

PEMILAHAN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAIN AGR-ENTEROTOKSIN RESISTEN NEUTROFIL SEBAGAI DASAR DETEKSI MASTITIS

Siti Isrina Oktavia Salasia¹, Surya Amanu², Khusnan³, dan Edi Boedi Santosa¹

¹Bagian Patologi Klinik, ²Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna 2, Karangmalang, Yogyakarta 55281, E-mail: isrinasalasia@ugm.ac.id ³Akademi Peternakan Brahmputra, Jl. Gurami Nitikan UH VI/237, Yogyakarta 55162.

Abstract

Staphylococcus aureus is recognized worldwide as a major pathogen causing subclinical intramammary infections in dairy cows and food poisoning due to its ability to produce enterotoxin. The study aimed to identify enterotoxins of *S. aureus* and clustering the enterotoxins based on *assessory gene regulator (agr)*. Virulence of *S. aureus* to the host was characterized based on the response of polymorphonuclear cells to the infection. Twelve *S. aureus* could be isolated from milk cows in central of dairy farming in Sumedang West Java. The identification of *S. aureus* was based on cultural and biochemical tests and an amplification of a specific section of the 23S rRNA gene. The sensitivity test against antibiotics revealed that some isolates of *S. aureus* were resistant to penicillin and methycillin. By PCR amplification one or more staphylococcal enterotoxin genes could be observed five genes in combinations of *sea* (216 bp), *seb* (478 bp), *seh* (375 bp), *sei* (576 bp), and *sej* (142 bp). Clustering of *S. aureus* based on the *assessory gene regulator* could be grouped into 4 clusters for *agr1* (1 isolat), *agr2* (2 isolates), in combination for *agr1* and *agr2* (1 isolate), and for non *agr* (2 isolates). Based on the response of polymorphonuclear cell *in vitro* and *in vivo* assays, revealed that *S. aureus* strain I-2 (*agr1* cluster) and P1 (*agr1+agr2* cluster) were more resistant to polymorphonuclear cells and could survive intracellularly, indicated that these strains could be used as proper candidates to develop dignostic tool based on *agr* against staphylococcal mastitis.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, enterotoxin, *agr*, neutrophil, mastitis

1. PENDAHULUAN

Mastitis pada sapi perah menyebabkan produksi susu turun yang berakibat pada kerugian ekonomi yang cukup signifikan bagi industri susu (Roberson *et al.*, 1994; Salasia dkk., 2009). Mastitis subklinis sulit untuk dideteksi karena sapi yang terinfeksi tidak menunjukkan gejala sakit, tetapi produksi susu turun secara signifikan. Susu yang berasal dari kasus mastitis subklinis mengandung banyak bakteri, terutama *Staphylococcus aureus*. Untuk peneguhan diagnosis mastitis secara tepat diperlukan perangkat diagnostik yang sensitif, cepat dan akurat sehingga dapat segera ditentukan strategi pengobatan yang tepat dan aman untuk pemulihan produksi susu.

Produksi susu segar nasional hingga saat ini belum bisa mencukupi kebutuhan bahan baku industri pengolahan susu. Produksi bahan baku lokal hanya memberikan kontribusi 30% atau sekitar 673.000 ton, sedangkan 70% atau sekitar 1.800.000 ton diperoleh secara impor dari Australia, New Zealand, Eropa, dan Amerika. Rendahnya tingkat produksi susu di Indonesia antara lain terkait dengan standarisasi kualitas susu. Produk susu segar

yang dihasilkan juga memiliki kualitas yang rendah, rentan terkena bakteri, kandungan protein yang rendah dan sulit larut dengan air (Anonim, 2008).

Mayoritas penurunan produksi susu sapi perah akibat kasus mastitis disebabkan oleh bakteri, terutama *S. aureus* (Salasia dkk., 2009). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri penyebab keracunan pangan, karena *S. aureus* memproduksi enterotoksin (*staphylococcal enterotoxin/SE*). Susu sapi yang mengandung *S. aureus* dapat membahayakan bagi konsumen. *Staphylococcus aureus* dalam susu segar (hulu) dan produk pangan olahan berbahan susu (hilir) dapat menyebabkan *toxic shock syndrome* dan *food borne diseases* sebagai akibat dari keracunan pangan. Dalam 1 strain *S. aureus* dapat mengandung berbagai macam gen yang bertanggung jawab dalam produksi enterotoksin (Salasia dkk, 2006). Kombinasi lokasi gen ini dapat digunakan untuk menentukan patogenesis, sehingga berdasarkan sifat patogenesis tersebut akan mempermudah dalam menentukan strategi kontrol dan pengendalian infeksi *S. aureus*. Berbagai macam stafilokokal enterotoksin diatur oleh sistem pengontrol gen yang mengekspresikan faktor-

faktor virulen *S. aureus* yang disebut dengan *accessory gene regulator (agr)* (Kornblum *et al.*, 1990). Gen *agr* ini dapat digunakan sebagai dasar pengembangan deteksi *staphylococcal mastitis* dan enterotoksikosis, untuk memperoleh produk susu yang aman dan sehat.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan strain *S. aureus* yang mengandung gen enterotoksin dan *accessory gene regulator* yang bersifat resisten terhadap sel polimorfonuklear/neutrofil, dalam rangka memperoleh kandidat strain *S. aureus* sebagai dasar pengembangan sarana deteksi *staphylococcal mastitis* dan *food borne disease*. Deteksi secara dini keberadaan SE pada susu sapi segar dan berbagai produk olahan yang berbahan susu sapi dapat digunakan untuk meningkatkan kualitas pangan olahan yang berbahan susu sapi.

2. BAHASAN

2.1. Metode

2.1.1. Isolasi dan Identifikasi *S. aureus*

Staphylococcus aureus diisolasi dari susu sapi perah di sentra peternakan sapi perah Sumedang, Jawa Barat. Sampel susu diambil secara random pada 58 ekor sapi baik yang menunjukkan gejala sakit (mastitis klinis) maupun tidak menunjukkan gejala klinis (mastitis subklinis). Identifikasi bakteri dilakukan melalui pengamatan terhadap sifat pertumbuhan bakteri dalam media padat (PAD), pewarnaan Gram, uji *mannitol salt agar* (MSA), katalase, dan koagulase. Tipe hemolisis ditentukan berdasar adanya zona hemolisis yang dibentuk oleh *S. aureus* pada plat agar darah, setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan dilanjutkan pada suhu 4°C selama 24 jam (Skalka *et al.*, 1979).

