

## DETEKSI GEN PENYANDI ADHESIN PADA *VEROCYTOTOXIGENIC Escherichia coli* (VTEC) ISOLAT SAPI

### *Detection of Gene Encoding Adhesin of Verocytotoxigenic Escherichia coli (VTEC) Isolated from Cattles*

Wahyu Prihtiyantoro<sup>1</sup>, Hartatik<sup>1</sup>, Khusnan<sup>1\*</sup>, Mitra Slipranata<sup>2</sup>, dan Novra A. Sandi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Akademi Peternakan Brahmputra Yogyakarta, Yogyakarta

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

\*Corresponding author: drh\_khusnan@yahoo.com

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan melakukan karakterisasi fenotipe dan genotipe *Escherichia coli* (*E. coli*) strain VTEC yang berasal dari feses sapi. Dalam penelitian ini digunakan 25 isolat *E. coli* dari spesimen feses dan pupuk berbasah feses sapi perah dan feses sapi potong. Metode dilakukan dengan melakukan karakterisasi fenotipe dan genotipe yang spesifik untuk *E. coli* strain VTEC. Berdasarkan hasil penelitian, 20% spesimen feses segar terdeteksi sebagai strain VTEC, dan tidak ditemukan isolat yang berasal dari spesimen pupuk. Pada strain VTEC terdeteksi gen VT1 dan VT2, sebesar 16 dan 12% dan terdeteksi kedua gen VT sebesar 8%. Deteksi terhadap gen *pyelonephritis-associated pilli* (*pap*), *S fimbrial adhesin* (*sfa*), dan *afimbrial adhesin* (*afa*) masing-masing adalah 60, 80, dan 80%.

Kata kunci: feses, gen adhesin, pupuk, sapi, VTEC

#### ABSTRACT

This study was aimed to perform phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* (*E. coli*), particularly VTEC strain isolated from cattle faeces. In this study, 25 *E. coli* isolated from faeces specimens and faeces base fertilizer of dairy and beef cattles were used. Examination were carried out using phenotypic and genotypic characterization which is specified for *E. coli* VTEC strain. The result showed that 20 % samples of fresh faeces specimens were detected as VTEC strains and none of isolate was detected from faeces base fertilizer samples. From VTEC strains, could detect 16 % VT1 gene, 12 % VT2 genes and 8% of both. Detection on gene *pyelonephritis-associated pilli* (*pap*), *S fimbrial adhesin* (*sfa*), and *afimbrial adhesin* (*afa*) were found about 60%, 80% and 80%, respectively.

Key words: faeces, gene adhesin, fertilizer, cattle, VTEC

#### PENDAHULUAN

*Escherichia coli* (*E. coli*) merupakan bakteri sebagai indikator adanya pencemaran, baik feses ternak maupun manusia. Secara normal, *E. coli* selalu dapat ditemukan dalam feses baik serotipe patogen maupun nonpatogen. *Verocytotoxigenic Escherichia coli* (VTEC) merupakan serotipe patogen yang dapat menyebabkan diare berdarah, *hemorrhagic colitis*, *hemolytic-uremic syndrome*, dan *persistent diarrhea* pada manusia (Nataro dan Kaper, 1998). *Escherichia coli* selalu ditemukan pada kotoran sapi (Lih-Ching *et al.*, 2002; Albiñ *et al.*, 2003). Feses sapi berperan sebagai salah satu media pertumbuhan *E. coli* serotipe patogen zoonosis (Shabana, 2014).

Penyebaran *E. coli* dari ternak ke manusia dapat melewati irigasi pembuangan feses dari peternakan sapi (Gerba dan Smith, 2005) atau melewati media pupuk kandang yang digunakan dalam pengelolaan pertanian (Fremaux *et al.*, 2007). Penyebaran juga dapat melewati produk-produk pertanian di antaranya bayam dan selada (Gerba dan Smith, 2005; Jay *et al.*, 2007), wortel, bawang, dan sayuran lainnya (Fremaux *et al.*, 2007).

*Verocytotoxigenic Escherichia coli* menghasilkan dua jenis *verotoxin* (VT) yaitu VT1 dan VT2 (Karmali, 1989; Griffin dan Tauxe, 1991). *Verotoxin* telah terdeteksi dalam strain *E. coli* dari kasus penyakit manusia dan hewan (Konowalchuk *et al.*, 1977), antara lain dari feses anak sapi dan babi (Mohammad *et al.*, 1985; Sherwood *et al.*, 1985).

Koloni dan perlekatan pada permukaan sel inang, serta masuknya bakteri ke dalam sel inang dan perkembangbiakan bakteri merupakan proses awal infeksi yang penting (Korhonen *et al.*, 1988). *Pilli* atau *fimbriae* berperan pada awal terjadinya infeksi yang dikode oleh gen *pyelonephritis-associated pilli* (*pap*), *S fimbrial adhesin* (*sfa*), dan *afimbrial adhesin* (*afa*) (Le Bouguenec *et al.*, 1992).

