

Deteksi Faktor Virulensi Secara Fenotip pada *Escherichia coli* Isolat Susu Mentah Sapi Perah

(DETECTION OF PHENOTYPICAL VIRULANCE
FACTORS IN *ESCHERICHIA COLI* RAW MILK ISOLATES)

Khusnan, Agus Purnomo

Akademi Peternakan Brahma Putra Yogyakarta,
Jl. Ki Ageng Pemanahan, Nitikan Sorosutan
Umbulharjo Yogyakarta, Indonesia 55162
Email: khusnanzaini@gmail.com

ABSTRAK

Susu sapi merupakan media pertumbuhan bakteri patogen maupun non patogen. *Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri yang sering ditemukan pada susu sapi mentah. *Escherichia coli* patogen pada sapi dapat menyebabkan mastitis maupun radang usus serta dapat menyebabkan masalah kesehatan pada manusia seperti diare, kolitis hemoragik dan sindrom uraemik hemolitik. Hemagglutinin dan hemolisin merupakan faktor virulen yang penting pada *E. coli* patogen, karena berperan sebagai faktor adhesin, dan faktor pertahanan terhadap fagositosis. Tujuan penelitian ini mendeteksi hemagglutinin dan hemolisin *E. coli* isolat asal susu sapi mentah serta kemampuan adhesi pada sel epitel serta pertahanan terhadap fagosit netrofil. Hasil penelitian ini menunjukkan 100% isolat *E. coli* tidak memiliki hemagglutinin dan 17,2% merupakan *E. coli* hemolitik. Pada uji adhesi mampu melekat pada sel epitel bukalis 46,87 bakteri/sel. Pada uji fagositosis isolat-isolat hemolitik lebih sedikit difagosit oleh neutrofil dibandingkan isolat non hemolitik (2,64 dibanding 3,1 bakteri) tiap neutrofil ($P < 0,05$). Ditemukannya *E. coli* patogen pada susu mentah menegaskan pentingnya pasteurisasi pada susu sebelum dikonsumsi.

Kata-kata kunci: adhesi; *Escherichia coli*; hemagglutinin; hemolisin; susu mentah

ABSTRACT

Cow's milk is a growth medium for pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Escherichia coli* is one of the bacteria that is often found in raw cow's milk. Pathogenic *E. coli* in cattle can cause mastitis or inflammation of the intestine and can cause health problems in people such as diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic uraemic syndrome. Hemagglutinin and hemolysin are important virulent factors in pathogenic *E. coli*, because they act as adhesin factors, as toxin and defense factors against phagocytosis. The purpose of this study was to detect hemagglutinin and hemolysin *E. coli* isolates from raw cow's milk as well as the ability of adhesion to epithelial cells and defense against neutrophil phagocytes. The results of this study showed that 100% of *E. coli* isolates did not have hemagglutinin and 17.2% were hemolytic *E. coli*. In the adhesion test it is able to adhere to 46.87 bacterial buccal epithelial cells / human buccal epithelial cells. In the phagocytic test, hemolytic isolates were less phagocytes by neutrophils than non-hemolytic isolates (2.64 versus 3.1 bacteria) per neutrophil ($P < 0.05$). The discovery of pathogenic *E. coli* in raw milk confirms the importance of pasteurizing milk before consumption.

Keywords: adhesion; *Escherichia coli*; hemagglutinin; hemolysin; raw milk

PENDAHULUAN

Susu mentah atau susu yang belum dipasteurisasi merupakan media yang baik untuk pertumbuhan bakteri patogen maupun non patogen, di antaranya *Escherichia coli* (Dell'Orco *et al.*, 2019; Younis *et al.*, 2018; Vanitha *et al.*, 2018). *Escherichia coli* salah satu bakteri yang sering ditemukan dalam susu sapi mentah (Massot *et al.*, 2017; Dell'Orco *et al.*, 2019), baik *E. coli* strain patogen maupun strain non patogen (Abunna *et al.*, 2019; Sancak *et al.*, 2015).

Escherichia coli dalam susu sapi mentah berasal dari dalam ambung (Bali *et al.*, 2013; Msolo *et al.*, 2016), dan dari kontaminasi saat pemerahan serta setelah proses pemerahan, di antaranya berasal dari peralatan yang digunakan pada proses pemerahan, penyimpanan dan penampung susu saat transportasi (Bali *et al.*, 2013). Sumber kontaminasi *E. coli* dalam susu di antaranya berasal dari tubuh sapi, rambut sapi, air, pakan, tinja, pupuk kandang, dan tanah lingkungan peternakan (Msolo *et al.*, 2016; Vanitha *et al.*, 2018).

Escherichia coli memiliki banyak faktor virulensi yang berpotensi sebagai peyebab penyakit infeksius bagi ternak lain maupun manusia (Schroeder *et al.*, 2004), dan faktor virulensi yang dimiliki *E. coli* sangat bervariasi dari satu isolat ke isolat lainnya (Roussel *et al.*, 2017).

Escherichia coli dilaporkan sebagai penyebab penyakit pada sapi (Hogan *et al.*, 1990), ayam *broiler* (Ruana *et al.*, 2014), unggas, babi dan manusia (Pandey *et al.*, 2016). Pada manusia menyebabkan *Hemolytic Uremic Syndrome* (sindrom infeksi saluran kencing berdarah) (Pullanhi *et al.*, 2019; Kaira dan Pai, 2018; Divakara *et al.*, 2017).

Hemaglutinin dan hemolisin merupakan faktor virulensi yang penting pada *E. coli* patogen (Biswas *et al.*, 2018; Ranjan *et al.*, 2010). Hemaglutinin dan hemolisin merupakan faktor virulen yang sering dideteksi pada isolat *E. coli* (Divakara *et al.*, 2017). Hemaglutinin merupakan protein permukaan yang berperan pada proses koloni dan *adhesi* pada eritrosit yang menyebabkan aglutinasi eritrosit (Huja *et al.*, 2015), serta memperparah penyakit (Edwards *et al.*, 2000). Hemolisin merupakan racun yang diproduksi *E. coli*, berperan sebagai faktor virulen (Johnson, 1991), dan merupakan satu-satunya protein yang mampu melisiskan

eritrosit (Herlax *et al.*, 2010; Naveen dan Mathai 2005). Hemaglutinin dan hemolisin pada *E. coli* merupakan faktor virulensi penting pada proses awal infeksi dan kemudian untuk kerusakan jaringan (Divakara *et al.*, 2017)

Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mendeteksi keberadaan hemaglutinin dan hemolisin pada *E. coli* isolat asal susu sapi serta uji kemampuan adhesi pada sel epitel dan kemampuan pertahanan bakteri dari sel neutrofil secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Isolat *E. coli*

Digunakan 29 isolat *E. coli* yang berasal dari susu sapi yang belum dipasteurisasi. Isolat-isolat tersebut telah diidentifikasi sebagai *E. coli* oleh Purnomo *et al.* (2010).