2.1.2. Uji Kepekaan Antibiotika

Kepekaan antibiotika terhadap *S. aureus* dilakukan melalui uji difusi agar Müller-Hinton (Oxoid, Wesel, Germany), dengan menempelkan lempengan diskus antibiotik (Oxoid). Zona inhibisi yang terbentuk setelah inkubasi pada susu 37°C selama 24 jam, dievaluasi sesuai dengan ketentuan NCCLS (1998). Hasil yang diperoleh disesuaikan dengan tabel interpretasi standar zona hambatan Kirby-Bauer (Jang, *et al.*, 1980; Woods dan Washington, 1995).

2.1.3. Preparasi DNA

DNA *S. aureus* diekstraksi dengan menggunakan *Qiamp tissue kit* (Qiagen, Hilden,

Germany) sesuai prosedur yang telah ditentukan oleh pabrik. Setelah bakteri ditanam pada plat agar darah selama 24 jam pada suhu 37°C, 5-10 koloni bakteri disuspensikan dalam buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8, yang mengandung 5 µl *lysostaphin* (1.8 U/µl; Sigma, Aldrich, USA). Setelah inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 25 µl of proteinase K (14,8 mg/ml; Sigma) dan 200 µl of buffer AL (yang berisi reagen AL1 and AL2). Suspensi bakteri diinkubasi selama 3 menit pada suhu 70°C dan selama 10 menit pada suhu 95°C, kemudian setelah disentrifuse beberapa detik sebanyak 420 µl etanol ditambahkan kedalam masing-masing sampel dan ditempatkan kedalam kolom QIAamp. Setelah sentrifugasi selama 1 menit kolom QIAamp ditempatkan diatas tabung koleksi dan sampel dicuci dua kali dengan 500 µl of buffer AW (Qiagen). Kolom QIAamp kemudian disentrifus selama 3 menit, kolom kemudian ditempatkan diatas 2 ml tabung *ependorf* dan DNA yang ada pada kolom dicuci dua kali dengan cara elusi dengan 200 µl buffer AE. Hasil elusi sampel DNA dapat disimpan pada suhu -20°C (Salasia *et al.*, 2004).

2.1.4. Identifikasi gen 23 SrRNA *S. Aureus*

Identifikasi spesies spesifik *S. aureus* dilakukan berdasar amplifikasi gen 23S rRNA dengan menggunakan primer spesies spesifik dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dengan program yang telah ditentukan berdasar referensi (Toshkove *et al.*, 2001).

2.1.5. Amplifikasi gen enterotoksin dengan PCR

Identifikasi gen enterotoksin *S. aureus* (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*) ditentukan dengan menggunakan primer spesifik untuk masing-masing enterotoksin dan program PCR berdasar referensi (Salasia *et al.*, 2004). Campuran reaksi untuk PCR sebanyak 30 µl terdiri atas 1 µl primer 1 (10 pmol), 1 µl primer 2 (10 pmol), 0.6 µl dNTP (10 mM; MBI Fermentas, St. Leon Rot, Germany), 3.0 µl 10 x thermophilic buffer (Promega/Boehringer, Ingelheim, Germany), 1.8 µl MgCl₂ (25 mM; Promega/Boehringer) dan 0.2 µl *Taq* DNA *polymerase* (5U/µl; Promega/Boehringer) dan 21.4 µl aquades. Masing-masing reaksi kemudian ditambahkan 1 µl DNA. Campuran reaksi disentrifus beberapa detik, dan dimasukkan kedalam *thermal cycler* T3 (Biometra, Göttingen, Germany). Hasil dapat dibaca dengan menggunakan gel agar DNA setelah dielektroforesis dan dianalisis dengan melihat adanya pita tunggal pada gel dengan pembandingan kontrol negatif *S. epidermidis*.

2.1.6. Amplifikasi *accessory gen regulator (agr)*

Identifikasi *agr* ditentukan dengan menggunakan primer spesifik untuk *agrI*: 5'-CAC TTA TCATCAAAG AGC C -3' dan *agrII*: 5'-CCA CTAATT ATA GCT GG -3' dengan program PCR yang telah ditentukan berdasar Moore and Lindsay (2001), 32 siklus (94°C 30 detik, 55°C 30 detik, 72°C 60 detik), sumber sekuen: AF94826. Besar amplicon *agrI* sekitar 351 bp dan *agrII* sekitar 1200 bp.

2.1.7. Uji respon neutrofil secara *in vivo*

Bakteri ditanam dalam 10 ml THB pada temperatur 37°C selama 24 jam. Setelah di-*vortex*, kultur bakteri disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet ditambah 5 ml *Hanks balanced salt solution* (HBSS, Sigma), diresuspensi dan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet ditambah 5 ml HBSS dan ditentukan *optical density* (OD)-nya menggunakan spektrofotometer dengan 10% transmisi pada 620 nm sehingga diperoleh larutan sebanyak 10^8 bakteri/ml. Suspensi yang digunakan untuk uji *in vivo* adalah pengenceran larutan tersebut menjadi 10^6 bakteri/ml dalam HBSS. Sebanyak 10 ekor mencit Balb/c (UPHP UGM) masing-masing diinjeksi dengan larutan kultur *S. aureus* (10^8 bakteri/ml) dari berbagai klaster. Sebelum dan setelah 5 hari infeksi, masing-masing mencit diambil darah melalui *plexus retroorbitalis*, kemudian darah diperiksa terhadap jenis differensial leukosit (neutrofil). Sebagian darah diteteskan pada gelas obyek, kemudian diapuskan dan diberi pewarnaan Giemsa 10% (Barta, 1993), untuk diamati respon terhadap *S. aureus* yang telah diinfeksi dengan memperhitungkan persentase respon neutrofil sebelum dan sesudah infeksi.