Gen *pap*, gen *sfa*, dan gen *afa* merupakan faktor virulensi penting yang berhubungan dengan *adhesin* sebagai awal dari proses infeksi (Vincent *et al.*, 2010; Okura dan Marin, 2014). Keberadaan gen yang bertanggung jawab terhadap adhesi (*pap*, *sfa*, dan *afa*) dapat dideteksi dengan menggunakan primer spesifik menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR) (Resende *et al.*, 2007).

Pada penelitian ini dilakukan determinasi VTEC berdasarkan keberadaan gen VT1 dan VT2, serta mendeteksi gen penyandi *adhesin* (gen *pap*, *sfa*, dan *afa*) pada VTEC yang berasal dari feses dan pupuk kandang berbasah feses sapi perah dan sapi potong dengan menggunakan analisis *polymerase chain reaction* (PCR).

#### MATERI DAN METODE

Dalam penelitian ini digunakan 25 isolat *E. coli* yang berasal dari spesimen feses sapi perah dan sapi potong dan pupuk kandang berdasarkan karakter fenotipe. Seluruh isolat dilakukan ekstraksi

*deoxyribonucleic acid* (DNA) dan melakukan PCR untuk amplifikasi gen 16SrRNA, amplifikasi gen VT1 dan VT2 serta amplifikasi gen *pap*, *sfa*, dan *afa*. Ekstraksi DNA digunakan kit ekstraksi DNA (DNeasy Qiagen) dengan prosedur sesuai dengan rekomendasi pabrik. Primer selektif untuk mengamplifikasi gen 16SrRNA *E. coli* digunakan primer yang didesain berdasarkan Knobl *et al.* (2004) dan dilakukan analisis dan karakterisasi molekuler melalui PCR.

Amplifikasi gen 16SrRNA spesifik *E. coli* menggunakan primer ECP79F dan ECR620R dilakukan dengan mencampur larutan PCR mix (Supermix, Invitrogen, Germany) dengan 2,5 µl (0,6 µM) masing-masing primer dan 2 µl DNA ke dalam tabung PCR hingga mencapai volume total 25 µl, selanjutnya tabung yang telah berisi larutan dimasukkan ke dalam alat *thermal cycle* (Mastercycler, Eppendorf, Germany). Urutan basa nukleotida dari primer dan program PCR disajikan pada Tabel 1. Campuran reaksi terdiri atas 2,5 µl masing-masing primer I dan primer II, 1 µg DNA dan PCR mix sampai volume 25 µl.

Program PCR untuk amplifikasi gen 16SrRNA *E. coli* setelah denaturasi awal lima menit pada temperatur 94° C, fragmen gen target diamplifikasi dalam 40x siklus. Masing-masing siklus dengan program denaturasi selama 45 detik pada suhu 94° C, *annealing* 45 detik pada suhu 50° C dan ekstensi selama 1,5 menit pada suhu 72° C (Knobl *et al.*, 2004). Amplifikasi gen *pap*, *sfa* dan *afa* dilakukan dengan *thermal cycle* dan program sesuai dengan referensi Bottero *et al.* (2004), Farshad *et al.* (2010), dan Mainil *et al.* (1997).

Produk PCR dianalisis dengan menggunakan elektroforesis dengan 2% gel agarosa (Sigma), dan bufer (TAE) (0,04 M Tris; 0,001 M EDTA; pH 7,8). Sebanyak 10 µl produk PCR dicampur dengan ±3 µl *loading buffer*, kemudian dilakukan elektroforesis menggunakan gel agarosa 2% pada tegangan 100 V selama 30 menit. Setelah elektroforesis pita-pita DNA pada agar diwarnai dengan larutan *Sybr save staining* dan divisualisasikan menggunakan UV *transilluminator*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis PCR gen 16SrRNA, gen VT1 dan VT2, gen *pap*, *sfa*, *afa* terhadap 25 isolat *E. coli* disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3. Prevalensi VTEC terhadap isolat-isolat yang diteliti ditemukan sebesar 20% (5/25) terdeteksi gen VT1, VT2, atau gabungan keduanya. Deteksi gen VT1 dan gen VT2 pada VTEC tersebut sebesar 16 dan 12% serta 8% isolat memiliki gen VT1 dan VT2. Deteksi gen *adhesin* menunjukkan bahwa 75% VTEC dengan VT1 terdeteksi ketiga gen *adhesin* (gen *pap*, *sfa*, dan *afa*), dan 25% *strain* VTEC hanya terdeteksi dua gen *adhesin* (gen *sfa* dan *afa*), sedangkan VTEC dengan VT2, 66% isolat terdeteksi ketiga gen *adhesin*, serta 34% *strain* VTEC dengan VT2 tidak terdeteksi ketiga gen *adhesin*.