Deteksi Hemaglutinin

Deteksi hemaglutinin pada *E. coli* berdasarkan terbentuknya hemaglutinasi pada dasar tabung karena terbentuknya ikatan antara reseptor eritrosit dengan hemaglutinin yang dimiliki *E. coli*. Deteksi hemaglutinin dikerjakan seperti metode Wibawan *et al.* (1993). Pada penelitian ini digunakan eritrosit manusia dan kelinci. Eritrosit manusia berasal dari darah peneliti sendiri yang diambil dari vena brachialis atas bantuan tenaga medis. Darah dikoleksi dengan antikoagulan Sodium Sitrat (0,2 M. pH 5,2). Darah disentrifus dan dicuci dua kali dengan 0,15 M NaCl, kemudian dibuat larutan 2% dengan NaCl. Uji hemaglutinasi dilakukan dengan cara mereaksikan 20 mL larutan bakteri yang *optical density* (OD) telah ditentukan dengan spektrofotometer transmisi dan lambda/ l 620 nm (kira-kira 10⁹ bakteri/mL 0,15 NaCl) dicampur dengan 20 mL larutan eritrosit dalam tabung reaksi. Tabung reaksi digoyang-goyangkan selama 30 detik.

Deteksi Hemolisin

Deteksi hemolisin pada *E. coli* dikerjakan seperti metode yang dilakukan Vaish *et al.* (2016) dan Pullanhi *et al.* (2019). Media agar darah digunakan 5% darah domba. Sebanyak Satu ose biakan *E. coli* ditanamkan pada media agar darah, dieramkan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hemolisin terdeteksi dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri.

Uji Adhesi pada Sel Epitel

Uji *adhesi* secara *in vitro* pada sel epitel dikerjakan seperti metode Salasia, (1994), dengan menggunakan sel epitel bukalis manusia. Preparasi sel epitel bukalis dilakukan dengan mengerok mukosa bukalis manusia dari peneliti sendiri dengan menggunakan *spatel* kayu, kerokan dilarutkan dalam 5 mL *Hank's balanced salt solution* (HBSS). Setelah dicuci dua kali dengan larutan PBS, sel-sel epitel bukalis dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* (AO, USA) sehingga diperoleh larutan bakteri kira-kira 10^5 sel/mL HBSS. Larutan bakteri kemudian diencerkan menjadi 1:10 dalam HBSS (10^8 bakteri/mL).

Pembuatan preparat uji *adhesi* bakteri pada sel epitel manusia, isolat *E. coli* ditanam dalam media cair *Tot Hewith Broth* (THB) dalam tabung reaksi, dieramkan pada suhu 37°C selama 18-24 jam, kemudian disentrifus 10.000 rpm selama 10 menit. Pelet disuspensi dengan HBSS dan *optical density* (OD) ditentukan dengan spektrofotometer pada $\lambda 620$ nm (kira-kira 37°C berjumlah 10^9 bakteri/mL).

Proses *adhesi* dilakukan dengan menyampurkannya 1 mL suspensi bakteri dengan 1 mL larutan sel-sel epitel bukalis manusia (10^5 sel/mL) dalam tabung dan diinkubasikan selama satu jam pada temperatur 37°C dalam penangas *air/water bath*.

Sel-sel epitel bukalis dipisahkan dari bakteri yang tidak melekat dengan cara sentrifugasi dengan menggunakan 50% larutan *percoll*. Lapisan bakteri dan sel epitel bukalis diambil dengan menggunakan pipet pasteur dan dicuci dua kali dengan larutan HBSS. Larutan bakteri dan sel epitel bukalis diteteskan pada objek gelas dan dikeringkan, kemudian dilakukan pewarnaan dengan Giemsa selama 30 menit. Pemeriksaan dan perhitungan jumlah bakteri yang melekat pada sel epitel bukalis dilakukan dengan mikroskop cahaya. Perhitungan dilakukan dengan cara menghitung jumlah bakteri yang melekat pada tiap 10 sel epitel bukalis

Uji Fagositosis Netrofil

Sel netrofil dikoleksi dari darah kelinci. Darah kelinci diambil dari pembuluh darah telinga/vena auricula sebanyak 5 mL dengan menggunakan spuit *disposable syringe* 5 mL, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi 1 mg/mL ethylenediamine tetraacetic acid/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, diperoleh enam 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*, disentrifus 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 mL dimasukkan ke dalam *ependorf* yang telah berisi 100 mL larutan bakteri (10^8 bakteri/mL), dicampur dan diinkubasi pada penangas *air/waterbath* dengan suhu 37°C selama satu jam. Setelah inkubasi larutan ditambah 800 mL HBSS dingin, disentrifuse 1000x selama tujuh menit. Supernatan dibuang dan endapan ditambah 200 mL larutan *Acrydine urenge* (20 mg/mL, Sigma) dan 800 mL HBSS dingin, dibiarkan selama 45 menit. Aktivitas fagositosis sel PMN/netrofil ditentukan dengan menghitung jumlah bakteri yang difagosit oleh setiap sel netrofil dari 20 sel neutrofil pada setiap preparat apus menggunakan mikroskop *fluorescence* (Olympus, USA). Sel-sel bakteri yang mati berwarna merah dan sel yang masih hidup (*intracellular survive*) berpendar warna hijau (Salasia, 1994). Data yang diperoleh dianalisis secara diskripsi, rerata jumlah bakteri yang difagosit dibedakan dengan uji-t