2.1.8. Uji fagositosis *in vitro*

Darah manusia diambil dari *vena brachialis* sebanyak 5 ml dengan menggunakan spuit *disposable syringe* 5 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi 1mg/ml EDTA. Sebanyak 2,5 ml larutan Histopaque 1191 (Sigma) dimasukkan kedalam tabung ditambah 2,5 ml larutan Histopaque 1077 (Sigma), kemudian ditambahkan 5 ml darah

secara perlahan melalui dinding tabung dan disentrifus dengan kecepatan 700 g selama 30 menit pada suhu 20°C. Setelah sentrifugasi akan diperoleh 6 lapisan dengan susunan dari atas ke bawah yaitu plasma, monosit, Histopaque 1191, granulosit (*polymorphonuclear/PMN sel*), Histopaque 1077 dan eritrosit. Lapisan granulosit kemudian diambil dengan menggunakan pipet *pasteur* dimasukkan dalam *ependorf*, disentrifuse dan dicuci dengan menggunakan HBSS. Granulosit dihitung dengan *haemocytometer*, sehingga diperoleh larutan granulosit sekitar 5×10^5 sel/ml. Larutan granulosit (5×10^5 sel/ml) sebanyak 100 L dimasukkan ke dalam *ependorf* yang telah berisi 100 L larutan bakteri (10^8 bakteri/ml), dicampur dan diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 37°C selama 1 jam. Setelah inkubasi larutan ditambah 800 L HBSS dingin, disentrifuse 1000 g selama 7 menit. Supernatan dibuang dan endapan ditambah 200 L larutan Acridine orange (20 g/ml, Sigma) dan 800 L HBSS dingin, dibiarkan selama 45 menit. Aktivitas fagositosis sel PMN/neutrofil ditentukan dengan menghitung jumlah bakteri yang difagosit oleh setiap sel neutrofil dari 20 sel neutrofil pada setiap preparat apus menggunakan mikroskop *fluorescence* (Olympus, USA). Sel-sel bakteri yang mati akan berwarna merah dan sel yang masih hidup (*intracellular survive*) akan berpendar warna hijau (Barta, 1993; Salasia, 1994).

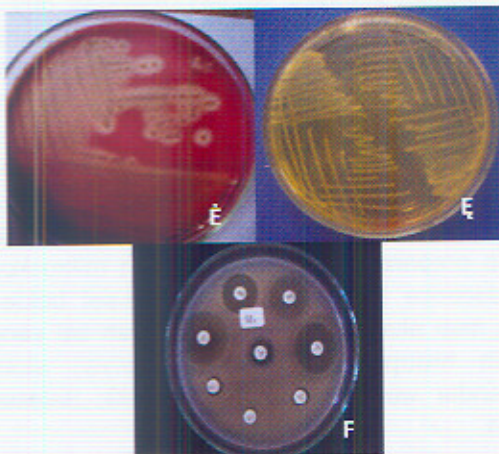
2.2. Hasil

Hasil pengamatan klinis, terdapat 4 ekor sapi perah yang menunjukkan gejala klinis mastitis, ditandai dengan ambing bengkak, palpasi keras seperti batu, dan terlihat puting bocor. Sebagian besar sapi perah tidak menampakkan gejala klinis mastitis (mastitis subklinis). Dari sampel susu sapi perah mastitis klinis dan subklinis, dapat diidentifikasi 12 isolat *S. aureus* berdasar sifat pertumbuhan, Gram positif, positif pada uji MSA, katalase, koagulase, dan mengandung gen 23S rRNA. Hasil identifikasi *S. aureus*, uji hemolisin dan resistensi terhadap berbagai antibiotika dapat dilihat pada Tabel 1, Gambar 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Identifikasi *Staphylococcus aureus* isolat asal susu sapi perah pada sentra peternakan sapi perah Sumedang Jawa Barat

No.	Kode Isolat	Gejala Mastitis	Gram	MSA	Koagulase	Katalase
1.	P5	subklinis	+	+	+	+
2.	I2	subklinis	+	+	+	+
3.	P1	subklinis	+	+	+	+
4.	D10	subklinis	+	+	+	+
5.	MJL2	klinis	+	+	+	+
6.	Jaed 2	klinis	+	+	+	+
7.	S279	subklinis	+	+	+	+
8.	D6	subklinis	+	+	+	+
9.	S219	subklinis	+	+	+	+
10.	S3	subklinis	+	+	+	+
11.	A10932	subklinis	+	+	+	+
12.	I-4	subklinis	+	+	+	+

Keterangan: MSA = manitol salt agar



Gambar 1. Pertumbuhan *S. aureus* pada plat agar darah memperlihatkan sifat beta hemolisis (A), memfermentasi manitol salt agar (B), uji antibiogram pada agar Müller-Hinton: *S. aureus* sensitif terhadap gentamisin, oksasilin, ampisilin, tetrasiklin, dan intermedier terhadap penisilin dan resisten terhadap metisilin (C).

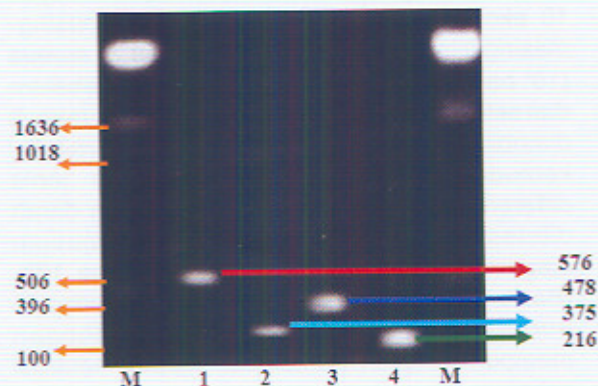
Tabel 2. Persentase kepekaan *Staphylococcus aureus* terhadap berbagai antibiotika

Jenis Antibiotika	Jumlah Isolat/Resisten (%)	Jumlah Isolat/Intermedier (%)	Jumlah Isolat/Sensitif (%)
Gentamisin	0/0	0/0	6/100
Oksasilin	0/0	0/0	6/100
Metisilin	6/100	0/0	0/0
Ampisilin	0/0	1/16,7	5/83,3
Tetrasiklin	0/0	0/0	6/100
Penisilin	2/33,4	4/66,6	0/0

Hasil uji sensitifitas terhadap berbagai antibiotika, diketahui bahwa *S. aureus* sensitif terhadap gentamisin (100%), oksasilin (100%), ampisilin (83,3%), intermedier terhadap ampisilin (16,7%) dan penisilin (66,6%), dan resisten terhadap penisilin (33,4%) dan metisilin (100%). Hasil identifikasi gen enterotoksin terhadap 6 isolat *S. aureus*, terdapat 5 macam gen enterotoksin yaitu sea (216 bp), seb (478 bp), seh (375 bp), dan sei (576 bp). Dalam penelitian ini terdapat 5 isolat *S. aureus* mempunyai kombinasi 4 gen enterotoksin (sea, seb, seh, sei) dan 1 isolat dengan kombinasi 5 gen (sea, seb, seh, sei, sej) (Tabel 3 dan Gambar 2).

