

DIAGNOSIS " MULTI DRUG RESISTANT MYCOBACTERIUM " TUBERCULOSIS

Agus Sjahrurachman

Departemen Mikrobiologi FKUI

Pendahuluan

Pada tahun 1963, WHO menyimpulkan bahwa morbiditas dan mortalitas TB terus meningkat dan menyatakan bahwa TB merupakan kegawat darutan global .Tiga negara dinyatakan sebagai negara dengan " disease burden" tertinggi, yaitu Cina, India dan Indonesia. Masalah menjadi makin meluas karena hasil " global survellance " menunjukkan bahwa Mycobacterium yang bersamaan resisten terhadap rifampisin dan isoniazid (INH), dan selanjutnya disebut sebagai MDRTb, ditemukan di semua negara yang mengadakan surveilans. Peningkatan prevalensi MDRTb ini akan meningkat seandainya keberhasilan program pengendalian Tb tidak optimal dan prevalensi infeksi oleh Human Immunodeficiency virus (HIV) terus meningkat.

Kasus MDRTb tersebut, yang pengobatannya jauh lebih sukar daripada kasus Tb biasa, tidak hanya membahayakan dirinya tetapi juga menular bagi masyarakat sekitarnya.Karena itu kasus tersebut harus diidentifikasi dengan benar dan cepat agar pengobatan dapat dilakukan dengan tepat dan secepatnya. Mengingat bahwa diagnosa MDRTb adalah bukanlah diagnosis klinis, maka pemeriksaan uji kepekaan menjadi sangat penting dalam tatalaksana kasus MDRTb, apalagi pernyataan kesembuhan juga didasarkan atas hasil pemeriksaan biakan Mtb.

Mekanisme kerja obat

Rifampisin

Rifampisin merupakan obat yang aktif terhadap MTB yang tumbuh dan juga aktif terhadap Mtb dalam fase stasioner. Daya antibakterial rifampisin terjadi melalui hambatan sintesa RNA, yaitu dengan jalan berikatan pada RNA polimerase kuman. RNA polimerase ini merupakan oligomer yang tersusun dari empat rantai, yaitu 2 rantai alfa dan satu rantai beta dan satu rantai beta nascent. Tiap rantai disandi oleh leh berbeda, dengan rantai beta disandi oleh ben rpbeta.

Isoniazid

INH adalah obat yang aktif terhadap MTB yang membelah dan tidak aktif terhadap MTB dalam fase stasioner. INH juga tidak bekerja dalam suasana anaerob, INH adalah " prodrug " yang masuk ke dalam kuman dengan cara pasif. Prodrug selanjtnya akan diubah oleh katalase G Mtb menjadi bentuk aktif.Aktifasi menghasilkan berbagai oksigen dan senyawa reaktif yang menyerang target di dalam kuman, yaitu sintesa asam mikolat, metabolisme NAD dan mungkin juga merusak DNA. Akibatnya kuman mudah lisis. Dalam

sintesa asam mikolat, diperlukan juga enoyl ACP reductase, NADH dehydrogenase, dan alkyl hydroperoxidase. Secara berurutan enzim-enzim tersebut disandi oleh berturut-turut gen *inhA*, *ndh* dan *ahpC*. Sementara katalase disandi oleh gen *katG*. Selain itu, diketahui pula bahwa aktifitas gen *katG* diatur oleh regulatornya yaitu gen *furA*.

Mekanisme resistensi

Pada *Mtb* belum pernah dilaporkan adanya plasmid pembawa resistensi, karena itu resistensi *Mtb* terhadap OAT tidak dipindahkan dari satu kuman ke kuman lain. Dengan kata lain, terjadinya resistensi *Mtb* terhadap OAT terutama terjadi karena mutasi genetik pada *Mtb* sendiri, dan mutasi ini terjadi secara alami, tidak dibawah tekanan OAT. Penyebaran resistensi *Mtb* terjadi pasca amplifikasi kuman resisten sebagai akibat inadekuatnya obat disekitar kuman.