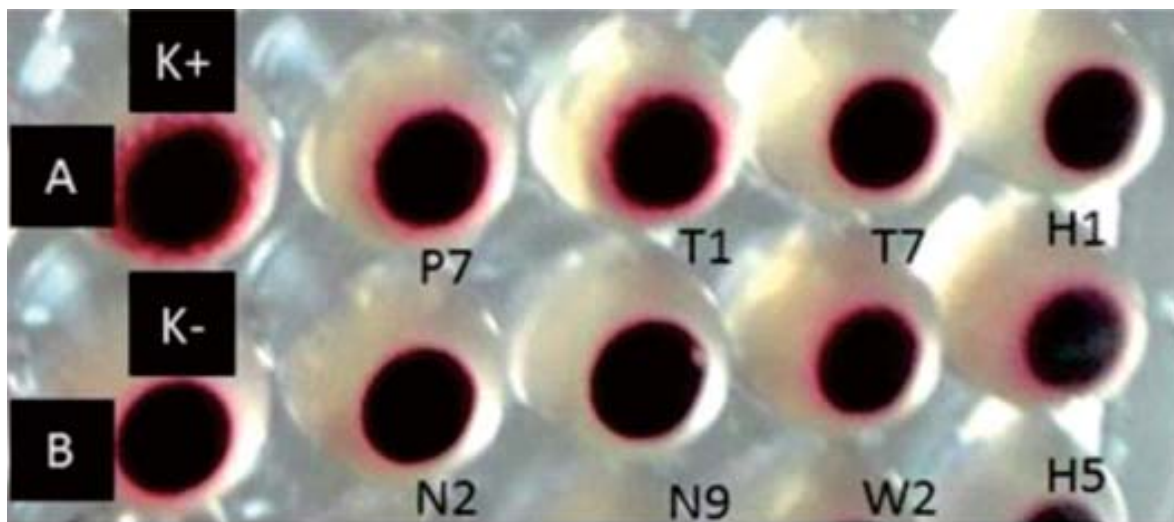
HASIL DAN PEMBAHASAN

Susu sapi merupakan media sempurna untuk pertumbuhan dan perpindahan berbagai bakteri termasuk *E. coli*. Hasil penelitian ini semua isolat *E. coli* tidak memiliki hemaglutinin. Pada uji hemaglutinasi semua isolat tidak menggumpalkan eritrosit manusia maupun kelinci (Tabel 1, Gambar 1). Pada deteksi hemolisin 17,2% (5 dari 29) isolat memiliki hemolisin. Isolat-isolat yang memiliki hemolisin pada media agar darah melisiskan eritrosit dengan membentuk zona bening di sekitar koloni (Gambar 2).

Escherichia coli memiliki banyak faktor virulensi yang berkontribusi terhadap patogenisitas (Biswas *et al.*, 2006), di antaranya

Tabel 1. Hasil deteksi hemolisin dan hemaglutinin pada *Escherichia coli* isolat susu Sapi mentah

Kode sampel (n)	Karakterisasi					
	Hemolisin		Hemaglutinasi dengan eritrosit			
	+	-	Kelinci		Manusia	
+			-	+	-	
3; 4; 12; 45; D7. D13; P1; P4; P7; H1; H5; H8; H10; N2; N9; N27 T1; T2; T4; W2; W7; WJL2; A01932; A01936; 233SS; 276SS; 279SS Didin2; Didin3	5	24	0	29	0	29
%	17,2	82,8	0	100	0	100



Gambar 1. Uji hemaglutinasi dengan menggunakan darah manusia. Isolat-isolat P7, T1, T7, H1, N2, N9 W2 dan H5 tidak menggumpalkan eritrosit manusia. A (kontrol +) dan B (kontrol -)

faktor-faktor yang berperan pada proses kolonisasi, *adhesi*, pertahanan terhadap imunitas inang dan produktivitas toksin (Sarowska *et al.*, 2019), faktor virulensi potensial pada *E. coli* adalah struktur atau komponen tertentu bakteri, seperti fimbriae, hemolisin, aerobaktin, resistansi terhadap serum dan kemampuan *adhesi* terhadap sel inang dan antigen spesifik lainnya (Terlizzi *et al.*, 2017). Menurut Sayed (2014) *E. coli* patogen biasanya memiliki banyak faktor virulensi yang

berperan pada proses koloni, *adhesi* dan proses infeksi serta sampai timbulnya gejala penyakit.

Hemaglutinin dan hemolisin merupakan faktor virulensi yang penting pada *E. coli* sebagai penanda strain patogen (Rajkumar *et al.*, 2016). Deteksi keberadaan hemaglutinin pada *E. coli* secara fenotip biasa menggunakan uji hemaglutinasi dengan menggunakan eritrosit (Maheswari *et al.*, 2013; Huja *et al.*, 2015). Isolat *E. coli* yang memiliki hemaglutinin mempunyai kemampuan menggumpalkan

eritrosit (Raksha *et al.*, 2003). Hemaglutinasi terjadi karena terbentuknya ikatan hemaglutinin yang dimiliki *E. coli* dengan reseptor eritrosit (Shetty *et al.*, 2014).

Beberapa jenis eritrosit telah digunakan dalam uji hemaglutinasi pada *E. coli*. Sanchez-Carlo *et al.* (1984) menggunakan eritrosit asal kelinci, domba dan babi. Rajkumar *et al.* (2016) menggunakan eritrosit asal manusia, kelinci, unggas, tikus dan domba. Kaira dan Pai (2018) menggunakan eritrosit manusia. Qadri *et al.* (1994) menggunakan eritrosit kelinci dan Hogan

et al. (1990) menggunakan eritrosit sapi dan marmut.

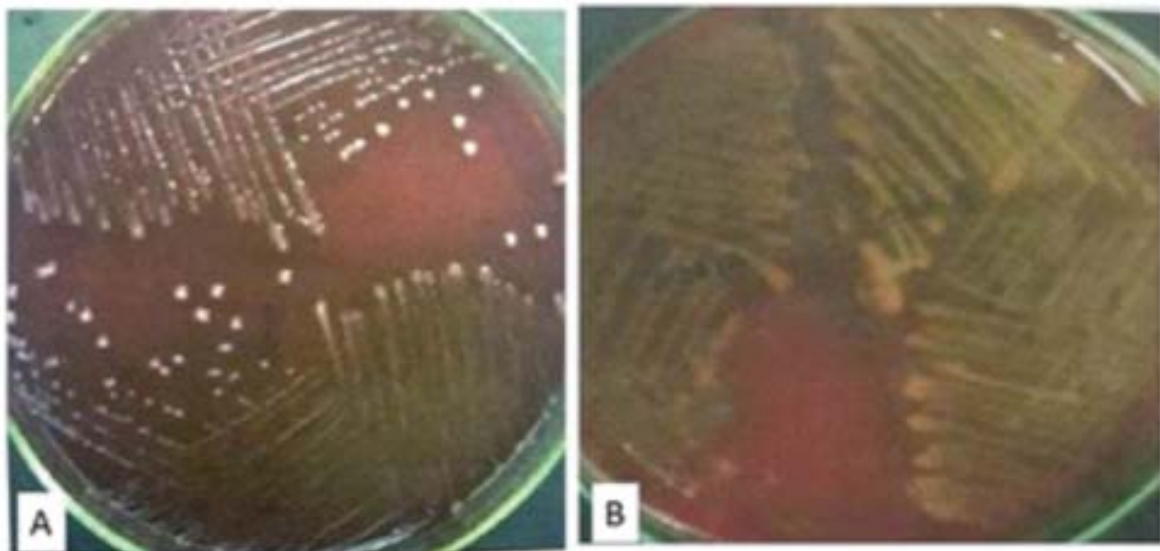
Pada penelitian ini uji hemaglutinasi menggunakan eritrosit manusia dan kelinci. Semua isolat *E. coli* yang diteliti tidak terjadi hemaglutinasi, baik dengan eritrosit manusia maupun dengan eritrosit kelinci (Gambar 1). Hasil penelitian ini mirip seperti hasil penelitian Sanchez-Carlo *et al.* (1984), *Escherichia coli* isolat asal susu sapi yang menderita mastitis tidak memiliki hemaglutinin.