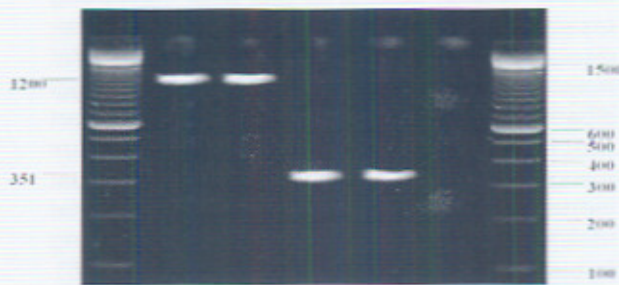
Tabel 3. Identifikasi gen 23S rRNA dan gen enterotoksin *S. aureus*

No.	Kode	23S rRNA	Gen Enterotoksin								
			sea	seb	sec	sod	see	seg	seh	sei	sej
1.	P5	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
2.	I-2	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
3.	P1	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
4.	MJL2	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
5.	Jaed 2	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
6.	I-4	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-



Gambar 2. Analisis gen enterotoksin sei (576 bp, lajur 1), seh (375 bp, lajur 2), seb (478 bp, lajur 3), dan sea (216 bp, lajur 4). M = marker DNA ladder.

Hasil analisis *assessory gene regulator* (*agr*) yang mengatur berbagai determinan virulen *S. aureus* dapat dilihat pada Gambar 3 dan Tabel 3, *agr1* mempunyai ukuran ampikat sebesar 351 bp dan *agr2* sebesar 1200 bp. Berdasar analisis gen *agr*, *S. aureus* dalam penelitian ini dapat dikelompokkan menjadi 4 klaster, yaitu klaster *agr1* (I-2), klaster *agr2* (P5 dan MJL2), klaster *agr1+agr2* (P1), dan klaster non-*agr* (Jaed dan I-4) (Tabel 3).



Gambar 3. Analisis assessorary gene regulator (agr) *S. aureus* dengan ukuran 351 bp (agr1) dan 1200 bp (agr2). Lajur 1 (agr2, P5), lajur 2 (agr2, P1), lajur 3 (agr1, P1), lajur 4 (agr1, I-2), lajur 5 (non-agr, Jaed2). M = marker DNA ladder.

Tabel 3. Analisis gen enterotoksin dan assessorary gene regulator (agr) *S. aureus*

No.	Kode Isolat	Gen Enterotoksin	agr1	agr2	Klasier
1.	P5	se (a, b, h, i)	-	+	agr2
2.	I-2	se (a, b, h, i, j)	+	-	agr1
3.	P1	se (a, b, h, i)	+	+	agr1+agr2
4.	MJL2	se (a, b, h, i)	-	+	agr2
5.	Jaed 2	se (a, b, h, i)	-	-	non-agr
6.	I-4	se (a, b, h, i)	-	-	non-agr

Dari hasil klasterisasi tersebut, selanjutnya *S. aureus* masing-masing klaster dilakukan uji fagositosis untuk mengetahui ketahanan masing-masing strain terhadap fagositosis sel polimorfonuklear/neutrofil. Hasil uji fagositosis dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji fagositosis neutrofil (*in vitro*) dan respon neutrofil terhadap infeksi *S. aureus* (*in vivo*)

Klasier	Kode Isolat	Toxin gen	Uji Fagositosis Sel neutrofil <i>in vitro</i> (Rerata jumlah sel bakteri hidup/mes)	Peningkatan Respon Neutrofil (%) <i>in vivo</i>
Non-agr	Jaed2	se (a, b, h, i)	(54.0) 27.7/26.3	109.52
agr1	I-2	se (a, b, h, i, j)	(83.2) 52.6/30.6	20.83
agr2	P5	se (a, b, h, i)	(38.4) 20.1/18.3	184.21
agr1+agr 2	P1	se (a, b, h, i)	(97.2) 48.3/48.9	18.75

Dari hasil uji neutrofil secara *in vitro* dan *in vivo* dapat dilihat bahwa *S. aureus* strain I-2 yang termasuk dalam klaster *agr1* dengan kombinasi gen enterotoksin se (a, b, h, i, j) dan strain P1 yang termasuk dalam klaster *agr1+agr2*, mengandung gen toksin dengan kombinasi se (a, b, h, i), mampu bertahan hidup dalam sel neutrofil dalam jumlah lebih banyak masing-masing sebesar 52.6 bakteri/neutrofil dan 48.3 bakteri/neutrofil.

2.3. Pembahasan

Dalam penelitian diketahui bahwa produksi susu sapi perah di sentra peternakan Sumedang, Jawa Barat, turun semula sekitar 16 ton/hari berkurang menjadi 12 ton/hari (sekitar 25%). Penurunan produksi susu ini diperkirakan antara lain karena adanya infeksi *S. aureus*, karena dari hasil pemeriksaan sampel susu dapat diisolasi *S. aureus* (20,69%) (Salasia dkk., 2009). *Staphylococcus aureus* dilaporkan merupakan patogen utama penyebab mastitis subklinis dan kronis. Reservoir utama *S. aureus* terdapat dalam kuarter yang terinfeksi, penyebaran diantara sapi terjadi selama proses pemerahan (Akineden *et al.*, 2001). Infeksi intra mammae ini dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang cukup besar terutama karena turunnya produksi susu antara 10-25% dari total produksi susu sapi (Han *et al.*, 2000).

