

Aplikasi Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dalam Mendeteksi *Streptococcus pneumoniae* Menggunakan Gen Autolysin (*LytA*) sebagai Faktor Virulensi dari Spesimen Klinis Sputum

Application of Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique to Detect Streptococcus pneumoniae Using Autolysin Gene (LytA) as A Virulence Factor in Clinical Specimens Sputum

Mustika Sari Hutabarat^{1,2*}, Firdaus Hamid³, Mutmainnah³, Nikmatia Latief³, Muh. Nassrum Massi⁴

¹Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Katolik Musi Charitas, Palembang

²Sekolah Pascasarjana, Universitas Hassanudin, Makassar

³Departemen Anatomi Fisiologi, Universitas Hassanudin, Makassar

⁴Departemen Mikrobiologi, Universitas Hassanudin, Makassar

*E-mail: mustikasarihutabarat33@gmail.com

Diterima: 4 Januari 2020

Direvisi: 10 Maret 2020

Disetujui: 15 September 2020

ABSTRACT

The polymerase chain reaction (PCR) technique can be used to detect *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) in sputum specimens of Invasive Pneumococcal Disease (IPD) patients. This technique has shown promising results, especially in the detection of community-acquired pneumococcal (PncCAP) community-acquired pneumonia. This study aimed to evaluate the molecular examination method using PCR technique to detect *S. pneumoniae* isolates using the Autolysin (*LytA*) gene in the sputum of patients with lower respiratory tract infections and patients suspected of having IPD. The samples collected were 100 sputum samples from patients infected with lower respiratory tract at Wahidin Sudirohusodo General Hospital, Makassar. *S. pneumoniae* isolates were confirmed by the growth of colonies growing on Blood Agar Plate (BAP) medium, gram staining, catalase test, Optochin-sensitivity test, and PCR test using the Autolysin (*LytA*) gene. The presence of the Autolysin (*LytA*) gene can be detected by conventional PCR. A total of 100 samples were gram-positive diplococcus bacteria, of which 93% were positive for catalase tests, 9% were confirmed using the Optochin sensitivity test and 21% of the isolates were confirmed as *S. pneumoniae* using the PCR-gene *LytA*. The Autolysin gene (*LytA*) can be used to detect *S. pneumoniae* isolates as early identification in clinical sputum samples in hospitals.

Keywords: *LytA*, Polymerase Chain Reaction (PCR), sputum, *Streptococcus pneumoniae*

ABSTRAK

Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat digunakan untuk mendeteksi *Streptococcus pneumoniae* (*pneumokokus*) pada spesimen sputum pasien *Invasive Pneumococcal Disease* (IPD). Teknik ini menunjukkan hasil yang menjanjikan terutama dalam mendeteksi *pneumococcal* yang terdapat pada masyarakat (*Pneumococcal community-acquired pneumonia* - PncCAP). Tujuan penelitian ini untuk mengevaluasi metode pemeriksaan molekuler (teknik PCR) untuk mendeteksi isolat *S. pneumoniae* dengan menggunakan gen *Autolysin (LytA)* pada sputum pasien infeksi saluran pernapasan bawah dan pasien yang diduga menderita IPD. Sampel yang dikumpulkan adalah 100 sampel sputum dari pasien yang terinfeksi saluran pernapasan bawah di RSUP Wahidin Sudirohusodo, Makassar. Isolat *S. pneumoniae* dikonfirmasi oleh pertumbuhan koloni yang tumbuh pada medium *Blood Agar Plate* (BAP), pewarnaan gram, uji katalase, uji sensitivitas *Optochin*, dan uji PCR dengan menggunakan gen *Autolysin (LytA)*. Adanya gen *Autolysin (LytA)* dapat terdeteksi oleh PCR konvensional. Sebanyak 100 sampel merupakan bakteri gram positif-*diplococcus* dengan uji katalase yang negatif 93%, 9% isolat sensitif terhadap uji sensitivitas *Optochin*, dan 21% isolat dikonfirmasi sebagai *S. pneumoniae* dengan gen *LytA* menggunakan PCR. Gen *Autolysin (LytA)* dapat digunakan untuk mendeteksi isolat *S. pneumoniae* sebagai identifikasi awal pada sampel klinis sputum di rumah sakit.