Hasil penelitian lain menunjukkan 3,7% *E. coli* isolat asal ayam *broiler* memiliki hemaglutinin (Ruata *et al.*, 2014). *Escherichia coli* asal kasus urin berdarah manusia memiliki hemaglutinin sebanyak 30%, 53%, 30,9%, 45,5% dan 61% (Benton *et al.*, 1992; Kaira dan Pai, 2018; Raksha *et al.*, 2003; Mittal *et al.*, 2014; Divakara *et al.*, 2017).

Terbentuknya hemaglutinasi antara *E. coli* dengan eritrosit karena terjadinya ikatan antara hemaglutinin sebagai reseptor pada permukaan bakteri dengan reseptor permukaan eritrosit. Menurut Qadri *et al.* (1994) dan Alam *et al.* (1997) hemaglutinasi tidak akan terjadi karena perbedaan reseptor pada permukaan bakteri dengan eritrosit. Shareef *et al.* (2010) membuktikan adanya perbedaan reseptor pada permukaan eritrosit manusia, domba maupun ayam. Hogan *et al.* (1990) melaporkan adanya perbedaan hasil uji hemaglutinasi dengan menggunakan eritrosit sapi dengan marmut. Hasil yang berbeda dengan menggunakan

Tabel 2. Rerata jumlah *Escherichia coli* yang melekat pada tisp sel epitel

Kode isolat	Isolat hemaglutinin	Rerata jumlah bakteri menempel/ sel spitel
12	-	53,7
14	-	40,4
H1	-	25,5
H5	-	27,8
P1	-	24,1
279SS	-	54,0
W2	-	62,2
P7	-	54,2
D13	-	54,0
H10	-	72,8
Rerata		46,87



Gambar 2. Deteksi hemolisin isolat *Escherichia coli* pada media agar darah.
 A. Isolat non hemolitik, tidak membentuk zona lisis di sekeliling koloni
 B. Isolat hemolitik, membentuk zona lisis di sekeliling koloni

eritrosit sapi, babi, manusia dan ayam (Pandey *et al.*, 2016)

Hemagglutinin merupakan faktor virulensi pada *E. coli* yang berperan sebagai faktor *adhesin*, kolonisasi dipermukaan sel epitel dan pelekatan bakteri pada permukaan sel epitel inang (Chanter *et al.*, 1993). *Adhesi* bakteri dipermukaan sel epitel inang merupakan langkah awal dari proses infeksi (Mulvey, 2002), baik bakteri patogen maupun non patogen (Haiko dan Westerlund-Wikström, 2013).

Menurut Klemm *et al.* (2010) *adhesin* pada *E. coli* berupa berbagai struktur permukaan sel seperti kapsul, fimbriae atau pili, dan beberapa protein permukaan. Hemagglutinin pada *E. coli* patogen berupa fimbria (Thakur *et al.*, 2012). Fimbria merupakan virulensi yang penting pada *E. coli* dan sering ditemukan pada banyak strain *E. coli* patogen (Anderson *et al.*, 2003) yang berfungsi sebagai *adhesin* dan invasi sel epitel (Johnson, 1991). Peran fimbria sebagai faktor virulensi pada *E. coli* hilang seiring hilangnya fimbria (Croxen *et al.*, 2013).

Lindberg *et al.* (2008) menyatakan bahwa *E. coli* yang tidak memiliki hemagglutinin masih memiliki kemampuan untuk melekat pada sel epitel. Menurut Krogfelt *et al.* (1990) kemampuan *adhesi* juga dipengaruhi adanya beberapa gen-gen *adhesin*. Hasil penelitian Abrar (2009) mengemukakan bahwa *E. coli* yang tidak memiliki hemagglutinin memiliki kemampuan melekat pada sel epitel dengan kemampuan yang lebih rendah dibandingkan dengan isolat yang memiliki hemagglutinin.

Hasil penelitian semua isolat mampu melekat pada sel epitel bukalis meskipun tidak memiliki hemagglutinin dengan rerata 46,87 bakteri/sel epitel bukalis (Tabel 2, Gambar 3). Hal ini mungkin karena adanya faktor *adhesin* lain seperti adanya gen-gen *adhesin*. Fernandes *et al.* (2011) melaporkan patogenisitas isolat *E. coli* tidak hanya ditentukan oleh faktor virulensi tunggal saja, tetapi juga ditentukan oleh beberapa faktor *adhesin* lain. Menurut Frommel *et al.* (2013) *E. coli* membawa berbagai gen virulensi yang berhubungan dengan kolonisasi dan *adhesi*. Secara genotip banyak gen-gen pada *E. coli* yang berperan dalam proses *adhesi* (Yun *et al.*, 2014; Kargan dan Homayoon, 2015).

Hemolisin merupakan salah satu faktor virulensi yang penting pada *E. coli* (Fatima *et al.*, 2012). Hasil penelitian ini 17,2% merupakan isolat yang memiliki hemolisin. Isolat-isolat tersebut pada media agar darah melisis eritrosit dan terbentuk zona terang di sekitar

koloni (Gambar 2). *Escherichia coli* hemolitik pada media agar darah dapat melisis eritrosit, sehingga terbentuk zona terang di sekeliling koloni bakteri (Raksha *et al.*, 2003; Shobrak dan Abo-Amer, 2014).

Hasil penelitian ini mirip dengan laporan Aljanaby dan Alfaham (2017) yang mengemukakan bahwa *E. coli* isolat asal urin berdarah dan diare pada manusia 18% merupakan isolat hemolitik. Prevalensi *E. coli* hemolitik asal susu dilaporkan bervariasi, hasil penelitian yang lebih kecil dilaporkan 12,7% dan 5,6% (Lamey *et al.*, 2013 dan Sayed, 2014). Serta prevalensi yang lebih besar dilaporkan 21,4%; dan 52,94% (Seyda *et al.*, 2014 dan Younis *et al.*, 2018). Prevalensi *E. coli* hemolitik dari susu sapi dan unta masing-masing adalah 25% dan 32% (Nato *et al.*, 2019). Prevalensi *E. coli* hemolitik isolat asal tinja sapi sebesar 81,25% (El-Said *et al.*, 2005) dan isolat tinja domba sebesar 50% (Aksoy *et al.*, 2007).

Prevalensi *E. coli* hemolitik isolat asal infeksi saluran kencing pada manusia dilaporkan 25% (Vijyalakshmi *et al.*, 2015), 27% (Divakara *et al.*, 2017; Kaira dan Pai, 2017), 33% (Nachammai *et al.*, 2016), 34% (Tabasi *et al.*, 2015); 41% (Raksha *et al.*, 2003), 45,5% (Mandal *et al.*, 2001), dan 47% (Mittal *et al.*, 2014). Prevalensi *E. coli* hemolitik isolat kasus ekstraintestinal pada manusia sebesar 9% (Vaish *et al.*, 2016) dan 21% (Kausar *et al.*, 2009).