Hasil pengamatan berdasar gejala klinis diketahui bahwa sebanyak 4 ekor sapi perah (6,9%) memperlihatkan gejala klinis mastitis, dan sebanyak 54 ekor (93,1%) tidak menunjukkan gejala (mastitis subklinis). Agus (1991) melaporkan bahwa diantara 56 ekor sapi perah di peternakan sapi perah Baturaden, 41 ekor (73,2%) menderita mastitis subklinis, dan 9,1% diantaranya disebabkan oleh *S. aureus*. Barkema *et al.* (1998) juga melaporkan bahwa mastitis klinis di peternakan sapi perah di Belanda terutama disebabkan oleh *S. aureus*. Smith *et al.* (1998) pernah melaporkan bahwa wabah mastitis di USA disebabkan oleh agen tunggal *S. aureus*.

Identifikasi *S. aureus* dalam penelitian ini diteguhkan berdasar sifat pertumbuhan, uji biokimia dan amplifikasi spesies spesifik gen 23S rRNA. Identifikasi molekuler *S. aureus* dengan menggunakan target gen 23S rRNA dapat digunakan untuk identifikasi bakteri secara sensitif dan spesifik (Straub *et al.*, 1999; Salasia *et al.*, 2004). Hasil identifikasi lanjut diketahui bahwa diantara 6 isolat *S. aureus* mampu memperlihatkan hemolisin alfa (4 isolat/66,7%) dan 2 isolat (33,3%) bersifat beta hemolitik. Hemolisin tipe alfa dan beta dilaporkan lebih

patogen, dibanding tipe gamma yang tidak membentuk zona hemolisis pada media agar darah (Blobel and Schließer, 1994). Dalam penelitian ini dapat dideteksi adanya beberapa *S. aureus* yang diisolasi dari susu sapi perah membentuk jenis hemolisin tipe alfa dan beta yang kemungkinan bersifat patogen. Hemolisin merupakan salah satu toksin yang diproduksi oleh *S. aureus*. Menurut Jawetz *et al.* (1982) dan Joklik *et al.* (1992), alfa hemolisin mempunyai aktivitas biologik yang luas, yaitu hemolitik dan dermonekrotik. Alfa hemolisin dapat melarutkan erosit kelinci dan merusak trombosit, toksin ini juga merusak sistem sirkulasi, jaringan otot, jaringan korteks ginjal dan dapat menimbulkan berbagai kerusakan jaringan. Menurut Todar (2005), beta hemolisin merupakan *sphingomyelinase*, yang dapat menyebabkan kerusakan pada membran yang mempunyai kandungan banyak lipid, hal ini dapat terjadi karena beta toksin mempunyai enzim dengan substrat spesifik, yaitu sfingomyelin dan lisofosfolipida. Degradasi sfingomyelin akan menyebabkan lesi membran dan memacu hemolisis, terutama jika sel dalam kondisi dingin (Joklik *et al.*, 1992). Brückler *et al.* (1994) juga melaporkan bahwa beta toksin dapat menyebabkan *hot-cold*, reaksi beta toksin akan meningkat pada suhu 4°C.

Permasalahan utama dalam mengatasi infeksi *S. aureus* adalah masalah resistensi terhadap antibiotik. Beberapa strain *S. aureus* saat ini dilaporkan telah resisten terhadap hampir semua antibiotik komersial (Todar, 2002). Dari hasil penelitian ini diketahui ada beberapa isolat bersifat intermedier terhadap antibiotik (ampisilin dan penisilin), kondisi tersebut kemungkinan akan berubah menjadi resisten, karena sifat intermedier akan cenderung menjadi resisten. Ampisilin merupakan derivat penisilin. Dengan perkembangan penelitian tentang antibiotika, telah ditemukan derivat penisilin yaitu *methicillin* yang efektif terhadap mikroorganisme yang resisten dengan penisilin karena antibiotik ini tidak rusak oleh enzim beta laktamase (Black, 1999). Namun telah dilaporkan bahwa di beberapa rumah sakit terjadi peningkatan frekuensi *methicillin resistant S. aureus* (MRSA) dan biasanya strain MRSA ini resisten terhadap multipel antibiotik (Na'was *et al.*, 1997; Todar, 2002). Penisilin efektif melawan bakteri gram positif tetapi tidak efektif melawan bakteri gram negatif Mutschler (1999). Mekanisme kerja penisilin adalah menghambat sintesis dinding sel dan aktivasi enzim proteolitik pada dinding sel. Enzim β -laktamase yang dihasilkan oleh *S. aureus* menyebabkan pecahnya cincin β -laktam sehingga aktivitas antibiotik ini hilang. Jadi *S.*

aureus bersifat kurang sensitif atau cenderung resisten terhadap penisilin. Dari hasil penelitian diketahui bahwa *S. aureus* mempunyai sifat resisten terhadap penisilin G paling tinggi dibanding antibiotik lainnya. Hal ini dikarenakan *Staphylococcus spp.* terutama *S. aureus* menghasilkan enzim beta laktamase yang dapat merusak obat tersebut (Katzung, 1998). Sifat resistensi juga ditentukan oleh gen resisten yang terbawa oleh plasmid (Woodford *et al.*, 1998). Kegagalan pengobatan menggunakan antibiotik dapat juga disebabkan karena kegagalan antibiotik mencapai jaringan yang terinfeksi atau bakteri penyebabnya (Godkin, 1998). Bakteri umumnya bertahan pada jaringan dalam beberapa minggu atau bulan sebagai penyebab penyakit (Bramley, 1991). Resistensi *S. aureus* terhadap antibiotik dapat pula disebabkan oleh adanya faktor lingkungan dan penggunaan antibiotik yang tidak tuntas. Bakteri mempunyai seperangkat cara untuk beradaptasi terhadap lingkungan yang mengandung antibiotik. Ada beberapa mikroba yang tidak peka terhadap antibiotik tertentu karena memang sifat mikroba secara alamiah tidak dapat diganggu oleh antibiotik tersebut. Hal ini disebabkan karena tidak adanya septor yang cocok atau dinding sel mikroba tidak dapat ditembus oleh antibiotik.