Kata kunci : *LytA*, Polymerase Chain Reaction (PCR), sputum, *Streptococcus pneumoniae*

Pendahuluan

Streptococcus pneumoniae (*Pneumokokus*) adalah bakteri flora normal pada saluran pernapasan atas. Dalam keadaan tertentu, *S. pneumoniae* dapat menjadi patogen dan menjadi penyebab penyakit yang dapat mengancam jiwa. Hal ini terjadi ketika kolonisasi nasofaring terbentuk dan terjadi infeksi pada sel target sehingga menyebabkan *invasive pneumococcal disease* (IPD)¹.

S. pneumoniae merupakan penyebab utama pneumonia di masyarakat (*pneumococcal community - acquired pneumonia - PncCAP*) yang dapat menyebabkan penyakit lain seperti meningitis, sinusitis, bronkitis, dan otitis pada anak-anak, orang dewasa dan usia lanjut². *S. pneumoniae* menghasilkan sejumlah faktor virulensi termasuk kapsul polisakarida yang efisien dalam melindungi bakteri dari fagosit, beberapa protein yang terletak di permukaan, dan toksin pneumolysin^{3,4}.

Protein permukaan memiliki peran dalam patogenesis *S. pneumoniae* dan dapat digunakan sebagai kandidat vaksin berbasis protein. Diantara protein yang berhubungan dengan protein permukaan *S. pneumoniae* adalah *LytA* (*N-acetylmuramoyl-L-alanine-amidase*)⁵. *LytA* bertanggung jawab terhadap terjadinya lisis sel yang diinduksi oleh *deoxycholate* dan penisilin pada fase stasioner⁶.

Autolysin (LytA) merupakan enzim utama dari *S. pneumoniae* yang merupakan kelompok enzim pendegradasi dinding sel yang tersebar di dalam kapsul. *LytA* berperan dalam fungsi fisiologi dan membantu diagnosis bakteri baik secara kultur dan molekuler^{6,7}.

S. pneumoniae diidentifikasi berdasarkan pola hemolisis saat dikultur pada media agar darah, uji biokimia, dan uji sensitivitas *Optochin (ethylhydrocupreine hydrochloride)* dengan zona bening >14 mm. Selain itu, identifikasi dilakukan juga dengan pewarnaan gram, reaksi *Quellung* (pembengkakan kapsul), kelarutan empedu atau *counter*

immuno-electrophoresis (CIE), dan antikoagulan^{2,8}.

Kasus pneumonia yang disebabkan *S. pneumoniae* jarang terdiagnosis karena adanya kesalahan identifikasi sampel klinis terduga pneumonia. Alasan lainnya adalah sulitnya membedakan *S. pneumoniae* dari *Streptococcus spp* pernapasan atas lainnya, seperti *S. viridians*. *S. pneumoniae* atipikal juga sulit dibedakan dari *S. pneumoniae non typable* (NT)^{9,10}. Pertumbuhan koloni bakteri tersebut sangat mirip di media agar darah lempeng, uji sensitivitas *Optochin*, dan uji kelarutan empedu (*bile solubility test*)¹¹.

Oleh karena itu, saat ini dikembangkan metode molekuler yang dapat mendeteksi berbagai protein sampai tingkat DNA yang mengkode *S. pneumoniae*¹². Metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi protein yang berperan sebagai faktor virulensi *S. pneumoniae* pada spesimen klinis dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang lebih sensitif dan akurat^{13,14}.

Menurut Saukkoripi et al. (2015)¹⁵, uji PCR konvensional dengan gen *Autolysin (LytA)* dapat digunakan untuk mendeteksi *S. pneumoniae* pada sampel sputum dan swab nasofaring. *S. pneumoniae* biasanya ditemukan lebih banyak pada sampel sputum dari pada swab nasofaring¹⁶. Oleh sebab itu, tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi metode pemeriksaan molekuler (teknik PCR) untuk mendeteksi isolat *S. pneumoniae* dengan gen *Autolysin (LytA)* pada sputum pasien infeksi saluran pernapasan bawah dan pada pasien yang diduga menderita IPD.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium. Sampel klinis yang dikumpulkan adalah 100 sampel sputum dari pasien rawat inap di Rumah Sakit Umum Pusat (RSUP) Wahidin Sudirohusodo, Makassar yang dikumpulkan selama tiga bulan (Agustus - Oktober 2019). Sampel yang dikumpulkan

adalah sampel yang sesuai dengan kriteria inklusi (*consecutive*). Kriteria inklusi adalah sputum yang berasal dari pasien rawat inap rata-rata >4 hari, dengan diagnosis terinfeksi saluran pernapasan bawah.

