

PENGEMBANGAN VAKSIN *ESCHERICHIA COLI* ALFA HEMOLITIK VEROTOKSIGENIK: RESPON ANTIVEROTOKSIK ANTIBODI PADA HEWAN PERCOBAAN MENCIT, KELINCI DAN SAPI PERAH

SUPAR, B. POERWADIKARTA, NINA KURNIASIH, dan DJAENURI

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata No. 30, P.O. Box 151, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 28 Desember 1998)

ABSTRACT

SUPAR, B. POERWADIKARTA, NINA KURNIASIH, and DJAENURI. 1999. Development of alpha hemolytic verotoxigenic *Escherichia coli* vaccine: Verotoxic antibody responses in experimental animals, mice, rabbits and dairy cows. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 4(1): 35-47.

Escherichia coli isolates showing alpha hemolytic on blood agar were found in calves with bloody diarrhoea from Bandung, Sukabumi and Bogor. Three *E. coli* isolates designated as (B34c, B909, B910) were pathogenic for mice and selected for vaccine candidates. Crude supernatant of tryptic soy broth (TSB) cultures precipitated with saturated ammoniumsulphate caused cytopathic effect on vero cell line. For vaccine preparation the isolates were grown on tryptic soy agar (TSA). Whole cell inactive vaccine containing equal proportion of each isolate was prepared and emulsified in aluminum hydroxide gel at a final concentration of 1.5% and cell concentration equal to the tube number 10 of MacFarland standard. Mice and rabbits were injected subcutaneously of monovalent vaccine with the dose of 0.2 ml and 1 ml respectively. Four weeks later mice or rabbits were boosted with the same dose. Before injection each animal was bled, subsequently every two weeks period up to 4 weeks after the second injection. The sera were separated and kept at -20°C up to serological assay with an enzyme linked immunoassay (ELISA) was done. Vaccinated mice with VTEC were challenged with homologous isolate did not die, where as 60% of unvaccinated mice died within 2 days post challenged. Pregnant cows were given 2 doses of three valent vaccine 6 weeks and again 2 weeks before expected date of calving. Calves born were given colostrum and milk of the own mother. The three day old calf was challenged with three isolates of verotoxigenic *E. coli* studied. Calves born from vaccinated cows did not show diarrhoea at post challenged, whereas calf from unvaccinated cow demonstrated bloody diarrhoea at post challenged. From the experimental animals (mice and calves) demonstrated the presence of protection against challenged. The antiverotoxic antibody probably involved in important role of immunoprotection. These were supported by the presence of high titer anti verotoxic antibody in serum of experimental animals (mice and cows), as well as in experimental rabbits, but none in the unvaccinated animals.

Key words: *E. coli*, alpha hemolytic, verotoxic, dysentery, vaccine

ABSTRAK

SUPAR, B. POERWADIKARTA, NINA KURNIASIH, dan DJAENURI. 1999. Pengembangan vaksin *Escherichia coli* alfa hemolitik verotoksigenik: Respons antiverotoksik antibodi pada hewan percobaan mencit, kelinci dan sapi perah. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 4(1): 35-47.

Escherichia coli yang bersifat alfa haemolitik banyak diisolasi dari anak sapi penderita diare yang fesesnya bercampur lendir dan darah dari daerah Bandung, Sukabumi dan Bogor bersifat verotoksigenik. Tiga isolat (B34c, B909, B910) bersifat patogenik pada hewan mencit dipilih sebagai kandidat vaksin. *Crude* ekstraseluler toksin dari isolat tersebut yang ditumbuhkan pada medium cair *tryptic soy broth* bersifat verotoksigenik. Untuk pembuatan vaksin isolat bakteri ditumbuhkan pada media *tryptic soy* agar. Vaksin disiapkan dalam bentuk mati dan diemulsikan dalam alhidrogel dengan konsentrasi sel setara dengan kekeruhan tabung MacFarland no 10. Mencit dan kelinci diinjeksi vaksin dari masing-masing serotipe dengan dosis pada mencit 0,2 ml, pada kelinci 1 ml, injeksi secara subkutan. Empat minggu berikutnya diinjeksi vaksin (*booster*) dengan dosis yang sama. Sebelum injeksi vaksin darah diambil dan selanjutnya setiap 2 minggu, sampai 4 minggu sesudah *booster*. Serum darah dipisahkan dan disimpan untuk pemeriksaan respon antibodi dengan *enzyme linked immunoassay* (ELISA). Mencit percobaan yang divaksin ditantang dengan *E. coli* galur vaksin hidup tidak ada yang mati, mencit kontrol tidak divaksin mati 60%. Induk sapi perah bunting diinjeksi vaksin mengandung tiga macam serotipe 6 minggu dan 2 minggu sebelum prakiraan partus dengan dosis 5 ml tiap injeksi. Anak sapi lahir diberi kolostrum atau susu induknya. Umur 3 hari anak sapi ditantang dengan kuman hidup galur vaksin dan tidak terjadi diare. Sementara itu, anak sapi yang lahir dari induk yang tidak divaksin mengalami diare profus feses campur darah. Dari hasil uji tantang mencit dan anak sapi memberikan indikasi adanya daya proteksi antibodi dalam serum atau dari kolostrum atau susu yang bereaksi dengan komponen antigen ekstra seluler yang bersifat verotoksik. Hal