Adanya enterotoksin yang diproduksi oleh *S. aureus* dapat memperparah kondisi mastitis pada sapi perah, yang berakibat pada penurunan produksi susu. Disamping itu enterotoksin dalam susu segar dapat menyebabkan kasus keracunan pangan. Stafilokokal enterotoksin sering sebagai sumber pencemar makanan, karena enterotoksin ini tahan terhadap pemanasan dan tahan terhadap enzim protease seperti pepsin yang terdapat dalam saluran pencernaan. Stabilitas SE terhadap pemanasan dan enzim-enzim pencernaan merupakan salah satu sifat yang sangat penting berkaitan dengan keamanan pangan, karena toksin akan tetap bertahan meskipun suatu bahan makanan yang tercemar SE sudah dimasak atau dipanaskan dan toksin ini apabila sudah termakan akan tahan terhadap enzim-enzim yang ada dalam saluran pencernaan (Balaban dan Rasooly, 2000).

Dalam penelitian ini diketahui *S. aureus* mengandung gen *sea* yang menyandi enterotoksin tipe A (SEA). *Outbreak* keracunan pangan dilaporkan lebih sering akibat stafilokokal enterotoksin tipe A (SEA). Kadar enterotoksin dalam menimbulkan enterotoksikosis relatif sangat kecil, dosis infeksi kurang dari 1 μ g dalam makanan yang terkontaminasi, dapat mengakibatkan gejala-gejala intoksikasi. Dosis toksin ini dapat dicapai apabila terdapat populasi *S. aureus* mencapai

100.000 per gram. Kejadian enterotoksikosis di AS dilaporkan akibat konsumsi susu coklat yang mengandung SEA. Pada kasus tersebut kadar rata-rata SEA dalam 400 ml kontainer hanya sekitar 0.5 ng/ml. Enterotoksin dapat dideteksi apabila terdapat toksin sedikitnya sekitar 10^3 /g inokulat *S. aureus* (Balaban dan Rasooly, 2000; Le Loir *et al.*, 2003).

Salasia *et al.*, (2003) melaporkan adanya gen *sea*, *seb*, *seg*, *seh* dan *sei* serta gen kombinasi *see* dengan *seh*, *sea* dan *seh*, *seg* dengan *sei* dan kombinasi *seb*, *seg*, *seh* dengan *sei* pada *S. aureus* isolat asal manusia di Yogyakarta. Gen *seb*, serta kombinasi *seg* dengan *sei* juga dilaporkan terdapat pada *S. aureus* yang diisolasi dari kasus *staphylococcal scarlet fever* di rumah sakit pusat Taiwan bagian utara (Wang *et al.*, 2004). Kasus fatal endokarditis yang disebabkan oleh stafilokokal enterotoksin A pernah dilaporkan terjadi pada wanita yang awalnya menderita radang telinga bagian tengah yang berlanjut menjadi endokarditis (Ellis *et al.*, 2003).

Dalam penelitian ini gen penyandi stafilokokal enterotoksin B (*seb*) dapat pula diidentifikasi pada *S. aureus* asal susu sapi perah Sumedang Jawa Barat. Enterotoksin tipe B telah dilaporkan mempunyai potensi dalam meningkatkan aktifitas superantigen (Greenfield *et al.*, 2002). Sifat penting stafilokokal yang bersifat superantigenik, yaitu dengan memperlihatkan aktifitasnya melalui interaksi antara antigen dan limfosit T, tanpa adanya spesifitas antigen pada sel. Kondisi ini merangsang terjadinya proliferasi sel dan peningkatan sitokin dengan konsentrasi yang tinggi (Ferrens *et al.*, 1998). Sitokin yang diproduksi dalam jumlah yang banyak mengakibatkan gejala-gejala *toxic shock syndrome* (Todar, 2005).

Dalam penelitian ini dapat diidentifikasi pula gen enterotoksin tipe H (*seh*) dan tipe I (*sei*). Gen stafilokokal enterotoksin *seb*, *seg*, *seh* dan *sei* pernah diidentifikasi dari isolat *S. aureus* yang diisolasi dari susu sapi segar yang menderita mastitis subklinis di wilayah Jawa Tengah (Salasia *et al.*, 2004). Gen stafilokokal enterotoksin *seg*, *sei* dan *sej* merupakan gen enterotoksin yang lebih sering ditemukan pada sapi yang mengalami mastitis. Di wilayah Hesse, Jerman lebih dominan ditemukan gen stafilokokal enterotoksin *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* dan *sej* isolat *S. aureus* dari sapi yang menderita mastitis subklinis (Salasia, *et al.*, 2004).

Adanya kombinasi berbagai gen enterotoksin dalam *S. aureus* kemungkinan dikarenakan gen-gen tersebut secara struktural saling berdekatan. Kebanyakan *pathogenicity islands* *S. aureus* memiliki gen yang mengontrol *toxic shock syndrome toxin (tst)*, *s-* dan *cell-like*

protein (Fitzgerald *et al.*, 2001) serta gen yang mengontrol stafilokokal enterotoksin B, K, dan Q (Yarwood *et al.*, 2002). Zhang *et al.* (1998) melaporkan bahwa dalam *pathogenicity islands* terdapat gen *tst* dan *open reading frame* yang sekuennya mirip dengan gen yang menyandi stafilokokal enterotoksin serta satu bagian yang mengandung gen enterotoksin D dan J. Grup gen enterotoksin yang terdiri dari *seg*, *sei*, *sen*, *seo*, dan *sem* disandi oleh *enterotoxin gene cluster (egc)* (Jarraud *et al.*, 2001). Gen *seg*, *seh*, *sei* dan kombinasi dengan gen *sea* dan atau *sed* juga dilaporkan terdapat pada *S. aureus* yang berhasil diisolasi dari sampel makanan (Chen *et al.*, 2004).

Keberadaan *S. aureus* dalam susu segar dapat membahayakan bagi manusia (konsumen), karena diketahui bahwa *S. aureus* memproduksi beberapa macam enterotoksin yang menyebabkan *toxic shock syndrome* (Marrack dan Kappler, 1990; Dinges *et al.*, 2000; Omoe *et al.*, 2002). Penyebab penting pada kasus keracunan makanan yaitu enterotoksin yang dihasilkan ketika *S. aureus* tumbuh pada makanan yang mengandung karbohidrat dan protein (Jawetz *et al.*, 2001). *Staphylococcus aureus* bersifat patogen karena adanya kombinasi toksin mediasi virulensi, invasif dan resistensi terhadap antibiotik (Le Loir *et al.*, 2003).