Rifampisin

Pada *Mtb*, resistensi terhadap rifampisin terjadi pada satu dari sepuluh sampai seratus juta kuman. Resistensi pada > 95% *Mtb* terhadap rifampisin terjadi akibat mutasi pada gen *rpoB*. Mutasi masif pada gen *rpoB* akan menyebabkan tingkat resistensi tinggi dan resistensi silang terhadap semua anggota golongan rifampisin. Umumnya mutasi terjadi selektif dan sebagian besar terjadi pada kodon 511,516,518 dan 522. Mutasi pada kodon tersebut akan menyebabkan resistensi silang pada rifapentin, tetapi tidak pada rifabutin. Resistensi tingkat lebih rendah terjadi akibat mutasi pada kodon L176F.

Isoniazid

Resistensi *Mtb* terhadap INH akibat hilangnya gen *katG* akan menyebabkan resistensi tingkat tinggi, Fenomena ini jarang dan yang lebih sering terjadi adalah mutasi noktah. Frekuensi kuman resisten terhadap INH akibat dari mutasi gen *katG* bervariasi antara 20-80%, tergantung asal *Mtb*. Diantara berbagai mutasi pada *katG*, mutasi pada daerah S315T merupakan yang tersering, teramati pada kira-kira 50% isolat. Mutasi pada S315T ini menyebabkan aktifitas katalase berkurang 50% dan karena itu tingkat resistensi yang ditimbulkannya cukup tinggi. Telah diketahui pula bahwa aktifitas gen *katG* diatur oleh gen lain, yaitu gen *furA*. Mutasi gen *furA* telah ditemukan pada *mycobacteria* lain, tetapi belum ditemukan pada *Mtb*

Mutasi pada gen *inhA* yang telah teridentifikasi adalah pada "promoter"-nya dan pada gen strukturalnya. Resistensi pada *inhA* terjadi pada 15-43% isolat yang resisten INH dan menyebabkan tingkat resistensi rendah. Namun mutasi pada *inhA* ini beresiko besar menyebabkan juga resistensi pada etambutol. Berbagai lokus mutasi *inhA* penyebab resistensi terhadap INH telah diketahui, diantaranya adalah pada lokus S94A,121T dan 121V.

Konfirmasi MDRTb secara mikrobiologik

Pemeriksaan mikrobiologik untuk konfirmasi MDR-TB dapat berupa pemeriksaan fenotifik, yang merupakan pemeriksaan kondisi faktual dan pemeriksaan genotifik. Pemeriksaan fenotipik dapat dilakukan dengan jalan memaparkan kuman terhadap obat dan selanjutnya melihat (i). ada-tidaknya pertumbuhan kuman, (ii) membandingkan jumlah kuman yang dipaparkan terhadap obat dibandingkan kontrolnya. Ada tidaknya pertumbuhan kuman dapat diamati dengan melihat koloni khas Mtb secara makroskopik atau mikroskopik atau menggunakan indikator warna yang akan/tidak berubah warnanya jika ada/tidak ada pertumbuhan kuman.

1. Cara fenotifik

Dasar cara ini adalah hambatan pertumbuhan Mtb pada media yang mengandung obat antituberkulosis (OAT). Media yang dipakai merupakan media padat baik yang "egg-based" atau "agar-based". Dalam penerapannya, cara ini dapat berupa cara langsung ataupun cara tak langsung. Pada cara langsung, sputum dicairkan lebih dahulu dan kuman didalamnya dipekatkan dengan sentrifugasi. Setelah jumlah kuman disesuaikan dengan bakunya, kuman ditanamkan pada media mengandung OAT. Keberhasilan cara ini sangat bergantung pada jumlah kuman hidup yang ada di dalam sputum penderita. Pada penderita yang sedang dalam pengobatan, sebagian dari kuman telah mati akibat pengaruh OAT. Dibandingkan dengan cara tak langsung, cara langsung lebih banyak gagal/biasnya, apalagi jika diterapkan pada daerah endemis HIV. Pada cara tak langsung, kuman dari bahan dibiakkan dan didiferensiasi antara Mtb dan Non Tuberculous mycobacterium (NTM). Isolat Mtb dengan viabilitas tinggi dalam jumlah sesuai baku dipaparkan pada OAT yang terdapat dalam media. Cara konvensional ini dapat dibagi lagi atas 3 cara, yaitu: cara proporsi, cara rasio resisten dan cara absolut.