Kualitas (*high quality/HQ*) sputum diamati dengan menghitung perbandingan leukosit >5 sel dan epitel >5 sel/lapang pandang mikroskop setelah dilakukan pewarnaan gram. Kemudian diinkubasi pada suhu 35°C dengan CO₂ 5-10% selama lebih dari 24 jam untuk membedakan dari *S. viridians*^{17,18}. Pertumbuhan koloni α -hemolisis (salah satu karakteristik dari *S. pneumoniae*) diamati dan dilanjutkan dengan uji katalase. Uji ini dilakukan dengan menambahkan larutan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% pada *object glass* yang berisi koloni, jika tidak timbul reaksi gelembung (negatif), maka dilanjutkan dengan uji *susceptibility* menggunakan *Optochin disk* 5 mg¹⁷.

Isolat dari sampel sputum pada media *Blood Agar Plate (BAP)* yang telah dikonfirmasi secara mikroskopis, analisis biokimia, dan uji sensitivitas dengan *Ophocin*, kemudian dilakukan ekstraksi DNA dengan metode *boiling*. Koloni bakteri dalam *phospat buffer saline (PBS)* 200 μ L dimasukkan ke tabung *eppendorf* lalu dipanaskan dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 90°C selama 30 menit untuk melisis sel dan molekul-molekul selain DNA^{13,19}.

Deteksi gen faktor virulensi dilakukan berdasarkan Moghaddam (2015)³, menggunakan primer gen *LytA* untuk mendeteksi *S. pneumoniae* dengan urutan nukleotida primer yang digunakan adalah F: 5'CAA CCG TAC AGA ATG AAG CGG-3' dan R: 5'TTA TTC GTG CAA TAC TCG TGC G-3' dengan ukuran *amplicon* 320 *base pair (bp)*³. Campuran reagen terdiri dari PCR *core system* (Toyobo) 7 μ L, ddH₂O 2 μ L, *forward primer* 0,5 μ L, *reverse primer* 0,5 μ L, DNA *template* (sampel) 5 μ L sehingga total volume 15 μ L.

Uji *LytA* dengan PCR dilakukan menggunakan instrumen *Bio-Rad T100™ Thermal Cycler*. Kondisi PCR dalam amplifikasi ini adalah suhu pre-denaturasi 95°C, 10 menit, setiap siklus terdiri dari: denaturasi (pemisahan DNA) 95°C, 30 detik, *annealing* (penempelan primer) 52°C, 30 detik, elongasi/ekstensi (pemanjangan DNA) 72°C, 2 menit (berlangsung sampai 35 siklus), tahap terakhir siklus diperpanjang 1 step elongasi 72°C selama 8 menit untuk memberi kesempatan proses elongasi berjalan dengan sempurna, dan 1 step 12°C *overwait* untuk menjaga amplicon tetap stabil walaupun ditinggal 24 jam^{3,12}.

Produk PCR (hasil amplifikasi) dianalisis menggunakan elektroforesis *gel agarose* 2% menggunakan pewarna *ethidium bromide* 2,5 μ L/100 mL dan dibaca dengan menggunakan *Geldoc*¹⁵. Jumlah sampel DNA yang digunakan dalam setiap campuran reaksi 5 μ L. Isolat *S. pneumoniae* ATCC 49136 yang positif teridentifikasi gen *LytA* ditandai dengan terbentuknya pita (*band*) pada 320 bp sebagai kontrol positif. Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah ddH₂O yang dianggap sebagai DNA sampel.