Hasil deteksi gen VTEC sebesar 20% semua berasal dari spesimen feses sapi, tidak satupun yang berasal dari spesimen pupuk kandang. Diagnosis VTEC berdasarkan keberadaan gen VT1 dan VT2 dengan menggunakan metode PCR (Rivero *et al.*, 2010). Penggunaan PCR untuk mendeteksi gen VT pada VTEC isolat feses sapi telah dilaporkan oleh Montenegro *et al.* (1990), Orden *et al.* (2002), Tahamtan *et al.* (2011), dan Shabana (2014) dengan hasil yang bervariasi. Metode ini merupakan cara yang cepat, sensitif, dan spesifik untuk deteksi VTEC (Chen *et al.*, 1998).

Hasil penelitian Shabana (2014) dan Sanz *et al.* (1998) menunjukkan bahwa prevalensi VTEC isolat asal feses sapi sebesar 22%. Hasil penelitian lain menyebutkan bahwa prevalensi *strain* VTEC isolat feses sapi lebih kecil yaitu 4,2% (Orden *et al.*, 2002); 8% (Montenegro *et al.*, 1990), dan 9,75% (Tahamtan *et al.*, 2011). Hasil penelitian Karama *et al.* (2008) menyebutkan tingkat prevalensi *strain* VTEC isolat feses sapi yang akan disembelih di abatoar sebesar 10,2%. Pada feses anak sapi dengan gejala diare prevalensinya sebesar 23% (Sanz *et al.*, 1998).

**Tabel 1.** *Polymerase chain reaction* (PCR) primer untuk amplifikasi gen 16SrRNA, VT1, VT2, *pap*, *sfa* dan *afa* *Escherichia coli* isolat sapi

Gen	Primer Sekuen (5'-3')	Ukuran (bp) Produk PCR
16S rRNA	5'-GAAGCTTGCTTCTTTGCT-3' 5'-GAGCCCCGGGGATTTACAT-3'	544 bp Knobl <i>et al.</i> (2004)
VT1	5'-CAGTTAATGTGGTGGCGAAG-3' 5'-CTGCTAATAGTTCTGCGCATC-3'	130 bp Bottero <i>et al.</i> (2004)
VT2	5'-CTTCGGTATCCTATTCCCGG-3' 5'-GGATGCATCTCTGGTCATTG-3'	346 bp Bottero <i>et al.</i> (2004)
<i>Pap</i>	5-GACGGCTGTAAGTGCAGGGTGTGGCG-3' 5-ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA-3'	328 bp Farshad <i>et al.</i> (2010)
<i>Sfa</i>	5'-CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA-3' 5'-CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC-3'	410 bp Farshad <i>et al.</i> (2010)
<i>Afa</i>	5'-GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC-3' 5'-CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG-3'	750 bp Mainil <i>et al.</i> (1997)

**Tabel 2.** Deteksi genotipe terhadap isolat *Echerichia coli*, gen verotoksin dan gen *adhesin*

No	Kode isolat	Asal spesimen	DNA	16S rRNA	VT1	VT2	pap	sfa	afa
1	FR1	Feses sapi perah	+	+					
2	FR2	Feses sapi perah	+	+		+			
3	FR3	Feses sapi perah	+	+					
4	FR4	Feses sapi perah	+	+	+	+	+	+	+
5	Fr5	Feses sapi perah	+	+	+			+	+
6	Fr6	Feses sapi perah	+	+					
7	Fs1	Feses sapi perah	+	+					
8	Fs2	Feses sapi perah	+	+					
9	Fs3	Feses sapi perah	+	+	+		+	+	+
10	Fs4	Feses sapi perah	+	+					
11	FPT 16	Pupuk sapi potong	+	+					
12	FPT 17	Pupuk sapi potong	+	+					
13	FPT 18	Pupuk sapi potong	+	+					
14	FPT 19	Pupuk sapi potong	+	+					
15	FPT 22	Pupuk sapi potong	+	+					
16	FPT 24	Pupuk sapi potong	+	+					
17	Ps1	Feses sapi perah	+	+	+	+	+	+	+
18	Ps2	Feses sapi perah	+	+					
19	Ps3	Feses sapi perah	+	+					
20	Ps4	Feses sapi perah	+	+					
21	Ps5	Feses sapi perah	+	+					
22	Pr1	Feses sapi perah	+	+					
23	Pr2	Feses sapi perah	+	+					
24	PPT16	Pupuk sapi potong	+	+					
25	PPT17	Pupuk sapi potong	+	+					

**Tabel 3.** Prevalensi *strain* VTEC, gen *pap*, gen *sfa* dan gen *afa*

Bahan		Jumlah	Deteksi gen							
Sapi	Spesimen		VT		pap		sfa		afa	
			VT1	VT2	VT1	VT2	VT1	VT2	VT1	VT2
Perah	Feses	10	-	FR2	-	-	-	-	-	-
			FR4	FR4	+	+	+	+	+	+
			FR5	-	-	-	+	+	+	+
			FS3	-	+	+	+	+	+	+
			-	-	-	-	-	-	-	-
Potong	Feses	2	Ps1	Ps1	+	+	+	+	+	+
			-	-	-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	-	-	
	Pupuk	6	-	-	-	-	-	-	-	
		25	5/25(20%)		60%	60%	80%	80%	80%	80%