ini didukung dengan hasil uji ELISA dalam deteksi antibodi terhadap antigen verotoksik dalam serum dari hewan divaksin (mencit dan sapi) sangat tinggi, namun tidak ada respon antibodi terhadap komponen verotoksik dari serum hewan yang tidak diinjeksi vaksin atau sebelum diinjeksi vaksin.

Kata kunci: *E. coli*, alfa haemolitik, verotoksik, disenteri, vaksin

PENDAHULUAN

Escherichia coli biasanya dikategorikan sebagai oportunistik patogen baik pada manusia maupun hewan. Bakteri ini dapat menghuni saluran pencernaan, mengkolonisasi dan selanjutnya dapat menginfeksi organ ekstra intestinal dan dapat menyebabkan septisaemia, peritonitis, abses, meningitis, infeksi saluran urinaria baik pada hewan maupun manusia (CAVALIERI *et al.*, 1984). Sumber penularan *E. coli* adalah feses atau saluran pencernaan hewan dan manusia. Sejak lama diketahui bahwa *E. coli* yang bersifat hemolitik dapat menyebabkan lisis sel darah merah (BAMFORTH dan DUDGEON, 1952). Kemudian dikembangkan identifikasi secara serologik didasarkan sifat antigen somatik (O), antigen kapsul (K) dan antigen flagella (H) (KAUFFMANN, 1954), akan tetapi belum dapat membedakan dan menentukan sifat virulensi bakteri *E. coli*, dan tidak semua laboratorium veteriner dapat melakukan uji serologik. Dewasa ini telah diketahui faktor-faktor virulensi seperti antigen perlekatan dan enterotoksin dari bakteri tersebut (ORSKOV *et al.*, 1961, 1975; GAASTRA dan DE GRAAF, 1982; SUPAR dan HIRST, 1991) yang merupakan faktor predisposisi dan terjadinya penyakit, maka cara pengendalian penyakit di lapangan dapat dirumuskan.

E. coli serotipe tertentu dapat memproduksi sitotoksin yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan sel vero *monolayer*, bakteri tersebut mampu memproduksi ekstra selular toksin yang bersifat verotoksigenik, maka bakteri tersebut dinamakan verotoksigenik *E. coli* (VTEC). Pertama kali dilaporkan oleh KONOWALCHUK *et al.* (1977) berupa patogen penyebab disenteri pada manusia. Toksin verotoksik tersebut sifat-sifatnya serupa dengan toksin dari bakteri *Shigella dysenteriae*, oleh karena itu disebut juga *shiga like toxin* (SLT). Secara serologik dibedakan menjadi 2 jenis yaitu SLT I dan SLT II (O'BRIEN dan LAVECK, 1983; O'BRIEN dan HOLMES, 1987). *E. coli* yang memproduksi verotoksin tersebut dapat diisolasi dari sapi perah, sapi potong, daging, susu dan produk susu (KARMALI, 1989).

Banyak isolat VTEC diasingkan dari anak sapi diare yang fesesnya bercampur darah, dari daerah Bandung, Sukabumi, dan Bogor (KUSMIYATI dan SUPAR, 1998). Pada makalah ini dikemukakan sifat patogenitasnya, antigenisitas dan imunogenisitasnya beberapa isolat pada hewan percobaan mencit, kelinci dan sapi perah bunting untuk mengetahui prospeknya sebagai kandidat vaksin.