Hemolisin adalah salah satu faktor virulensi yang paling penting pada *E. coli* strain patogen (May *et al.*, 2000). Hemolisin berperan meningkatkan patogenisitas bakteri (Rizvi *et al.*, 2013), serta meningkatkan tingkat keparahan penyakit (Tabasi *et al.*, 2015; Kaira dan Pai, 2018). Isolat-isolat hemolitik mampu melisis eritrosit dan merusak sel inang berinti maupun sel-sel imun efektor (Johnson, 1991), dan mampu merusak jaringan (Kaira dan Pai, 2018), sehingga terjadi peradangan (Ristow dan Welch, 2016; Johnson, 1991), memiliki kemampuan merusak sel efektor inang sehingga mendapatkan nutrisi dari inang, dan dapat menyebabkan apoptosis sel inang (Johnson, 1991).

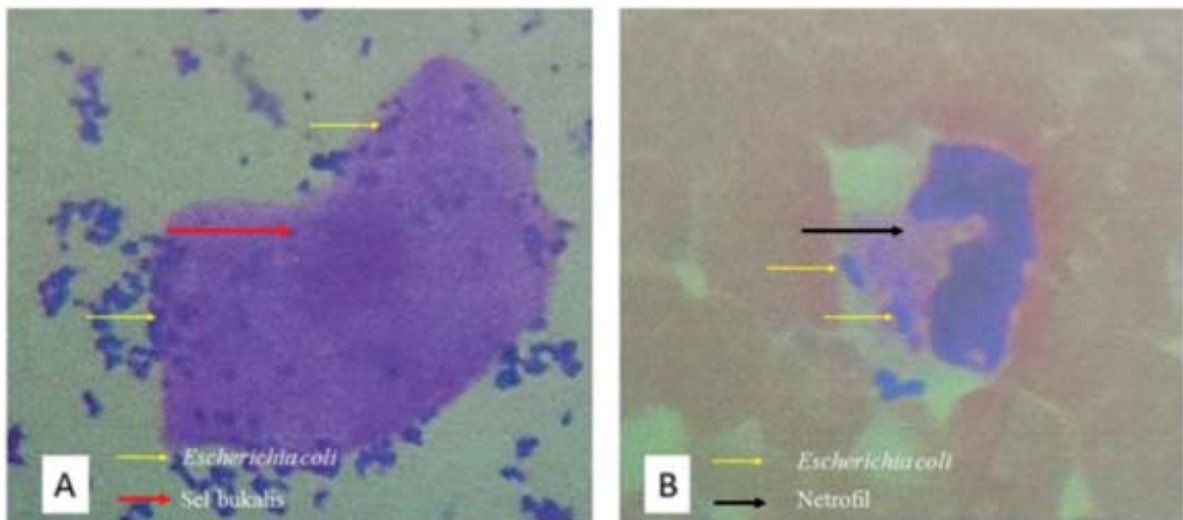
Escherichia coli hemolitik menurut Laura *et al.* (2016) merupakan strain patogen yang tahan terhadap antibodi dan sel-sel fagosit, serta mampu bertahan hidup dalam aliran darah (Welch *et al.*, 1995). Bakteri *E. coli* juga mampu menghindari terhadap sel-sel fagosit (Fatima *et al.*, 2012), dan tahan terhadap bakterisidal (Allan *et al.*, 1993),

Tabel 3. Rerata jumlah *Escherichia coli* yang difagosit oleh neutrofil kelinci

Kode isolat	Isolat hemolitik	Rerata jumlah bakteri difagosit/sel neutrofil
12	-	2,0
14	-	4,4
H1	-	2,5
H5	-	3,6
P1	-	2,8
279SS	-	3,3
Rerata		3,1
W2	+	2,6
P7	+	4,2
D13	+	2,1
H10	+	1,7
Rerata		2,64

neutrofil, dibandingkan dengan isolat non hemolitik (Gadeberg *et al.*, 1989), sehingga bakteri hemolitik mampu bertahan hidup dan memperbanyak diri untuk melanjutkan proses infeksi, sampai menimbulkan gejala sakit (Nazareth *et al.*, 2007).

Semua faktor virulensi baik faktor fenotip maupun genotip pada *E. coli* strain patogen secara bersama-sama maupun sendiri-sendiri dapat menyebabkan terjadinya proses infeksi yang dimulai dari kolonisasi, *adhesi*, infeksi dan timbulnya gejala penyakit dengan tingkat patogenisitas yang berbeda (Nachammai *et al.*, 2016). Patogenisitas bakteri menurut Sharma *et al.* (2007) merupakan multifaktorial dari peran berbagai macam faktor virulensi, baik faktor virulensi fenotip maupun genotip, dan semua faktor virulensi ini memberi kontribusi secara sinergis untuk mekanisme berbagai proses dari kolonisasi, *adhesi*, proses infeksi dan mekanisme pertahanan dari sel-sel pertahanan inang serta sampai timbulnya penyakit dengan



Gambar 3. A. Uji *adhesi* isolat *Escherichia coli* pada sel epitel bukalis manusia, B. Uji fagositosis isolat *E. coli* oleh sel neutrofil.

Pada penelitian ini jumlah isolat hemolitik lebih sedikit difagosit neutrofil dibandingkan dengan isolat non hemolitik, dengan rerata 2,6 dibanding 3,1 bakteri tiap neutrofil ($P < 0,05$) (Tabel 3, Gambar 3). Isolat *E. coli* hemolitik mampu meningkatkan ketahanan hidup dalam aliran darah, mampu menghindari dari sel-sel fagosit dan mengurangi aktivitas fagositosis neutrofil maupun antibodi inang (Kaira dan Pai, 2018; Elazar *et al.*, 2010), ditandai dengan sedikitnya isolat hemolitik yang difagosit

tingkat gejala keparahan yang berbeda. Menurut Divakara *et al.* (2017) patogenisitas *E. coli* umumnya merupakan ekspresi kombinasi dari banyak faktor virulensi yang dimiliki.

Susu mentah dan produk susu olahan merupakan sumber utama penyebaran *E. coli* ke manusia (Momtaz *et al.*, 2013; Dehkordi *et al.*, 2014). Susu sapi mentah umumnya mengandung *E. coli* patogen dan non patogen (Hassanshahian dan Shahi, 2014; Ahmed dan Shimamoto, 2014; Younis *et al.*, 2018). maka

perlu pengawasan dalam produksi susu, penanganan setelah pemerahan maupun pengolahannya (Virpari *et al.*, 2013). *Escherichia coli* patogen dalam susu sapi merupakan isolat yang perlu diwaspadai untuk kepentingan kesehatan masyarakat (Farrokh *et al.*, 2013), sehingga mengonsumsi susu sapi mentah berisiko bagi kesehatan (Demme dan Abega, 2015).