Pemisahan neutrofil dari komponen darah lain digunakan larutan Histopaque (Barta, 1993), yang dapat memisahkan secara jelas antara sel neutrofil (*polymorphonuclear cell*) dengan monosit (*mononuclear cell*). Uji fagositosis ditentukan berdasar perhitungan jumlah *S. aureus* yang difagosit oleh sel neutrofil. Teknik pewarnaan bakteri dengan menggunakan *acridine orange* mampu memperlihatkan kemampuan bakteri untuk *intracellular survive* dalam sel neutrofil. Bakteri yang mampu bertahan hidup dalam neutrofil tampak berwarna hijau, sedangkan bakteri yang telah mati akan tampak berwarna merah akibat rusaknya DNA dalam inti sel (Barta, 1993). Respon sel neutrofil terhadap infeksi *S. aureus* secara *in vivo* pada mencit percobaan, ditentukan berdasar persentase peningkatan jumlah neutrofil sebelum dan sesudah infeksi. Dari hasil penelitian terlihat bahwa *S. aureus* dari berbagai wakil klaster memperlihatkan respon neutrofil yang bervariasi.

Aktivitas fagositosis lebih tinggi (> 70 bakteri/neutrofil) diperlihatkan pada neutrofil yang mampu melakukan fagositosis terhadap *S. aureus* lebih banyak secara berturut-turut pada klaster *agr1+2* (strain P1) yang mampu memfagosit sebanyak 97.2 bakteri (terdiri dari bakteri yang hidup 48.3 sel dan yang mati 46.9 sel), dan *agr1* (strain I-2) yang mampu memfagosit 83.3 bakteri (bertahan hidup 52.6

bakteri dan mati 30.6 bakteri). Klaster non-*agr* (*Jaed2*) dan *agr2* (P5), lebih sedikit difagosit oleh sel-sel neutrofil (Tabel 4). Aktifitas fagositosis sel neutrofil yang cukup tinggi terhadap *S. aureus* (strain P1 dan I-2), menunjukkan bahwa sel neutrofil sangat responsif terhadap infeksi *S. aureus*. Apabila dilihat dari kemampuan *S. aureus* yang mampu bertahan hidup (*intracellular survive*) terhadap fagositosis neutrofil, menunjukkan bahwa bakteri mampu bertahan terhadap sistem pertahanan sel neutrofil hospes. Dari hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa *S. aureus* strain P1 dan I-2, kemungkinan mempunyai sifat lebih patogen, atau dengan kata lain *S. aureus* strain P1 dan I-2 lebih resisten terhadap neutrofil (mampu *survive* dalam neutrofil). Sifat patogen atau resisten terhadap sistem pertahanan tubuh hospes ini kemungkinan karena bakteri dilindungi oleh berbagai determinan virulen ataupun enterotoksin yang terkandung dari masing-masing *S. aureus* baik secara sendiri-sendiri maupun secara sinergi yang dapat memperparah terjadinya infeksi pada hospes yang terinfeksi. Bakteri yang mampu *intracellular survive* akan berlindung dalam sel fagositik tanpa dikenal asing oleh sistem pertahanan tubuh hospes, sampai akhirnya bakteri tersebut dapat menyebar keseluruhan tubuh dan merusak jaringan hospes secara lebih luas.

Dari aktifitas fagositosis sel neutrofil secara *in vitro* yang relatif tinggi tersebut, sebaliknya terlihat bahwa respon sel neutrofil pada sirkulasi (*in vivo*) tampak rata-rata lebih rendah (< 50%), sedangkan aktifitas fagositosis yang lebih rendah (< 70 sel/neutrofil, *in vitro*) tampak respon neutrofil lebih tinggi (*in vivo*) (Tabel 4). Hal ini dapat difahami bahwa aktifitas fagositosis sel neutrofil terhadap bakteri biasanya terjadi didalam jaringan, ketika neutrofil berada dalam jumlah banyak dalam jaringan, maka neutrofil yang ada dalam sirkulasi akan berkurang karena telah dipasok untuk memenuhi kebutuhan dalam melakukan fungsi fagositosis dalam jaringan (Fieldman *et al.*, 2000).

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa, *S. aureus* strain I-2 (klaster *agr1*) dan strain P1 (klaster *agr1+2*), merupakan kandidat terpilih sebagai strain yang bersifat patogen karena lebih resisten terhadap neutrofil, mampu bertahan hidup dalam sel neutrofil, bersifat resisten terhadap *methicilin*, bersifat alfa hemolitik, dan mengandung kombinasi gen enterotoksin *se* (*a*, *b*, *h*, *i*, dan *j*). Kandidat terpilih *S. aureus* strain I-2 dan P1 dapat digunakan sebagai sumber antigen yang dapat dikembangkan sebagai sarana diagnostik dan kontrol stafilkokal mastitis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim. 2008. Media Indonesia Online, 26 Mei 2008.
2. Akineden, Ö., Annemüller, C., Hassan, A. A., Lämmler, Ch., Wolter, W., Zschöck, M., 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 959-964.
3. Balaban, N. and A. Rasooly, 2000. Review staphylococcal enterotoxins. J. Food Microbiol. 61, 1-10.
4. Black, J. G., 1999. Microbiology Principles and Explorations. Marymount University. 386-387.
5. Blobel, H. and Schließer, T. 1994. Handbuch der Bacteriellen Infektionen bei Tieren. Band II. Teil I. Infektionen und Enterotoxine. Staphylokokken-2 Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
6. Bramley, A. J. 1991. Mastitis : Physiology or Pathology? Flem. Vet. J. (62): Suppl. 1, 3-11.
7. Brückler, J., Schwarz, S., Untermann, F., 1994. Staphylokokken-Infektionen und -Enterotoxine, Band. II/1, In Blobel, H. and Schließer (Herausgeber), Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
8. Chen, T.R., Chiou, C.S. and Tseng, H.Y. 2004. Use of novel PCR primers specific to the genes of Staphylococcal Enterotoxin G, H, J for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. J. Food. Microbiol. 92, 189-197.
9. Dinges, M. M., Orwin, P. M., Schlievert, P. M., 2000. Enterotoxin of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 13, 16-34.
10. Ferrens, W. A., Davis, W. C., Hamilton, M. J., Park, Y. H., Deobald, C. F., Fox, L., Bohach, G., 1998. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. Infect. Immun. 66, 573-580.
11. Fitzgerald J.R., Monday S.R., Foster T.J., Bohach G.A., Hartigan P.J., Meaney W.J. and Smyth C.J. 2001. Characterisation of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. J. Bacteriol. 183, 63-70.
12. Godkin, A. 1998. *Staphylococcus aureus* Mastitis : A contagious bacterial infection of udder. Health Management. OMFRA (5 1 9) : 8 4 6 - 9 6 5 . agodkin@omafra.gov.on.ca. [22-10-1998].
13. Greenfield, R. A., Brown, B. R., Hutchins, J. B., Iandolo, J. J., Jackson, R., Slater, L. N. and Bronze, M. S., 2002. Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. Am. J. Med. Sci. 323, 326-340.