a. Cara proporsi

Cara proporsi merupakan cara yang paling banyak digunakan. Pada cara ini, sejumlah Mtb sesuai baku dan yang viabilitasnya tinggi ditanamkan pada media mengandung OAT, sementara sebagai kontrol isolat tersebut ditanam pada media tanpa OAT. Pembacaan hasil umumnya dilakukan pada hari ke 28 dan jika hasil pada hari 28 meragukan, pembacaan diulang pada hari ke 42, kecuali jika memakai media Middlebrook 7H10/11 dan inkubasinya pada lingkungan CO₂ 10% yang dapat dibaca pada hari ke 21. Pada pembacaan, jumlah koloni Mtb yang tumbuh pada media mengandung OAT dibandingkan dengan jumlah koloni Mtb yang ditanam pada media yang tak mengandung OAT. Umumnya Mtb dinyatakan sensitif terhadap obat, jika jumlah koloni yang tumbuh pada media dengan obat maksimum 1% dibandingkan jumlah koloni Mtb pada media tanpa

OAT. Untuk cara ini, konsentrasi OAT dalam media tergantung pada jenis media yang dipakai.

b. Cara rasio resisten

Penyimpulan apakah Mtb sensitif atau resisten terhadap OAT tertentu didasarkan atas perhitungan rasio kadar hambat minimal (KHM) OAT untuk kuman dari penderita dibandingkan KHM kuman baku (umumnya galur H37RV yang bersifat “ pansusceptible “ . Isolat Mtb dinyatakan sensitif terhadap OAT tertentu jika rasio KHM maksimum 2 dan dinyatakan resisten jika rasio KHM minimum 8.

c. Cara konsentrasi absolut

Pada cara ini Mtb yang akan diuji ditanam pada media yang mengandung berbagai kadar OAT dan pada media kontrol. Pembacaan dilakukan antara minggu 4-6. Mtb dinyatakan sensitif terhadap OAT tertentu jika pada media dengan konsentrasi tertentu jumlah koloninya kurang dari 20 sedangkan pada media kontrol, jumlah koloninya harus 3+ atau 4+.

d. BACTEC Radiometrik

Pada cara ini Mtb ditanam pada media cair Middlebrook 7H9 yang mengandung asam palmitat yang dilabel dengan karbon radioaktif. Pertumbuhan Mtb akan melepas CO₂ radioaktif dan selanjutnya dideteksi dengan alat yang tersedia. Dengan paparan pada OAT, hambatan pertumbuhan Mtb yang dinyatakan sebagai indek pertumbuhan dilakukan harian. Hasil uji kepekaan didapat lebih cepat dibandingkan dengan pada media padat. Cara ini merupakan cara yang sangat baik untuk uji kepekaan Mtb terhadap OAT lini pertama dan kedua, namun sekarang hampir tidak dipakai lagi karena alasan keamanan terhadap radioaktif

e. Cara Mycobacterial Growth Index (MGIT).

Cara ini menggunakan media cair Middlebrook 7H9 yang dimodifikasi. Pada dasar botol media terdapat indikator yang akan berfluorosensi jika kadar oksigen dalam botol menurun sebagai akibat pertumbuhan Mtb. Tingkat fluorosensi dapat diukur secara manual ataupun secara otomatis. Pada cara manual, fluorosensi diamati sejak hari kedua dan isolat Mtb dinyatakan resisten jika fluorosensi terjadi bersamaan sampai dua hari kemudian dibandingkan kontrolnya. Cara manual ini dapat pula diterapkan untuk uji kepekaan langsung dari sputum. Cara MGIT ini telah diakui oleh Ferederal Drug Administration (FDA) Amerika dan setara dengan uji kepekaan cara konvensional maupun BACTEC radiometrik.

f. Cata berdasarkan bakteriofaga

Dasar cara ini adalah kemampuan bakteriofaga yang mampu berkembang biak pada kuman. Secara ringkas, Mtb ditanam pada media padat yang mengandung OAT dan selanjutnya mycobacteriofaga diinfeksi pada isolat. Jika terdapat Mtb yang masih berkembang biak, maka mycobacteriofaga akan tumbuh didalamnya dan jumlah akan sesuai dengan jumlah Mtb. Selanjutnya jumlah mycobacteriofaga yang menginfeksi Mtb diukur jumlahnya dengan memakai Mycobacterium smegmatis yang tumbuh cepat. Terdapat dua format uji kepekaan berdasarkan mycobacteriofaga ini. Format pertama dengan jalan menghitung " plaque " (M smegmatis yang lisis dalam bentuk noktah), dan format kedua memakai gen penyandi enzim luciferase yang di ligasi pada DNA mycobacteriofaga. Enzim luciferase yang dibentuk dengan bantuan Adenosin Triphosphate (ATP) sel akan menghasilkan foton yang dideteksi dengan film atau luminimeter. Cara bakteriofaga telah cukup banyak diteliti dengan hasil baik