Escherichia coli patogen dalam susu mentah berpotensi menyebabkan penyakit bagi yang mengkonsumsi (Ahmed *et al.*, 2018; Kundu *et al.*, 2019), di samping risiko terjadinya infeksi dan keracunan makanan (Elmonir *et al.*, 2018). Allerberger *et al.* (2001) melaporkan terjadinya infeksi *Hemolytic Uremic Syndrome* pada anak-anak setelah minum susu sapi yang tidak dipasteurisasi. Pasteurisasi susu sapi sebelum dikonsumsi merupakan langkah penting untuk mengurangi penyebaran *E. coli* patogen ke orang (Ranjbar *et al.*, 2018)

SIMPULAN

Escherichia coli asal susu sapi mentah tidak memiliki hemagglutinin dan 17,2% merupakan isolat hemolitik, memiliki kemampuan melekat pada sel epitel serta mampu menghindari fagositosis netrofil. Isolat-isolat tersebut merupakan isolat patogen yang dapat menyebar dan menyebabkan infeksi kolibasilosis pada ternak lain dan manusia melalui susu sapi mentah yang dikonsumsi. Pasteurisasi atau pemanasan susu sapi perlu dilakukan untuk menghindari risiko penyebaran kuman patogen pada manusia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Data penelitian ini merupakan sebagian hasil penelitian Hibah Pekerti Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, Nomor: 0868.0/023-04.1/-/2009, tanggal 31 Desember 2008. Kepada semua pihak yang telah membantu diucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Abunna F, Tasew N, Ragassa F, Ayana D, Amenu K. 2019. Handling practices, quality and safety of milk along the dairy value chains in selected sub cities of Addis Ababa, Ethiopia. *Biomed J Sci & Tech Res* 13(1): 9652-9665
- Abrar M. 2009. Role of *Escherichia coli* haemagglutinin in adhesion process. *J Ked Hewan* 3(1): 194-198.
- Agarwal J, Srivastava S, Singh M. 2012. Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian J of Med Microbiol* 30(2): 141-144.
- Ahmed A, Shimamoto T. 2014. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella spp.* from meat and dairy products in Egypt. *Int J Food Microbiol* 168(169): 57-62.
- Ahmed HF, Straubinger RK, Hegazy YM, Ibrahim S. 2018. Subclinical mastitis in dairy cattle and buffaloes among small holders in Egypt: Prevalence and evidence of virulence of *Escherichia coli* causative agent. *Trop Biomed* 35(2): 321-329.
- Aksoy A, Yildirim M, Kacmaz B, Apan TZ, Goçmen JS. 2007. Verotoxin Production in Strains of *Escherichia coli* Isolated from Cattle and Sheep, and their Resistance to Antibiotics. *Turk J Vet Anim Sci* 31(4): 225-231.
- Alam M, Shin-Ichi M, Ken-Ichi T, Sumio S. 1997. hemagglutination is a novel biological function of lipopolysaccharide (LPS), as seen with the *Vibrio cholerae* O139 LPS. *Clin and Diagn Lab Immunol* 4(5): 604-606.
- Aljanaby AAJ, Alfaham QMH. 2017. Phenotypic and Molecular characterization of some virulence factors in multidrug resistance *Escherichia coli* isolated from different clinical infections in Iraq. *Am J of Biochem and Mol Biolog* 7: 65-78.
- Allerberger F, Wagner M, Schweiger P, Rammer HP, Resch A, Dierich MP, Friedrich AW, Karch H. 2001. *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. *Europ Comm Dis Bull* 6(10): 147-151.
- Anderson GG, Palermo J, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren CJ. 2003. Intracellular Bacterial Biofilm-Like Pods in Urinary Tract Infections. *Science* 301: 105-107.
- Bali OS, Lajnef R, Felfoul I, Attia H, Ayadi MA. 2013. Detection of *Escherichia coli* in

- unpasteurized raw milk. *Int J of Agriculture and Food Sci* 3(2): 53-55.
- Benton J, Chawla J, Parry S, Stickler, D. 1992. Virulence factors in *Escherichia coli* from urinary tract infections in patients with spinal injuries. *J of Hospital Infect* 22(2): 117-120.
- Biswas D, Gupta P, Prasad R, Singh V, Arya M, Kumar A. 2006. Choice of antibiotics for empirical therapy of acute cystitis in a setting of high antimicrobial resistance. *Indian J Med Sci* 60(2): 53-58.
- Chanter N, Jones PW, Alexander TJL. 1993. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis* - a speculative review. *Vet Microbiol* 36: 39-55.
- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska BM, Finlay BB. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 26: 822-880.
- Dehkordi FS, Yazdani F, Mozafari J, Valizadeh Y. 2014. Virulence factors, serogroups and antimicrobial resistance properties of *Escherichia coli* strains in fermented dairy products. *BMC Res Notes* 10.1186/1756-0500-7-217
- Dell'Orco F, Gusmara C, Loiacono M, Gugliotta T, Albonico F, Mortarino M, Zeccon A. 2019. Evaluation of virulence factors profiles and antimicrobials resistance of *Escherichia coli* isolated from bulk tank milk and raw milk filters. *Res in Vet Sci* 123: 77-83.
- Demme B, Abega S. 2015. Isolation and identification of major bacterial pathogen from clinical mastitis cow raw milk in Addis Ababa. *Ethiopia Academic J of Anim Dis* 4(1): 44-51.
- Divakara SV, Kulal B, Meundi M. 2017. A comparative study of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections with that of intestinal *Escherichia coli* isolated from apparently healthy adults. *Int J Curr Microbiol App Sci* 6(9): 2530-2536.
- Elazar S, Gonen E, Livneh-Kol A, Rosenshine I, Shpigel NY. 2010. Essential role of neutrophils but not mammary alveolar macrophages in a murine model of acute *Escherichia coli* mastitis. *Vet Res* 41(4): 53-58.
- Elmonir W, Etab M, Abo EM, Remela EM, Sobeih A. 2018. Public health risks of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk sold in informal markets in Egypt. *J Infect Dev Ctries* 12(7): 533-541.
- EL-Said WA, El-Jakee JK, Xandel MM, Elshabrawy MA. 2005. Presence of *E. coli* O157:H7 in Raw milk and meat samples. *J Egypt Vet Med Ass* 65(3): 341- 350.
- Farokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Ray S, Thevenot D, Condron R, DeReu K, Govaris A, Heggum K, Heyndrickx M, Hummerjohann J, Lindsay D, Miszczycha S, Moussiégt S, Verstraete K, Cer O. 2013. Review of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their Significance in dairy production. *Int J Food Microbiol* 162: 190-212.
- Fatima N, Agrawal M, Shukla I, Khan PA, 2012. Characterization of uropathogenic *E. coli* in relation to virulence factors. *Open Access Scientific Reports*. 1(7): 1-4.
- Fernandes JB, Zanardo LG, Galvao NN, Carvalho IA, Nero LA, Moreira MA. 2011. *Escherichia coli* from clinical mastitis: serotypes and virulence factors. *J Vet Diagn Invest* 23: 1146-1152.
- Frommel U, Lehmann W, Rodiger S, Bohm A, Nitschke J, Weinreich J, Groß J, Roggenbuck D, Zinke O, Ansorge H, Vogel S, Klemm P, Wex T, Schröder C, Wieler LH, Schieracka P. 2013. Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic. *Origins Appl and Environmental Microbiol* 79(19): 5814-5829.
- Gadeberg OV, Hacker J, Orskov I. 1989. Role of á-hemolysin for the in vitro phagocytosis and intracellular killing of *Escherichia coli*. *Zentralblatt Für Bakteriologie* 271(2): 205-213.
- Haiko J, Westerlund-Wikstrom B. 2013. The Role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology* 2(4): 1242-1267.
- Hassanshahian M, Shahi Z. 2014. Survey frequency of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in raw milk at Kerman city Int. *J of Adv Biol and Biomed. Res* 2(1): 117-124.