Gen VTEC isolat asal ternak merupakan sumber penyebaran utama pada penyakit manusia (Callaway *et al.*, 2009) dan feses sapi merupakan sumber utama penyebaran (Caprioli *et al.*, 2005). Keberadaan VTEC pada feses sapi menunjukkan bahwa feses sapi berperan sebagai sumber penyebaran VTEC. Pupuk kandang dapat berperan sebagai penyebar VTEC dan *strain* tersebut mampu bertahan hidup dalam pupuk kandang serta berpotensi menyebar ke ternak maupun ke manusia (Berggren *et al.*, 2005). Dalam penelitian ini tidak satupun *strain* VTEC ditemukan dari spesimen pupuk kandang. Hal ini bisa terjadi kemungkinan bahan pupuk kandang berasal dari feses sapi yang tidak mengandung VTEC.

Selain pada feses sapi, VTEC juga ditemukan pada feses hewan lain, seperti feses domba (Shabana, 2014), feses kambing (Pritchard *et al.*, 2000), dan feses kerbau (Galiero *et al.*, 2005). Gen VTEC juga ditemukan pada mamalia selain ruminansia, seperti babi (Bonardi *et al.*, 2003), kuda (Chalmers *et al.*, 1997), anjing (Trevena *et al.*, 1996), dan kelinci (Leclercq *et al.*, 2003).

Penularan VTEC pada manusia dapat terjadi melalui kontak langsung atau tidak langsung dengan

hewan atau lingkungan, melalui konsumsi makanan atau air yang terkontaminasi (Gillespie *et al.*, 2005). Daging sapi yang tercemar merupakan material yang paling sering berperan sebagai sumber penularan dari hewan ke manusia (Le Saux *et al.*, 1993; Caprioli *et al.*, 2005). Penularan kepada manusia juga dapat melewati susu yang tidak dipasteurisasi (Clarke *et al.*, 1998) maupun produk pertanian dan makanan olahan lainnya yang terkontaminasi VTEC (Gyles, 2004). Manusia juga dapat berperan sebagai sumber penularan pada manusia (Picozzi *et al.*, 2005). Penyebaran yang lebih luas dapat melalui pupuk kandang maupun melewati sistem irigasi dari kandang ternak yang berhubungan dengan lingkungan pertanian. Selain ditemukan pada feses, *strain* VTEC juga ditemukan pada daging sapi, domba, dan daging rusa prevalensinya sebesar 4,6% (Pie'Rard *et al.*, 1997). Penelitian lain menyebutkan prevalensi *strain* VTEC asal daging sapi, babi, unggas, dan domba sebesar 3,7% (Doyle dan Schoeni, 1987) dan isolat asal sosis babi prevalensinya sebesar 25% (Schmidt *et al.*, 1994), serta isolat asal daging domba sebesar 7,90% (Tahamtan *et al.*, 2011).

Prevalensi VTEC isolat sapi sangat bervariasi. Menurut Kudva *et al.* (1997) dipengaruhi oleh pola makan sapi, usia, kondisi lingkungan dan variasi musim, tetapi tidak dipengaruhi oleh geografis (Tahamtan *et al.*, 2011). Menurut Hussein dan Sakuma (2005) dan Tahamtan *et al.* (2011) bahwa VTEC isolat ternak muda lebih tinggi dibandingkan dengan isolat asal ternak dewasa. Tetapi menurut Wilson *et al.* (1992), Burnens *et al.* (1995); Cobbold dan Desmarchelier (2000) bahwa prevalensi VTEC isolat yang berasal dari sapi muda lebih rendah dibandingkan dengan isolat yang berasal dari sapi. Menurut Blanco *et al.* (1997), prevalensi VTEC terdeteksi dalam proporsi yang sama antara ternak muda dan dewasa. Pada negara subtropis prevalensi *strain* VTEC isolat asal feses sapi lebih tinggi selama musim panas (Garber *et al.*, 1995; Renter *et al.*, 2004) dan sebaliknya selama musim dingin prevalensi *strain* VTEC ditemukan lebih rendah (Rice *et al.*, 2003), serta kejadiannya berkaitan dengan jumlah kasus penyakit infeksi *E. coli* patogen pada manusia (Farah *et al.*, 2003),

Patogenesis infeksi *strain* VTEC pada inang melalui proses kolonisasi dan adhesi pada sel epitel, proses infeksi, dan diikuti dengan kerusakan jaringan. Faktor virulensi VT berperan terhadap tingkat keparahan penyakit akibat kerusakan jaringan target (Gyles, 2004). Infeksi VTEC yang terjadi pada usus, VT bekerja menghambat sintesis protein, sehingga menyebabkan kematian sel inang yang mengakibatkan ketidakseimbangan penyerapan dan sekresi pada usus, sehingga timbul gejala diare (Nataro dan Kaper, 1998).