g. Cara kolorimetrik

Beberapa cara kolorimetrik telah dikembangkan dalam beberapa tahun terhair ini. Dasarnya dalah penggunaan indikator redoks atau garam tetrazolium untuk mendeteksi pertumbuhna Mtb. Reduksi indikator yang timbul akibat pertumbuhan Mtb dalam media akan mengubah warna indikator. Alamar blue merupakan indikator pertama yang dipakai. Alamar blue berwarna biru dalam keadaan teroksidasi dan menjadi merah dalam keadaan tereduksi. Hasil uji kepekaan dengan menggunakan alamar blue didapat dalam 1-2 minggu. Pada berbagai kajian, akurasi hasilnya cukup tinggi. Indikator lain adalah garam tetrazoilum atau MTT yang berwarna kuning dan jika tereduksi akan berubah menjadi MTT formazan yang tak larut dan berwarna " purple ". Intensitas warna MTT formazan dapat diukur setelah senyawa tersebut dilarutkan kembali. Hasil uji kepekaan juga akan didapat dalam dua minggu dan hasil beberapa kajian menunjukkan bahwa akurasinya cukup tinggi. Setelah diketahuinya bahwa komponen utama lamar blue adalah resazurin, maka dikembangkan Resazurin microtiter asaay (REMA). Rema telah dikaji penggunaan sebagai cara uji kepekaan cepat untuk mennetukan MDRTb dengan akurasi sekitar 97%. REMA juga telah dikaji untuk OAT lini kedua. Cara kolorimetrik lain medasarkan pada kemampuan Mtb mereduksi nitrat menjadi nitrit. Perubahan nitrat menjadi nitrit ini kemudian di deteksi dengan senyawa indikator dan disebut sebagai cara Nitrate Reduction Assay (NRA). Mtb yang resisten terhadap OAT akan terus tumbuh dalam media mengandung OAT tersebut dan mengubah nitrat dalam media menjdi nitrit, sebaliknya Mtb yang sensitif tidak akan tumbuh dalam media yang mengandung OAT tersebut dan tak akan mengubah nitrat menjadi

nitrit. Dalam berbagai kajian, NRA mempunyai akurasi tinggi untuk rifampisin, INH dan etambutol namun agak rendah untuk streptomisin.

h. Cara Microscopic observation broth-drug susceptibility assay (MODS)

Dasar cara MODS adalah pertumbuhan Mtb pada media cair akan membentuk formasi khas yang disebut sebagai “ cord formation “ yang dapat dideteksi secara mikroskopik dengan mikroskop terbalik (inverted microscope). Formasi ini akan terbentuk dalam waktu sekitar 9 hari. Jika inokulum merupakan Mtb yang resisten terhadap OAT tertentu dan dalam media MODS terdapat OAT tersebut, maka isolat Mtb tersebut akan tumbuh membentuk “ cord formation “, sementara Mtb yang peka tidak akan tumbuh. Pada kajian di Peru hasil uji kepekaan rata –rata didapat dalam waktu 7; 22 dan 68 hari untuk MODS, MGIT dan cara LJ dengan kesuaian hasil antara MODS dan cara baku adalah 97% untuk INH,100% untuk rifampisin dan 99% untuk MDRTb.