- Herlax V, Henning MF, Bernasconi AM, Goni FM, Bakas L. 2010. Health The lytic mechanism of *Escherichia coli* α -hemolysin associated to outer membrane vesicles Lytic action mechanism of OMVs-associated HlyA. *Natural Sci* 2: 484-492
- Hickey AM, Bhaskar U, Linhardt RJ, Dordick JS. 2013. Effect of eliminase gene (elmA) deletion on heparosan production and shedding in *Escherichia coli* K5. *J Biotechnol* 165: 175-177.
- Hogan JS, Todhunter DA, Smith KL, Schoenberger PS, 1990. Hemagglutination and hemolysis by *Escherichia coli* isolated from bovine intramammary infections. *Daily Sci* 73: 3126-3131.
- Huja S, Oren Y, Biran D, Meyer S, Dobrindt U, Bernhard J, Becher D, Hecker M, Sorek R, Ron EZ. 2014. Fur is the master regulator of the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* response to serum. *MBio* 5: 1-12.
- Johnson JR. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection, *Clin Microbiol Reviews* 4(1): 80-128.
- Kaira SS, Pai C. 2018. Study of Uropathogenic *Escherichia coli* with special reference to its virulence factors. *Int J Community Med Public Health* 5(1): 177-181.
- Kargan M, Homayoon M. 2015. Prevalence of shiga toxins (stx1, stx2), eaeA and hly genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains among children with acute gastroenteritis in southern of Iran. *Asian Pac J Trop Med* 46: 24-29.
- Kausar Y, Chunchanur SK, Nadagir SD, Halesh LH. 2009. Chandrasekhar MR: Virulence factors, serotypes and antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Al Ameen J Med Sci* 2: 47-51.
- Klemm P, Vejborg RM, Hancock V. 2010. Prevention of bacterial adhesion. *Appl Microbiol Biotechnol* 88: 451-459.
- Krogfelt KA, Bergmans H, Klemm P. 1990. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect Immun* 58(6): 1995-1998.
- Kundu D, Paul T, Barkalita LM, Borah P. 2019. Virulence gene profile of *Escherichia coli* isolated from raw milk and market meat in Guwahati city of Assam. *ACTA Scientific Microbiol* 2(4): 44-49.
- Lamey AE, Ammar AM, Zaki ERA, Khairy N, Moshref BS, Refai MK. 2013. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from recurrent cases of clinical and subclinical mastitis in Buffaloes. *Int J of Microbiol Res* 4(1): 86-94.
- Laura G, Michelacci V, Bondi R, Gigliucci F, Franz E, Badouei MA, Schlager S, Minelli F, Tozzoli R, Caprioli A, Morabito S. 2016. Whole genome characterization and strain comparison of vt2f-producing *Escherichia coli* causing Hemolytic Uremic Syndrome. *Emerg Infect Dis* 22(12): 2078-2086.
- Lindberg S, Xia Y, Sondén B, Göransson M, Hacker J, Uhlin BE. 2008. Regulatory interactions among adhesin gene systems of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 76: 771-780.
- Maheswari UB, Palvai S, Anuradha PR, Kammili N. 2013. Hemagglutination and biofilm formation as virulence markers of uropathogenic *Escherichia coli* in acute urinary tract infections and urolithiasis. *Indian J Urol* 29(4): 277-281.
- Mandal P, Kapil A, Goswami K, Das B, Dwivedi SN. 2001. Uropathogenic *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Indian J Med Res* 114: 207-211.
- Massot M, Couffignal C, Clermont O, D'Humières C, Chatel J, Plault N, Andreumont A, Caron A, Mentre F, Denamur E. 2017. Day-today dynamics of commensal *Escherichia coli* in Zimbabwean cows evidence temporal fluctuations within a host-specific population structure. *Appl Environ Microbiol* doi.org/10.1128/AEM.00659-17.
- May AK, Gleason TG, Sawyer RG, Pruett TL. 2000. Contribution of *Escherichia coli* alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. *Infect Immun* 68: 176-183.
- Mittal S, Sharma M, Chaudhary U. 2014. Study of virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* & its antibiotics