Deteksi gen VT1 dan VT2 pada lima isolat VTEC dengan PCR sebesar 16 dan 12%. Dari hasil ini terlihat bahwa gen VT1 lebih banyak dibandingkan dengan gen VT2. Perbandingan besaran gen VT1 dan gen VT2 pada VTEC bervariasi. Beberapa hasil penelitian melaporkan VT1 lebih banyak dibandingkan dengan VT2 dan sebaliknya. Shabana (2014) melaporkan gen VT1 dan VT2 sebesar 52 dan 28%. Gen VTEC isolat feses domba VT1 dan VT2 sebesar 25,0 dan 21,42% (Tahamtan *et al.*, 2011) dan hasil penelitian Yadav *et al.* (2007) isolat asal feses domba terdeteksi sebesar 60,0 dan 40,0%. Secara umum isolat asal ternak VT1 dan VT2 sebesar 61 dan 39% (Wilson *et al.*, 1996). Beberapa peneliti melaporkan gen VT1 lebih kecil dibandingkan gen VT2. Hasil penelitian Orden *et al.* (2002) menyebutkan bahwa gen VT1 dan VT2 sebesar 22,9 dan 58,6%. Hasil-hasil penelitian lain sebesar 43,5 dan 82,6% (Montenegro *et al.*, 1990); 25,43 dan 54,02% (Tahamtan *et al.*, 2011); 9 dan 20% (Sanz *et al.*, 1998); 20 dan 52% (Blanco *et al.*, 1996); 21 dan 79% (Karama *et al.*, 1988). Gen VT1 lebih kecil daripada gen VT2 juga ditemukan pada *strain* VTEC isolat asal feses unta sebesar 1,7 dan 36,7% (El-Hewairy *et al.*, 2009)

Banyak faktor virulensi yang dapat menentukan sifat patogenisitas *E. coli*, termasuk keberadaan gen-gen *adhesin*, faktor permukaan sel inang, keberadaan faktor invasi, racun yang diproduksi, dan jenis sekresi

yang dikeluarkan (Holko *et al.*, 2006). Metode PCR telah digunakan untuk mendeteksi gen-gen pada bakteri yang berperan dalam proses adhesi pada sel epitel inang. Pada *E. coli* memiliki gen adhesi yang penting yaitu pap, sfa, dan afa (Knoble *et al.*, 2004).

Hasil penelitian ini keberadaan gen pap, sfa, dan afa sebesar 60, 80, dan 80%. Persentase ketiga gen *adhesin* pada VTEC besarnya bervariasi. Hasil penelitian Farshad *et al.* (2010) menunjukkan gen pap sebesar 30,2%, gen sfa sebesar 8,75%, dan gen afa tidak terdeteksi. Deteksi gen *adhesin* pada *E. coli* isolat asal ayam menunjukkan gen pap, sfa, dan afa masing-masing adalah 16, 6, dan 0% (Knoble *et al.*, 2004). Gen *adhesin* pada VTEC isolat manusia pap; sfa; dan afa masing-masing adalah 20,5; 21,5; dan 8,3% (Mohajeri *et al.*, 2014), sedangkan penelitian Asadi *et al.* (2014) sebesar 53,3; 53,3; dan 51,7%.

Menurut Donnenberg dan Welch (1996) faktor-faktor virulensi tersebut seperti sfa, afa, hemolysin (hly), sitotoksik faktor *necrotising* 1 (CNF-1), dan aerobactin (aer). Faktor-faktor virulensi ini berperan penting dalam patogenisitas VTEC pada proses infeksi, dalam mengatasi mekanisme pertahanan sel-sel morfonuklear dan antibodi inang, merusak sel maupun jaringan serta menyebabkan gejala penyakit (Orskov dan Orskov, 1985; Johnson *et al.*, 2005). Gen *adhesin* merupakan faktor virulensi yang penting dalam proses awal infeksi. Keberadaan gen pap, sfa, dan afa berhubungan dengan kemampuan perlekatan pada permukaan sel epitel inang sebagai langkah awal proses infeksi (Okura dan Marin, 2014).

Pengembangan metodologi molekuler untuk mendeteksi *strain* patogen isolat asal hewan, makanan maupun lingkungan merupakan metode yang tepat dan cepat serta efisien. Deteksi secara molekuler merupakan metode yang sangat efektif untuk mendeteksi VTEC (Bouvet *et al.*, 2001). Menurut Pollard *et al.* (1990) deteksi gen-gen penting dalam isolat-isolat patogen zoonotik dengan metode PCR hasilnya akan lebih cepat, akurat, dan murah.