Hasil

Dari 100 sampel sputum dari pasien, diperoleh pasien dengan jenis kelamin laki-laki adalah 61 % (61 dari 100) sedangkan perempuan 39% (39 dari 100). Usia rata-rata pasien adalah di atas 51 tahun (Tabel 1).

Sampel sputum yang telah dikumpulkan kemudian ditelusuri melalui rekam medik dan didapatkan 20% berasal dari pasien dengan diagnosis primer pneumonia, 29% sekunder pneumonia, dan 51% berasal dari pasien dengan diagnosis infeksi saluran pernapasan lain (Tabel 2). Distribusi sampel yang positif berdasarkan diagnosis pasien yang diambil sampelnya terlihat bahwa gen *LytA* yang terdeteksi adalah 7 dari 20 (35%) sampel dari pasien yang diagnosa utamanya

adalah pneumonia, 10 dari 29 (34,5%) sampel yang positif terdeteksi gen *LytA* dari kelompok pasien yang terdiagnosis penyakit pneumonia sebagai diagnosa sekunder, dan 4 dari 51 (7,8%) sampel yang positif dari kelompok sampel berasal dari pasien dengan diagnosa terinfeksi saluran pernapasan lainnya.

Sampel dibawa ke Laboratorium Hassanudin University Medical Research Center (HUMRC) untuk diidentifikasi. Berdasarkan pewarnaan Gram (Gambar 2), diperoleh 7 sampel dari 100 sampel merupakan Gram (+) *diplococcus* dan 93 dari 100 sampel merupakan Gram (+) *diplococcus lancet* (Tabel 3).

Berdasarkan uji katalase diperoleh sampel terkonfirmasi sebagai *Streptococcus sp* menghasilkan koloni α -hemolisis dengan uji katalase negatif sebanyak 93%, sedangkan uji katalase positif 7% (Tabel 4). Berdasarkan uji

sensitivitas *Ophocin* (Gambar 3), diperoleh 9% sampel sensitif terhadap *Ophocin* dan 81% sampel resisten terhadap *Ophocin* (Tabel 5).

Hasil identifikasi dengan menggunakan teknik PCR dapat dilihat dari hasil amplifikasi yang divisualisasi secara elektroforesis. Terlihat adanya pita DNA *LytA* dengan pada *gel agarose* 2% sebanyak 21 pita pada 320 bp yang ditandai dengan kode 2, 3, 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 28, 30 (Gambar 1).

Berdasarkan paparan antibiotik (Tabel 6), dari 21 sampel yang positif terhadap gen *LytA* dengan metode PCR, ditemukan 9 sampel berasal dari pasien yang belum terpapar antibiotik, 10 sampel berasal dari pasien yang telah terpapar antibiotik kurang dari 24 jam, dan 2 sampel berasal dari pasien yang telah terpapar antibiotik lebih dari 24 jam.

Tabel 1. Karakteristik Sampel Berdasarkan Jenis Kelamin

No	Umur	Jenis kelamin		Jumlah total n=100	Persentase (%)
		Laki-laki n=61	Perempuan n=39		
1	12-16	1	0	1	1%
2	17-25	7	2	9	9%
3	26-35	6	4	10	10%
4	36-45	4	4	8	8%
5	46-55	17	13	30	30%
6	56-65	20	6	26	26%
7	> 65	6	10	16	16%

Tabel 2. Persentase Hasil Positif Gen *LytA* pada Kelompok Pasien

Diagnosis	Pasien	Hasil Positif gen <i>LytA</i>
Pneumonia sebagai diagnosis utama	20% (20/100)	35 (7/20)
Pneumonia sebagai diagnosis sekunder	29% (29/100)	34,5% (10/29)
Infeksi saluran pernapasan lainnya	51% (51/100)	7,8% (4/51)
Total sampel	100	21

Tabel 3. Identifikasi Pewarnaan Gram

No	Hasil Pewarnaan Gram	Jumlah (n)	Persentase (%)
1	Gram (+) <i>diplococcus</i>	7	7
2	Gram (+) <i>diplococcus lancet</i>	93	93
Total		100	100