- susceptibility pattern. *Indian J Pathol Microbiol* 57(1): 61-64.
- Momtaz H, Dehkordi FS, Rahimi E, Ezadi H, Arab R. 2013. Incidence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in ruminant's meat. *Meat Sci* 95: 381-388.
- Msolo L, Igbinsosa EO, Okoh AI. 2016. Prevalence and antibiogram profiles of *Escherichia coli* O157:H7 isolates recovered from three selected dairy farms in the Eastern Cape Province, South Africa. *Asian Pac J Trop Dis* 6(12): 990-995.
- Mulvey MA. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 4(5): 257-271.
- Nachammai SM, Jayakumar K, Sures V, Kousalya M, Anbu N, Aravazhi AN. 2016. Haemagglutination and resistance to the bactericidal activity of serum as the urovirulence markers of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Curr Microbiol App Sci* 5(9): 514-523.
- Nato SM, Joseph W, Matofari JW, Bebe BO, Huelsebusch C. 2019. Prevalence of α -haemolytic multi-drug resistant *E. coli* in cow and camel milk in Kenya. *J of Consumer Protection and Food Safety* 14: 55-61.
- Nazareth H, Genagon SA, Russo TA. 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* survives within neutrophils. *Infect Immun* 75(6): 2776-2785.
- Pandey A, Joshi N, Joshi RK, Prajapati R, Singh A. 2016. Virulence attributes and antibiotic resistance pattern of *E. coli* isolat from human and animal. *Asian J of An and Vet Adv* 11(1): 67-72.
- Purnomo A, Khusnan, Hartatik, Salasia SIO, Sugiyono. 2010. Eksplorasi *Escherichia coli* asal susu sapi perah: Isolasi, karakterisasi molekuler gen penyandi adhesin dan gen-gen penyandi virulensi verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) sebagai dasar pencegahan mastitis. Akademi Peternakan Brahmputra Yogyakarta. Laporan Penelitian Hibah Pekerti Depdiknas.
- Pullanhi U, Khan S, Vinod V, Mohan K, Kumar A. 2019. Outcome of acute urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* with phenotypically demonstrable virulence factors. *Ann of Afr Med* 18(3): 138-142.
- Qadri F, Haque A, Faruque SM, Betielheim KA, Robins-Browne R, Albertv J. 1994. Hemagglutinating properties of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J of Clin Microbiol* 32(2): 510-514. doi: 10.1128/jcm.32.2.510-514.1994.
- Rajkumar HRV, Devaki R, Kandi V. 2016. Comparison of hemagglutination and hemolytic activity of various bacterial clinical isolates against different human blood groups cureus. 8(2): e489. doi: 10.7759/cureus.489
- Raksha R, Srinivasa H, Macaden RS. 2003. Occurrence and characterization of uropathogenic *Escherichia coli* in utis. *Indian J Med Microbiol* 21(2): 102-107.
- Ranjan KP, Ranjan N, Chakraborty A, Arora DR. 2010. An approach to uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infections. *J of Lab Physicians* 2(2):70-73. doi 10.4103/0974-2727.72152
- Ranjbar R, Dehkordi FS, Shahreza MHS, Rahimi E. 2018. Prevalence, identification of virulence factors, o-serogroups and antibiotic resistance properties of shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. *Antimicrobial Res and Infect Control*, doi.Org/10.1186/S13756-018-0345-X
- Ristow LC, Welch RA. 2016. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: A cloak or a dagger? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 58(3): 538-545.
- Rizvi M, Kumar S, Khan F, Sultan A, Malik A, Tahira F. 2013. Killing of phahemolytic and non-hemolytic *Escherichia coli* strains from paediatric patients in human serum and polymorphonuclear leucocytes. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2: 636-646.
- Roussel P, Porcherie A, Reapearant-Ferter M, Cunha P, Gitton C, Rainard P, Germon P. 2017. *Escherichia coli* mastitis strains: *In vitro* phenotypes and severity of infection *in vivo*. *PloS ONE* 12(7): doi.org/10.1371/journal.pone.0178285
- Ruaa LR, AL-Saiedi, Ali AAS. 2014. Pathogenicity testing of several APEC isolates obtained from naturally infected broiler birds reared in Basrah. *Int J of Poultry Sci* 13(7): 374-378.

- Sancak YC, Sancak H, Isleyici O, Durmaz H. 2015 Presence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in raw milk and Van herby cheese. *Bull Vet Inst Pulawy* 59: 511-514.
- Salasia SIO. 1994. Untersuchungen zu mutmaßlichen Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus suis*. (Vet. Med. Diss.), Giessen. Justus-Liebig-Universität Giessen. Germany.
- Sanchez-Carlo V, McDonald JS, Packer RA. 1984. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from cows with acute mastitis. *Am J Vet Res* 45(9): 1775-1777
- Sarowska J, Futoma Koloch B, Jama Kmiecik A, Frej Madrzak M, Ksiazczyk M, Bugla Ploskonska G, Choroszy Krol I. 2019. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from diferent sources: recent reports, *Gut Pathol*, 11: 10 <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
- Sayed SM. 2014. A contribution on coliforms causing mastitis in cows with reference to serotypes and virulence factors of *E. coli* isolates. *Ass Univ Bull Environ Res* 17(1): 85-95.
- Schroeder CM, White DG, Meng J. 2004. Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial resistant *E. coli*. *Food Microbiol* 21: 249-255.
- Seyda C, Gokcen D, Unlu SM. 2014. Detection of several virulence properties, antibiotic resistance and phylogenetic relationship in *E. coli* isolates originated from cow mastitis. *ACTA Veterinaria-Beograd* 64(4): 413-425.
- Shareef HA, Abdulla ET, Mostafa ZN. 2010. Hemagglutination properties of some intestinal bacterial pathogens isolated from clinical samples Tikrit. *J of Pure Sci* 15(3): 1662-1665.
- Sharma S, Bhat GK, Shenoy S. 2007. Virulence factors and drug resistance in *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. *Indian J Med Microbiol* 25: 369-373.
- Shetty AV, Kumar SH, Shekar M, Shetty AK, Karunasagar I. 2014. Prevalence of adhesive genes among uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection in Mangalore. *Indian J Med Microbiol* 32: 175-178.
- Shobrak MY, Abo-Amer AE. 2014. Role of wild birds as carriers of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Escherichia vulneris*. *Braz J Microbiol* 45: 1199-1209.
- Silva MT. 2009. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol* 87(1): 93-106.
- Tabasi M, Karam MRA, Habibi M, Yekaninejad MS, Bouzari S. 2015. Phenotypic assays to determine virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (upec) isolates and their correlation with antibiotic resistance pattern. *Osong Public Health Res Perspect* 6(4): 261-268
- Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. 2017. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Front Microbiol* 8: 1566
- Thakur P, Chawlaa R, Narulab A, Goela R, Arorac R, Sharma RK. 2016. Anti-hemolytic, hemagglutination inhibition and bacterial membrane disruptive properties of selected herbal extracts attenuate virulence of carbapenem resistant *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis* 95: 133-141. doi: 10.1016/j.micpath.2016.04.005. Epub 2016 Apr 4.
- Vaish R, Pradeep MSS, Setty CR, Kandi V. 2019. Evaluation of virulence factors and antibiotic sensitivity pattern of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. *Cureus* 9; 8(5): e604. doi: 10.7759/cureus.604
- Vanitha HD, Sethulekshmi C, Latha C. 2018. An epidemiological investigation on occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in raw milk. *Vet World* 11(8): 1164-1170.
- Vijayalakshmi J, Hymavathi R, Devi AR, Ramanamma MV, Swarnalatha G, Surekha A, Lavanya A, Somasekhar R. 2015. Study of virulence factors in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Evol Med Dent Sci* 4(8): 1297-1305.
- Virpari PK, Nayak JB, Brahmabhatt MN, Thaker HC. 2013. Study on isolation,

- molecular detection of virulence gene and antibiotic sensitivity pattern of *Escherichia coli* isolated from milk and milk products. *Vet World* 6(8): 541-545.
- Welch AR, Holman CM, Browner MF, Gehring MR, Kan CC, van Wart HE. 1995. Purification of human matrilysin produced in *Escherichia coli* and characterization using a new optimized fluorogenic peptide substrate. *Arch. Biochem. Biophys* 324(1): 59-64.
- Wibawan IWT, Lammler C, Seleim RS, Pasaribu FH. 1993. A haemagglutinating adhesin of group B streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates adherence to HeLa cells. *J Gen Microbiol* 139: 2173-2178.
- Younis G, Awad A, Ghabour R. 2018. Prevalence and virulence determinants of *Escherichia coli* isolated from raw cow's milk. *African J of Microbiol Res* 12(9): 225-229.
- Yun KW, Kim HY, Park HK, Kim W, Lim IS. 2014. Virulence factor of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *J Microbiol Immunol Infect* 47: 455-461.