## KESIMPULAN

Isolat VTEC hanya ditemukan pada spesimen feses, baik feses sapi perah maupun sapi potong sebesar 20%, sebaliknya VTEC tidak ditemukan pada spesimen pupuk kandang berbahan feses sapi perah maupun sapi potong. Keberadaan gen *adhesin* pada isolat VTEC terdeteksi gen pap, sfa, dan afa sebesar 60, 80, dan 80% serta tidak semua isolat VTEC memiliki gen *adhesin*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian Fundamental tahun anggaran 2013-2014, dan semua pihak yang telah membantu sampai selesainya penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Albihn, A., E. Eriksson, C. Wallen, and A. Aspán. 2003. Verotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC) O157:H7-A nationwide Swedish survey of bovine faeces. **Acta Vet. Scand.** 44:43-52.
- Asadi, S., M. Kargar, K. Solhjoo, A. Najafi, and S. Ghorbani-Dalini. 2014. The Association of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* with antibiotic resistance. **Jundishapur J. Microbiol.** 7(5):1-5.
- Berggren, I., B. Vinneras, and A. Albihn. 2005. The survival of *Escherichia coli* O157 in cattle manure depending on handling strategy. **ISAH Warsaw, Poland.** 2:203-207.
- Blanco, M., J.E. Blanco, and J. Blanco. 1997. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. **J. Vet. Microbiol.** 54:309-319.
- Blanco, M., J.E. Blanco, J. Blanco, E.A. Gonzalez, A. Mora, C. Prado, L. Fernandez, M. Rio, J. Ramos, and M.P. Alonso. 1996. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. Coli* in healthy cattle. **J. Epid. and Infect.** 117(2):251-257.
- Bonardi, S., F. Brindani, G. Pizzin, L. Lucidi, M. D'Incau, E. Liebana, and S. Morabito. 2003. Detection of *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. **Int. J. Food. Microbiol.** 85:101-110.
- Bottero, M.T., A. Dalmasso, D. Soglia, S. Rosati, L. Decastelli, and T. Civera. 2004. Development of a multiplex PCR assay for the identification of pathogenic genes of *Escherichia coli* in milk and milk products. **Mol. Cell. Probes.** 18(4):283-288.
- Bouvet, J., M.P. Montet, R. Rossel, A. Le Roux, C. Bavai, S. Ray-Gueniot, C. Mazuy, C. Vernozy-Rozand, A. Hoszowski, A.D.E. Fraser, B.W. Brooks, and E.M. Rich. 2001. Rapid detection and enumeration of salmonella in chicken carcass rinses using filtration, enrichment and colony blot immunoassay. **Int. J. Food Microbiol.** 28:341-350.
- Callaway, T.R., M.A. Carr, T.S. Edrington, R.C. Anderson, and D.J. Nisbet. 2009. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle. **J. Mol. Biol.** 11:67-80.
- Caprioli, A., S. Morabito, H. Brugere, and E. Oswald. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Emerging issues on virulence and modes of transmission. **J. Vet. Res.** 36(3):289-311.
- Chalmers, R.M., R.L. Salmon, G.A. Willshaw, T. Cheasty, N. Looker, I. Davies, and C. Wray. 1997. Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in a farmer handling horses. **Lancet.** 349:1816-1818.
- Chen, J., R. Johnson, and M. Griffiths. 1998. Detection of verotoxinogenic *Escherichia coli* by magnetic capture-hybridization PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** 64(1):147-152.
- Clarke, R.C., S.A. McEwen, V.P. Gannon, H. Lior, and C.L. Gyles. 1989. Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* from milk filters in southwestern Ontario. **Epidemiol Infect.** 102:253-260.
- Cobbold, R. and P. Desmarchelier. 2000. A longitudinal study of Shiga-toxinogenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. **J. Vet. Microbiol.** 71:125-137.
- Donnenberg, M.S. and R.A. Welch. 1996. Virulence Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. In **Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management**. Mobley, H.L.T. and J.W. Warren (Eds.). ASM Press, Washington, DC.
- Doyle, M.P. and J.L. Schoeni. 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. **J. Appl. Environ. Microbiol.** 53:2394-2396.
- El-Hewairy, H.M., W.S. Awad, and A.K. Ibrahim. 2009. Serotyping and molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and in-contact camel calves. **Egypt. J. Comp. Path. & Clinic. Path.** 22(1):216-233.