Tabel 4. Pengamatan Uji Katalase

No	Hasil Pengamatan	n	%
1	Positif (+)	7	7%
2	Negatif (-)	93	93%
Total		100	100%

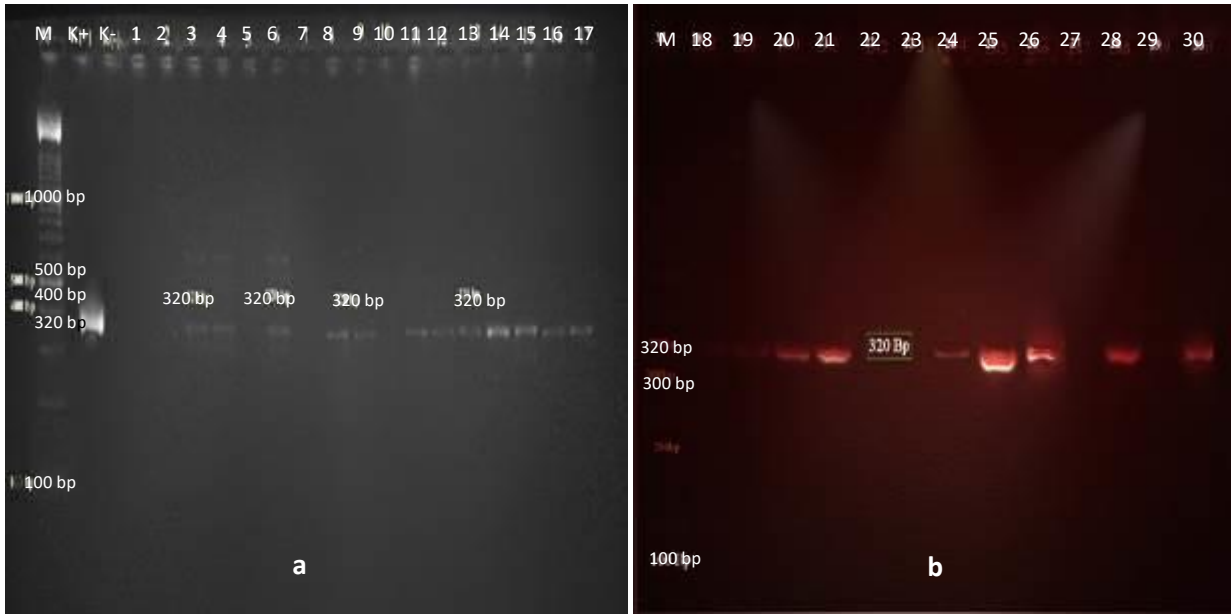
Keterangan: (+): Terdapat gelembung gas; (-): Tidak terdapat gelembung gas

Tabel 5. Pengamatan Uji Sensitivitas *Optochin*

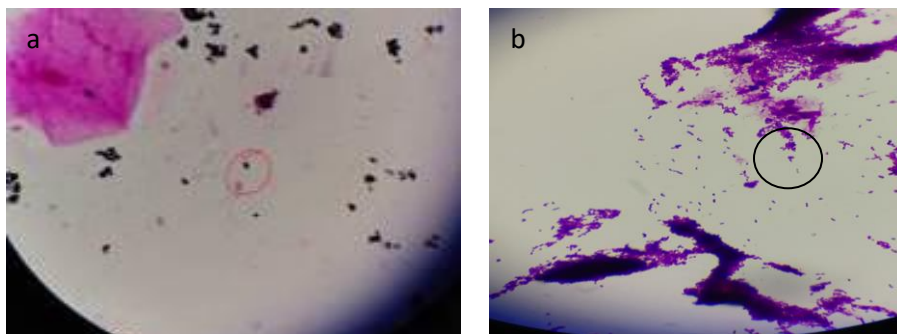
No	Hasil Uji	n	%
1	Resisten	81	81%
2	Sensitif	9	9%
Total		100	100%

Tabel 6. Distribusi Sampel yang Positif terhadap Gen *LytA* Berdasarkan Paparan Antibiotik

