	0%
SV-14 (serotipe VI)	80%	0%	10%
SV-17 (serotipe VI)	60%	0%	20%
SR-21 (serotipe VI)	60%	0%	20%
SR-22 (serotipe VII)	80%	10%	0%
SV-24 (serotipe VII)	60%	10%	20%
SR-30 (serotipe VII)	0%	10%	80%
Kontrol	0%	0%	100%



Gambar 1. Mencit neonatal yang mengalami kematian akibat septikemia.

Kematian mencit pada selang waktu 0-48 jam diakibatkan oleh infeksi *early-onset*. Mencit yang mengalami kematian menunjukkan gejala klinis seperti kurang nafsu makan, lemah, pucat, terjadi penggembungan di bagian perut yang disertai perut berwarna hitam (Gambar). Hal tersebut diduga disebabkan oleh septikemia. Septikemia merupakan suatu kondisi sepsis berat dengan adanya agen penginfeksi di dalam darah yang dikonfirmasi dengan kultur (Young 1995). Kasus infeksi SGB *early-onset* yang sering dijumpai ialah pneumonia (35-55%) dan septikemia (25-40%), sedangkan meningitis jarang terjadi (4-6%). Kasus meningitis lebih sering dijumpai pada infeksi SGB *late-onset* (Tumbaga dan Philip, 2003).

Infeksi SGB pada fetus terjadi akibat adanya bakteri SGB dalam cairan amnion menuju jalur asenden sehingga bakteri masuk dalam kantong amnion dan menimbulkan aspirasi *in utero* atau melalui aspirasi cairan vagina pada saat melewati jalan lahir. Hal ini mengawali terjadinya pneumonia, bakteri masuk dalam sel epitel dan sel endotel paru fetus. Tahap berikutnya bakteri masuk dalam aliran darah dan menghasilkan infeksi sistemik (Rubens *et al.*, 1992; Tamura *et al.*, 1994).

### SIMPULAN

Bakteri SGB SR-7 (tipe VI) merupakan SGB yang paling patogenik yang dapat menimbulkan kematian pada 100% mencit neonatal dalam bentuk infeksi *early-onset*.

### SARAN

Perlu dilakukan uji imunogenisitas SGB SR-7 dan kajian yang lebih spesifik dan mendalam tentang karakter kapsul polisakarida tipe VI SGB serta perannya sebagai imunogen yang dapat digunakan sebagai landasan pengembangan vaksin konjugat kapsul polisakarida.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DP2M DIKTI yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Penelitian Hibah Bersaing XIV tahun 2006-2007.

### DAFTAR PUSTAKA

- Baker CJ *et al.* 1999. Safety and Immunogenicity of Capsular Polysaccharide-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccines for Group B Streptococcal Types Ia and Ib. *J Infect Dis* 179:142-150.
- Baker CJ *et al.* 2000. Use of Capsular Polysaccharide-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine for Type II Group B Streptococcus in Healthy Women. *J Infect Dis* 182:1129-38.
- Baker CJ, Rench MA, McInnes P. 2003. Immunization of Pregnant Women with Group B Streptococcal Type III Capsular Polysaccharide-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine. *Vaccine* 21:3468-72.
- Edwards MS, Baker CJ. 1995. *Streptococcus Agalactiae* (Group B Streptococcus). In: Mandell GL, JE Bennet, R Dolin; *Principle and Practice of Infectious Disease*. 4<sup>th</sup> ed. (Eds). Churcill Livingstone.
- Eriksen NL and Blanco JD. 1993. Group B Streptococcal Infection In Pregnancy. *Seminars In Perinatology* 17:432-442.
- Gibbs RS and Sweet RL. 1994. Clinical Disorders p. 639-657. In: Creasy RK and Resnik R. *Maternal-Fetal Medicine Principle and Practice*. 3<sup>rd</sup> ed. W. B. Saunders comp.
- Hayati Z, Poetranto, WS., Wibawan IWT, Budiarti S, Karmil TF. 2007. Aktivitas Hialuronidase Bakteri Streptokokus Grup B pada Substrat Asam Hialuronat. *Jurnal Veteriner*, 8 (2): 47-53

- Hayati Z, Wibawan IWT, Karmil TF, Wahyuni AETH. 2004. Insidensi Kolonisasi Asimtomatik SGB pada Ibu Hamil Sehat. *J Ilmiah Pertanian Gakuryoku*. X:182-185.
- Hayati Z. 2004. Serotype Distribution and Fenotype Expression of Group B Streptococcus Isolates from Pregnant Women with Obstetric Complication [abstrak]. Di dalam: Seminar Nasional XI PERSADA; Bogor, 5 Juni 2004. Bogor: PERSADA Cab. Bogor & Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. abstr no C9
- Lin FYC *et al.* 1998. Capsular Polysaccharide Types of Group B Streptococcal Isolates from Neonates with Early-Onset Systemic Infection. *J Infect Dis* 177:790-792.
- Mancuso G *et al.* 1994. Beneficial Effects of Interleukin-6 in Neonatal Mouse Models of Group B Streptococcal Disease. *Infect Immun*. 62:4997-5002.
- Rodewald AK, Ouderdonk AB, Warren HB, Kasper DL. 1992. Neonatal Mouse Model of Group B Streptococcal Infection. *J Infect Dis* 166:635-9.
- Rubens CE, Smith S, Hulse M, Chi EY, Van Belle GR. 1992. Respiratory Epithelial Cell Inivation by Group B Streptococci. *Infect Immun* 60:5157-5163.
- Schuchat A *et al.* 2000. Risk Factors and Opportunities for Prevention of Early-Onset Neonatal Sepsis: A Multicenter Case-Control Study. *Pediatrics*. 105:21-26.
- Tamura GS, Kuypers JM, Smith S, Raff H, Rubens CE. 1994. Adheren of Group B Streptococci to Cultured Epithelial Cells: Roles of Inviromental Factors and Bacterial Surface Components. *Infect Immun* 62: 2450-2458.
- Tissi L *et al.* 1998. Role of Group B Streptococcal Capsular Polysaccharides in The Induction of Septic Arthritis. *J Med Microbiol* 47:717-723.
- Tumbaga PF, Philip AGS. 2003. Perinatal Group B Streptococcal Infections: Past, Present, and Future. *American Academy of Pediatrics NeoReviews* 4:1-14.
- Young LS. 1995. Sepsis Syndrome. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. *Principle and Practice of Infectious Desease*, p: 690-705. 4<sup>th</sup> Ed. (Eds). Churcill Livingstone.