- Farah, S.M., L.R. Silva, L. Castilhos, M.A.M.F. Kato, I.I. Ramos, T.M.I. Vaz, and K. Irino. 2003. Prevalence of shiga toxin producing *Escherichia coli* in beef cattle, Parana, Brazil. In **Fifth International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, VTEC**. Edinburgh, Scotland:186-187.
- Farshad, S., F. Emamghoraishi, and A. Japoni. 2010. Association of virulent genes hly, sfa, cnf-1 and pap with antibiotic sensitivity in *Escherichia coli* strains isolated from children with community-acquired UTI. **J. Iranian. Red. Crescent. Med.** 12(1):33-37.
- Fremaux, B., M.L. Delignette-Muller, C. Prigent-combaret, A. Gleizal, and C. Vernozy-Rozand. 2007. Growth and survival of non-O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure. **J. Applied. Microbiol.** 102:89-99.
- Galiero, G., G. Conedera, D. Alfano, and A. Caprioli. 2005. Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. **J. Vet. Rec.** 156:382-383.
- Garber, L.P., S.J. Wells, D.D. Hancock, M.P. Doyle, J. Tuttle, J.A. Shere, and T. Zhao. 1995. Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 207:46-49.
- Gerba, C.P. and J.E. Smith. 2005. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. **J. Environ. Qual.** 34(1):42-48.
- Gillespie, I.A., S.J. O'Brien, G.K. Adak, T. Cheasty, and T. Willshaw. 2005. Foodborne general outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in England and Wales 1992-2002. **J. Epidemiol. Infect.** 133:803-808.
- Griffin, P.M. and R.V. Tauxe. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **J. Epidemiol. Rev.** 13:60-98.
- Gyles, C.L. 2004. Pathogenesis, Epidemiology, and Control of VTEC Infection in the Cattle Industry. **www.ivos.org**.
- Holko, I., T. Bisova, Z. Holkova, and V. Kmet. 2006. Virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from traditional cheeses made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. **J. Food Control.** 17:393-396.
- Hussein, H.S. and T. Sakuma. 2005. Invited review: Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. **J. Dairy Sci.** 88:450-465.
- Jay, M.T., M. Cooley, D. Carychao, G.W. Wiscomb, R.A. Sweitzer, L. Crawford-Miksza, J.A. Farrar, D.K. Lau, J. O'Connell, A. Millington, R.V. Asmundson, E.R. Atwill, and R.E. Mandrell. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. **J. Emerg. Infect. Dis.** 13:1908-1911.
- Johnson, J.R., P. Delaveri, T.T. Obrayan, K. Smith, and E. Tatini. 2005. Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markets (Minnesota, 1999-2000) with antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **J. Foodborne. Pathog. Dis.** 2:38-49.
- Karama, M., R.P. Johnson, R. Holtslander, S.A. McEwen, and C.L. Gyle. 2008. Prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in cattle from an Ontario abattoir. **Canadian J. Vet. Res.** 72:297-302.
- Karmali, M.A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol. Rev.** 2:15-38.
- Knöbl, T., A. Tania, T. Gomes, M.A.M. Vieira, A. Jose, J.A. Bottino, J. Antonio, and P. Ferreira. 2004. Detection of *pap*, *sfa*, *afa* and *fim* adhesin-encoding operons in avian pathogenic *Escherichia coli*. **Intern J. Appl. Res. Vet. Med.** 2(2):135-141.
- Konowalchuk, J., J.I. Speirs, and S. Stavric. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **J. Infect. Immun.** 18:775-779.
- Korhonen, T.K., R. Virkola, and B. Westerlund. 1988. Tissue interactions of *Escherichia coli* adhesins. **Antonie van Leeuwenhoek.** 54:411-420.
- Kudva, I.T., P.G. Hatfield, and C.J. Hovde. 1997. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes isolated from sheep. **J. Clin. Microbiol.** 35:892-899.
- Le Bougenec, C., M. Archambaud, and A. Labigne. 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** 30:1189-1193.
- Le Saux, N., J.S. Spika, and B. Friesen. 1993. Ground beef consumption in noncommercial settings is a risk factor for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection in Canada. **J. Infect. Dis.** 167:500-502.
- Leclercq, A. and J. Mahillon. 2003. Farmed rabbits and ducks as vectors for VTEC O157:H7. **J. Vet. Rec.** 152:723-724.