14. Han, H.-R, S.-I. Park, S.-W. Kang, W.-S. Jong and C.-J. Youn, 2000. Capsular polysaccharide typing of domestic mastitis-causing *Staphylococcus aureus* Strains and its potential exploration of bovine mastitis vaccine development I. Capsular polysaccharide typing, isolation and purification of the strain. *J. Vet. Sci.* 1, 53-63.
15. Jang, S. S., Biberstein, E. J., and Hirs, D. C. 1980. A Diagnostic Manual of Veterinary Clinical Bacteriology and Microbiology. UNESCO/CIDA, Peradeniya. 72.
16. Jarraud, S., Peyrat, M.A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M. and Lina, G. 2001. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxins gene, forms A Putative Nursery Of Superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 166, 669-677.
17. Jawetz, E., Melnick, J. L. and Adelberg, E. A., 2001. *Microbiologi Kedokteran*. Edisi Pertama. Penerbit Salemba Medika. 317-326.
18. Joklik, W. K., Willett, H. P., Amos, D. B. and Wilfert, C. M., 1992. *Zinsser microbiology*. 20th ed. Appleton and Lange. California. Pp: 401-413.
19. Katzung, B. G. 1998. *Basic Pharmacology and Clinic*. Departement of Pharmacology University of California. San Fransisco. 699-732.
20. Kornblum, J., Kreiswirth, B. N., Projan, S. N., Ross, H. And Novick, R.P., 1990. *agr*: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. In: *Molecular Biology of the taphylococci* (Novick, R.P., and Skurry, R., eds.). VCH, New York, NY, USA, pp. 373-402.
21. Le loir, Y., Baron, F and Gautier, M, 2003. *Staphylococcus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2 (1), 63-76.
22. Marrack, P. and J. Kappler, 1990. The staphylococcal enterotoxin and their relatives. *Science.* 248, 705-711.
23. Mutschler, E. 1999. *Dinamika Obat*. Edisi ke-5. Diterjemahkan oleh Mathilda B. W. dan Anna S. R. Penerbit ITB, Bandung. Hal 637-642, 649-653.
24. Na'was, T., A. Hawwari, E. Hendrix, J. Hebden, R. Edelman, M. Martin, W. Campbell, R. Naso, R. Schwalbe, and A. I. Fattom, 1998. Phenotypic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates from trauma patients. *J. Clin. Microbiol.* 36 (2), 414-420.
25. Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D. -L., Ueda, Shinagawa, K., 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in isolates and determination of the enterotoxin productivities of *Staphylococcus aureus* isolates harbouring *seg*, *seh*, and *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* 40, 857-862.
26. Roberson, J.R., L.K. Fox, D.D. Hancock, J.M. Gay, and T.E. Besser. 1994. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 77, 3354.
27. Salasia, S. I. O, 1994. *Untersuchungen zu mutmaßlichen Pathogenitätsfaktoren von Streptococcus suis*. *Vet. Med. Diss.* Justus-Liebig-Universität Giessen. Germany.
28. Salasia, S.I.O., Khusnan, C. Lämmeler and H. Nirwati (2003). Pheno-and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from human skin infections in Yogyakarta. *I. J. Biotech.* June, 612-620.
29. Salasia, S.I.O., Z. Khusnan, C. Lämmeler and M. Zschöck (2004): Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine subclinical mastitis in Central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *J.Vet. Sci.* 5 (2), 103-109.
30. Salasia, S.I.O., E.B. Santosa, dan Sugiyono, 2009. Deteksi enterotoksin *Staphylococcus aureus* penyebab mastitis klinis dan subklinis pada sapi perah sebagai upaya untuk memperoleh produk susu sehat. Laporan penelitian Hibah RUSNAS Universitas Gadjah Mada.
31. Skalka, B., J. Smola, and J. Pillich. 1979. A simple method of detecting staphylococcal hemolysin. *Zbl. Bakteriol. Hyg. I. Abt. Orig. A.*, 245, 283-286
32. Smith, T. D., Conout, F. N., Beard, W. J., Willet, P. H., Overman, R. J., Larsh, E. J., Brown, W. L., Sharp, G. O. and Poston, A. M. 1960. *Microbiology*. 12th edition. Appleton Century Cronfts Inc., New York.
33. Straub, J. A., C. Hertel, and W. P. Hammes. 1999. A 23S rRNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food Prot.* 62, 1150-1156.
34. Todar, K., 2002. *Staphylococcus*. *Bacteriology at UW-Bacteriology 330 Home Page*. 1-7.
35. Todar, K. 2005. *Todar's online textbook of bacteriology. Staphylococcus*. University of Wisconsin-Madison Department of B a c t e r i o l o g y . www.textbookofbacteriology.net/staph.html. Tanggal *download*: 1 November 2007.
36. Toshkova, K., Annemüller, C., and Lämmeler, C. 2001. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 17-24.
37. Woodfoed, N., Watson, A. P., Patel, S., Jevon, M., Waghorm, D. J., Cookson, B. D.

1998. Heterogeneous Location of The *mupA* High-level Mupirocin resistance Gene in *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 47, 829-835.
38. Woods, G. I., and Washington, J. A. 1995. *Manual of clinical Microbiology*, 6th ed, ASM Press, Washington, D. C. Pp. 327-341.
39. Yarwood, J. M. and Schlievert, P. M. 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *Clin. Invest.* 112, 1620-1625.
40. Zhang J., landolo J. and Stewart G.C. 1998. The Enterotoxin D Plasmid of *Staphylococcus aureus* Encodes A Second Enterotoxin Determinant (*sej*). *FEMS Microbiol. Lett.* 168, 227-233.