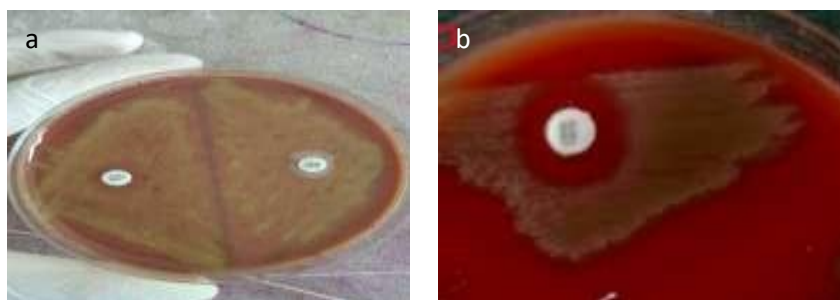
	<i>S. pneumoniae</i> yang ditemukan	Sampel yang belum terpapar antibiotik	Sampel terpapar antibiotik <24 jam	Sampel terpapar antibiotik >24 jam
Positif Metode kultur	9/100 (9%)	8/9 (89,0%)	1/9 (11%)	0/9 (0%)
Positif Metode PCR	21/100 (21%)	9/21 (42,8%)	10/21 (47,6%)	2/21 (9,5%)



Gambar 1. Hasil Elektroforesis Gel Agarose dari Sampel PCR yang Diampifikasi dengan Gen *LytA*. Keterangan: a. kode 1-17, b. kode 18-30, M: marker, K(+): kontrol positif, dan K(-): kontrol negatif



Gambar 2. Pewarnaan Gram.
Keterangan: a. *Diplococcus*, b. *Diplococcus lancet* (perbesaran 100x)



Gambar 3. Uji Sensitivitas *Optochin*.
Keterangan: a. Resisten, b. Sensitif

Pembahasan

Penelitian ini merupakan penelitian pertama di RSUP Wahidin Sudirohusodo, Makassar dalam mengidentifikasi *S. pneumoniae* secara molekuler karena tidak ada data kejadian penyakit yang disebabkan oleh *S. pneumoniae* sebelumnya. Identifikasi *S. pneumoniae* sangat penting untuk mengamati perubahan epidemiologi yang terjadi pada kejadian IPD.

Pada penelitian ini hanya ditemukan 9% sampel yang positif dengan metode kultur. Hal ini sesuai dengan penelitian Picazo et al. (2011) yang menyebutkan bahwa metode kultur memiliki sensitivitas yang rendah dalam mendeteksi sampel sputum dan memiliki keterbatasan yaitu membutuhkan bakteri yang hidup dalam jumlah yang banyak⁸. Tetapi metode ini masih merupakan *golden standard* untuk mengkonfirmasi bakteri *S. pneumoniae*^{10,14}. Kualitas sampel sputum juga perlu diperhatikan agar sesuai dengan kriteria *high quality* (HQ) sehingga dapat membantu dalam diagnosis PncCAP dan menghindari hasil positif palsu¹⁷.

Uji PCR konvensional dengan gen *LytA* sebagai target dalam mendeteksi *S. pneumoniae* di sputum menunjukkan hasil yang menjanjikan dalam diagnosis PncCAP. Pada penelitian ini diperoleh *S. pneumoniae* dapat terdeteksi dengan metode PCR menggunakan gen *LytA* sebanyak 21 dari 100 sampel sputum (21%). Hal ini sesuai dengan penelitian Sanz et al (2010) yang melaporkan bahwa deteksi *S. pneumoniae* dengan menggunakan gen *LytA* dari sampel sputum adalah 50 dari 224 sampel (22%) dan *S. pneumoniae* lebih banyak ditemukan pada sampel swab nasofaring²⁰. Saukkoriipi, et. al (2019) juga melaporkan

bahwa selain pemeriksaan kultur, terdapat metode lain yang dapat digunakan yaitu uji antigenik untuk mendeteksi komponen dinding sel pneumokokus (C-polisakarida) yang terdapat pada semua serotipe dan uji molekuler (PCR)²¹.