- Lih-Ching, C., L. Fang-Ming, and Y.S. Daniel. 2002. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feces and raw milk of domestic cattle and sheep. **J. Food. Drug. Anal.** 10(1):39-46.
- Mainil, J.G., E. Jacquemin, F. Hérault, and E. Oswald. 1997. Presence of pap, sfa, and afarelated sequences in necrotogenic *Escherichia coli* isolates from cattle: Evidence for new variants of the AFA family. **Can. J. Vet. Res.** 61(3):193-199.
- Mohajeri, P., H. Khademi, R. Ebrahimi, A. Farahani, and M. Rezaei. 2014. Frequency distribution of virulence factors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Kermanshah in 2011-2012. **Int. J. Appl. Basic Med. Res.** 4(2):111-116.
- Mohammad, A., J.S.M. Peiris, E.A. Wijewanta, S. Mahalingam, and G. Gunosekera. 1985. Role of verotoxigenic *Escherichia coli* in cattle and buffalo calf diarrhoea. **FEMS Microbiology Letters.** 26:281-283.
- Montenegro, M.A., M. Bulte, T. Trumpf, S. Aleksic, G. Reuter, E. Bulling, and R. Helmuth. 1990. Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. **J. Clin. Microbiol.** 28(6):1417-1420.
- Nataro, J.P. and J.B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol. Rev.** 11:142-210.
- Okura, M.H. and J.M. Marin. 2014. Survey of Minas frescal cheese from Southwest Minas Gerais for virulence factors and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates. **Ciencia Rural, Santa Maria.** 44(8):1506-1511.
- Orden, J.A., D.Cid, J.A. Ruiz-Santa-Quiteria, S. Garcia, S. Martinez, and R. de la Fuen. 2002. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. **J. Appl. Microbiol.** 93:29-35.
- Orskov, I. and F. Orskov. 1985. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. **J. Hyg.** 95:551-575.
- Picozzi, C., R. Foschino, A. Heuvelink, and R. Beumer. 2005. Phenotypic and genotypic characterization of sorbitolnegative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated from milk samples in Lombardy region. **Letters in Applied Microbiology.** 40:491-496.
- PieRard, D., L. Van Damme, L. Moriau, D. Stevens, and S. Lauwers. 1997. Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats. **Appl. Environ. Microbiol.** 63(11):4585-4587.
- Pollard, D.R., W.M. Johnson, H. Lior, S.D. Tyler, and K.R. Rozee. 1990. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** 28(3):540-545.
- Pritchard, G.C., G.A. Willshaw, J.R. Bailey, T. Carson, and T. Cheasty. 2000. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on a farm open to the public: outbreak investigation and longitudinal bacteriological study. **J. Vet. Rec.** 147:259-264.
- Renter, D.G., S.L. Checkley, J. Campbell, and R. King. 2004. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the feces of Alberta feedlot cattle. **Canadian. J. Vet. Res.** 68:150-153.
- Resende, D., E. Santo, C. Macedo, and J.M. Marin. 2007. Prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from the genital tract of healthy cows. **J. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 59(3):564-568.
- Rice, D.H., H.Q.Q. Sheng, S.A. Wynia, and C.J. Hovde. 2003. Rectoanal mucosal swab culture is more sensitive than fecal culture and distinguishes *Escherichia coli* O157: H7-colonized cattle and those transiently shedding the same organism. **J. Clin. Microbiol.** 41: 4924-4929.
- Rivero M.A., J.A. Passucci, E.M. Rodriguez, and A.E. Parma. 2010. Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina. **J. Med. Microbiol.** 59: 345-352.
- Sanz, M.E., M.R. Viñas, and A.E. Parma. 1998. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. **Euro J. of Epidemiol.** 14(2):399-403.
- Schmidt, H., B. Plaschke, S. Franke, H. Russman, A. Schwarzkopf, J. Heesemann, and H. Karch. 1994. Differentiation in virulence patterns Of *Escherichia coli* possessing eae genes. **J. Med. Microbiol. Immun.** 183:23-31.
- Shabana, I.I. 2014. *Escherichia coli* pathotypes associated with diarrhea in human and domestic animals. **Am. J. Anim. Vet. Sci.** 9(3):155-161.
- Sherwood, D., D.R. Snodgrass, and A.D. O'Brien. 1985. Shigalike toxin production from *Escherichia coli* associated with calf diarrhoea. **J. Vet. Rec.** 116:217-218.
- Tahamtan, Y., S.A. Pourbakhsh, M. Hayati, N. Namdar, Z. Shams, and M.M. Namvari. 2011. Prevalence and molecular characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and sheep in Shiraz-Iran. **J. Archives. Razi Institute.** 66(1):29-36.
- Trevena, W.B., R.S. Hooper, C. Wray, G.A. Willshaw, T. Cheasty, G. Domingue. 1996. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. **Vet. Rec.** 138:400-409.
- Vincent, C., P. Boerlin, D. Daignault, C.M. Dozois, L. Dutil, and C. Galanakis. 2010. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. **Emerg. Infect. Dis.** 16:88-95.
- Wilson, J.B., R.C. Clarke, S.A. Renwick, K. Rahn, R.P. Johnson, M.A. Karmali, H. Lior, D. Alves, C.L. Gyles, K.S. Sanhu, S.A. McEwen, and J.S. Spika. 1996. Vero cytotoxicigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. **J. Infect. Dis.** 174:1021-1027.
- Wilson, J.B., S.A. McEwen, and R.C. Clarke. 1992. Distribution and characteristics of verocytotoxinigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. **J. Epidemiol. Infect.** 108:423-439.
- Yadav M.M., A. Ashish Roy, R. Sharda, and G. Arya. 2007. Detection of toxin genes and antibiogram pattern in *Escherichia coli* isolates from sheep meat on Indian market. **Veterinarski. Arhiv.** 77(6):485-494.