2. Cara genotifik

Seperti telah disebutkan diatas, resistensi Mtb terhadap OAT terjadi akibat mutasi gen Mtb dan bukan karena adanya plasmid atau gen yang berasal dari luar. Tempat mutasinya secara teoritis dapat terjadi pada gen struktural dan/atau gen regulatornya. Khususnya untuk rifampisin dan INH, sebagian terbesar gen penyebab mutasi telah diketahui. Prinsipnya uji kepekaan secara genotif meliputi dua tahap, yaitu amplifikasi gen penyandi resistensi (amplikon) dan penilaian mutasi pada gen tersebut. Dari berbagai cara genotifik, beberapa diantaranya telah banyak dikaji, yaitu :

a. Solid phase hybridization assay

Pada saat ini telah terdapat beberapa jenis kit komersial untuk cara solid phase hybridization assay, namun baru dua yang direkomendasikan oleh WHO untuk uji tapis MDRTb yaitu kit INNO-LiPArif dan kit Genotype MTBDR. Kit INNO-LiPA rif untuk menapis resistensi terhadap rifampisin dan kit Genotype MTBDR untuk menapis resistensi terhadap rifampisin dan INH. Kit INNO-LiPArif yang diluncurkan beberapa tahun lalu dilakukan dengan melakukan hibridisasi amplikon dengan 10 pelacak yang mencakup “core region “ dari gen rpoBeta yang telah direkatkan pada carik kertas nitroselulosa. Adanya hibridisasi dideteksi secara kolorimetrik , yaitu dengan melihat perubahan warna pita. Kit INNO-LiPArif dapat digunakan untuk uji kepekaan Mtb pasca isolasi maupun langsung dari sputum. Prinsip pemeriksaan dengan kit Genotype MTBDR sama dengan INNO-LiPA rif. Perbedaan utamanya adalah adanya pelacak untuk mutasi pada gen katG yang merupakan penyebab utama resistensi terhadap INH.

b. Microarray

Microarray dikenal juga sebagai biochip atau DNA chip merupakan teknologi hibridisasi DNA dari isolat atau specimen klinis dengan oligonukleotida yang direkatkan pada “ miniaturized glass slide “. Salah satu yang telah komersil adalah CombiChip Mycobacteria Resistance Detection DNA Chip untuk mendeteksi Mtb yang resisten terhadap rifampisin dan INH terhadap kodon 315 gen katG, mutasi gen inhA15 dan kodon 511;513;516;522;526;531;533 gen rpoB.

c. Real-time PCR

Real-time PCR merupakan cara yang relatif baru. Real-time PCR juga menggunakan berbagai pelacak seperti pelacak TaqMan, pelacak Fluorescent Resonance Energy transfer (FRET), molecular beacons dan biprobes. Karena sistimnya tertutup dan satu tahap, real-time PCR beresiko lebih kecil terkontaminasi. Kelebihan lain adalah hasilnya cepat. Kelemahan cara Real-Time PCR adalah biayanya mahal dan diperlukannya petugas dengan keahlian tinggi.

d. DNA sequencing

Sequencing DNA merupakan cara baku untuk mengetahui mutasi . Untuk itu gen yang akan disequencing diperbanyak dahulu dengan PCR. Cara sequencing dapat dilakukan manual atau otomatis

Catatan atas uji resistensi Mtb

Pengobatan Tb dikenal dalam berbagai tingkatan. Untuk yang bukan MTB dikenal kategori satu, dua dan sisipan. Untuk MDRTb regimen dan tata caranya sangat berbeda. Pemberian obat untuk MDRTb kepada kasus non MDRTb selain menghamburkan biaya, juga beresiko efek samping yang besar dan menurunkan angka kesembuhan. Sebaliknya penggunaan parsial obat untuk MDRTb juga beresiko mempermudah timbulnya XDRTb yang sampai saat ini belum ada regimen pengobatannya. Atas dasar itu penentuan MDRTb dan XDRTb harus dilakukan dengan tepat. Sudah tentu akan lebih bermanfaat jika hasil pemeriksaan juga cepat. Dalam konteks itu, sayangnya, sampai saat ini laboratorium yang telah tersertifikasi secara internasional sangat terbatas. Untuk uji kepekaan OAT lini pertama, laboratorium yang sudah tersertifikasi secara internasional di Indonesia adalah Laboratorium : Mikrobiologi FKUI, Rumah Sakit Persahabatan, Balai Pengujian Laboratorium Kesehatan Bandung, Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya dan Laboratorium NECHRI Makasar. Sedangkan untuk OAT lini dua adalah Laboratorium Mikrobiologi FKUI untuk ofloksasin, Kanamisin dan amikasin serta Rumah Sakit Persahabatan untuk ofloksasin dan kanamisin.