Dari penelitian ini ditemukan 21 isolat *S. pneumoniae* dari 100 sampel (21%) dengan metode PCR. Dari 21 isolat ini, terdapat 9 sampel yang positif dari sputum yang belum terpapar antibiotik, 10 sampel yang positif dari sputum yang telah terpapar antibiotik <24 jam, dan 2 sampel yang positif dari sputum yang telah terpapar antibiotik >24 jam. Sedangkan dengan metode kultur, hanya ditemukan 9 sampel (9%) yang positif teridentifikasi *S. pneumoniae*. Hal ini sesuai dengan penelitian Ricci et. al (2013)⁶ yang menyatakan bahwa *S. pneumoniae* lebih banyak ditemukan pada sampel kultur sputum yang positif. Greiner (2001) juga menyebutkan bahwa PCR sangat sensitif dalam mendeteksi *S. pneumoniae*²².

Menurut Gadsby et al. (2016), sebagian besar kelompok sputum kultur yang hasilnya negatif disebabkan karena sputum telah terpapar antibiotik lebih dari 6 jam sehingga jumlah bakteri yang ada di dalam sputum menjadi lebih sedikit^{14,23}. Saukorippi et. al (2019) juga melaporkan hubungan pengambilan sputum dengan adanya gen *LytA* sebelum dan setelah penggunaan antibiotik selama 2 minggu dibandingkan dengan metode kultur. Hasil penelitian tersebut menyatakan bahwa sputum yang telah mendapatkan terapi antibiotik rata-rata memiliki hasil kultur yang negatif daripada sputum yang belum menggunakan terapi antibiotik, namun masih dapat terdeteksi dengan menggunakan PCR pada sputum yang telah terpapar antibiotik > dari 24 jam²¹.

Pada penelitian ini, uji PCR dengan gen *LytA* dapat digunakan untuk mendeteksi *S. pneumoniae* secara molekuler dari sampel sputum dari kelompok pasien dengan CAP dan infeksi saluran pernapasan lainnya.

Kesimpulan

Gen Autolysin (*LytA*) dapat digunakan untuk mendeteksi isolat *S. pneumoniae* sebagai identifikasi awal pada sampel klinis sputum di rumah sakit.

Saran

Dalam penelitian ini, jumlah pasien terutama pada kelompok pasien PncCAP masih rendah. Oleh sebab itu, perlu dilakukan evaluasi lebih lanjut dengan penambahan jumlah sampel pemeriksaan agar diperoleh hasil uji PCR dengan sensitivitas dan spesifisitas yang lebih akurat. Perlu dilakukan identifikasi gen *LytA* secara langsung pada sampel klinis tanpa perlu dilakukan kultur terlebih dahulu.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada para staf Laboratorium HUMRC, Universitas Hassanudin, Makassar yang telah memberikan bantuan dana dan tenaga selama penelitian. Terima kasih juga kepada seluruh staf akademisi di Universitas Katolik Musi Charitas, Palembang dan berbagai pihak yang telah memberikan motivasi dan telah mendukung penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Black RE, Cousens S, Johnson HL, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*. 2010;375(9730):1969-1987. doi:10.1016/S0140-6736(10)60549-1
2. Resti M, Moriondo M, Cortimiglia M, et al. Community-Acquired Bacteremic Pneumococcal Pneumonia in Children: Diagnosis and Serotyping by Real-Time

- Polymerase Chain Reaction Using Blood Samples. *Clin Infect Dis*. 2010;51(9):1042-1049. doi:10.1086/656579
3. Gholamhosseini-Moghaddam T, Rad M, Mousavi SF, Ghazvini K. Detection of *lytA*, *pspC*, and *rrgA* genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated from healthy children. *Iran J Microbiol*. 2015;7(3):156-160.
4. Miller EL, Abrudan MI, Roberts IS, Rozen DE. Diverse Ecological Strategies Are Encoded by *Streptococcus pneumoniae* Bacteriocin-Like Peptides. *Genome Biol Evol*. 2016;8(4):1072-1090. doi:10.1093/gbe/evw055
5. Chen Y-S, Liu P-Y, Huang Y-F, et al. Comparison of diagnostic tools with multiplex polymerase chain reaction for pediatric lower respiratory tract infection: A single center study. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013;46(6):413-418. doi:10.1016/j.jmii.2012.07.016
6. Ricci S, Gerlini A, Pammolli A, et al. Contribution of different pneumococcal virulence factors to experimental meningitis in mice. *BMC Infect Dis*. 2013;13(1):444. doi:10.1186/1471-2334-13-444
7. Albrich WC, Madhi SA, Adrian P V., Telles J-N, Paranhos-Baccala G, Klugman KP. Genomic Load from Sputum Samples and Nasopharyngeal Swabs for Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia in HIV-Infected Adults. *J Clin Microbiol*. 2014;52(12):4224-4229. doi:10.1128/JCM.01553-14
8. Picazo J, Ruiz-Contreras J, Casado-Flores J, et al. Laboratory-based, 2-year Surveillance of Pediatric Parapneumonic Pneumococcal Empyema Following Heptavalent Pneumococcal Conjugate Vaccine Universal Vaccination in Madrid. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(6):471-474. doi:10.1097/INF.0b013e31820a418a
9. Patterson MJ. *Streptococcus*. (Goldman E, Green LH, eds.). CRC Press; 1996. doi:10.1201/b17871
10. Abdeldaim G, Herrmann B, Mölling P, et al. Usefulness of real-time PCR for *lytA*, *ply*, and *Spn9802* on plasma samples for the diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(8):1135-1141. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03069.x
11. Resti M, Moriondo M, Cortimiglia M, et al. Community-Acquired Bacteremic Pneumococcal Pneumonia in Children: Diagnosis and Serotyping by Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Blood Samples. *Clin Infect Dis*. 2010;51(9):1042-

1049. doi:10.1086/656579
12. Scott JAG, Marston EL, Hall AJ, Marsh K. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by psaA PCR analysis of lung aspirates from adult patients in Kenya. *J Clin Microbiol.* 2003;41(6):2554-2559. doi:10.1128/JCM.41.6.2554-2559.2003
 13. Abdeldaim GMK, Strålin K, Olcén P, Blomberg J, Herrmann B. Toward a quantitative DNA-based definition of pneumococcal pneumonia: a comparison of *Streptococcus pneumoniae* target genes, with special reference to the Spn9802 fragment. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60(2):143-150. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.08.010
 14. Gadsby NJ, Russell CD, McHugh MP, et al. Comprehensive Molecular Testing for Respiratory Pathogens in Community-Acquired Pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2016;62(7):817-823. doi:10.1093/cid/civ1214
 15. Saukkoriipi A, Palmu AA, Jokinen J, Verlant V, Hausdorff WP, Kilpi TM. Effect of antimicrobial use on pneumococcal diagnostic tests in elderly patients with community-acquired pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(4):697-704. doi:10.1007/s10096-014-2278-5
 16. Murdoch DR, Morpeth SC, Hammitt LL, et al. Microscopic Analysis and Quality Assessment of Induced Sputum From Children With Pneumonia in the PERCH Study. *Clin Infect Dis.* 2017;64(suppl_3):S271-S279. doi:10.1093/cid/cix083
 17. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;63(4):e1-e60. doi:10.1093/cid/ciw326
 18. Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(5):411-418. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03183.x
 19. Vernet G, Saha S, Satzke C, et al. Laboratory-based diagnosis of pneumococcal pneumonia: state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(3):1-13. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03496.x
 20. Sanz JC, Culebras E, Ríos E, et al. Direct serogrouping of *Streptococcus pneumoniae* strains in clinical samples by use of a latex agglutination test. *J Clin Microbiol.* 2010;48(2):593-595. doi:10.1128/JCM.01651-09
 21. Saukkoriipi A, Palmu AA, Jokinen J. Culture of all sputum samples irrespective of quality adds value to the diagnosis of pneumococcal community-acquired pneumonia in the elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(7):1249-1254. doi:10.1007/s10096-019-03536-9
 22. Greiner O, Day PJR, Bosshard PP, Imeri F, Altwegg M, Nadal D. Quantitative Detection of *Streptococcus pneumoniae* in Nasopharyngeal Secretions by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3129-3134. doi:10.1128/JCM.39.9.3129-3134.2001
 23. Yana K, Alisjahbana B, Hartantri Y. Gambaran Penyebab Rendahnya Positivitas Darah pada Penderita Sepsis. *J Penyakit Dalam Indones.* 2019;5(4):189-194. doi:10.7454/jpdi.v5i4.235