BAHAN DAN METODE

Isolat bakteri

Tiga isolat bakteri *E. coli* dari anak sapi diare berdarah (B34c, B909, B910) dan bersifat alfa-hemolitik dan supernatan dari kultur cair bersifat verotoksigenik dipilih dan dipelajari untuk pembuatan vaksin. Masing-masing isolat disubkultur pada media agar darah domba untuk melihat sifat hemolitiknya kemudian disubkultur pada media *tryptic soy broth* (TSB) untuk uji patogenisitasnya pada mencit. Jumlah kandungan sel tiap ml dihitung dengan metode pengenceran *pourplate*, diketahui kandungan kuman (8×10^9) sel per ml, kemudian diencerkan 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} .

Uji patogenisitas pada mencit

Tiap isolat diuji patogenisitasnya pada mencit, sebanyak 90 ekor mencit dibagi menjadi 3 grup (A, B, C), masing-masing terdiri atas 30 ekor. Tiap-tiap grup dibagi lagi menjadi 6 kelompok masing-masing 5 ekor. Tiap kelompok diinjeksi kuman yang disiapkan tersebut di atas. Grup A untuk diinjeksi isolat *E. coli* B34c, Grup B untuk isolat B909 dan grup C untuk isolat B910. Tiap mencit dari tiap kelompok diinjeksi 0,1 ml secara intra peritoneal mulai dari yang tidak diencerkan sampai dengan enceran 10^{-4} . Tiap kelompok ditempatkan dalam satu kurungan, diberi minum dan pakan secukupnya. Kurungan disimpan dalam kandang hewan kecil dan diamati adanya kematian mencit esok harinya. Adanya kematian dalam waktu 2 hari pasca injeksi isolat tersebut dinyatakan bersifat patogenik.

Pembuatan antigen untuk mempelajari respon tanggap kebal

1. Antigen *whole* sel vaksin

Tiap isolat *E. coli* (B34c, B909, B910) disubkultur pada media agar darah 5% (darah domba) yang disiapkan dalam cawan Petri. Setelah inokulasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 malam. Kultur diperiksa kemurniannya, bila ternyata murni, sel dibilas secara aseptis dengan larutan NaCl fisiologis (0,85%) steril. Suspensi sel ini dipakai sebagai inokulum untuk

menginokulasi media agar darah yang disiapkan dalam botol Roux, suspensi sel diencerkan hingga kekeruhan setara dengan kekeruhan tabung standard MacFarland no 2. Tiap botol Roux diinokulasi dengan 5-8 ml, kemudian diinkubasikan seperti sebelumnya, tiap isolat diperlukan lima media botol Roux. Sel yang tumbuh pada permukaan agar darah dalam botol Roux dibilas dengan NaCl fisiologis steril 25 ml per botol, beberapa butir bola-bola gelas steril dimasukkan ke dalam tiap botol untuk mempermudah pelepasan sel. Sel dari lima botol Roux disatukan, kemudian ditambah formalin sampai konsentrasi akhir 0,2%, disimpan dalam lemari es satu malam. Esok harinya suspensi sel sentrifugasi untuk menghilangkan formalin, endapan sel dicuci dengan NaCl fisiologis dua kali dengan cara sentrifugasi seperti tersebut di atas. Endapan sel dilarutkan dalam NaCl fisiologis steril sebagai suspensi kuman stok dan dapat disimpan di dalam lemari es 4°C sebagai stok sel sampai proses selanjutnya.

Dibuat imunogen monovalen atau vaksin, masing-masing B34c, B909 dan B910. antigen diemulsikan dengan alhidrogel pada konsentrasi akhir 1,5% dengan kepekatan sel setara dengan kekeruhan tabung MacFarland no. 10. Vaksin ini untuk mempelajari respon tanggap kebal masing-masing isolat pada mencit. Di samping itu, vaksin polivalen yang terdiri dari 3 isolat VTEC tersebut dan juga vaksin polivalen yang terdiri dari isolat tersebut ditambah isolat ETEC K99, F41 dibuat untuk mempelajari respon tanggap kebal pada sapi bunting untuk mengetahui respon tanggap kebal di dalam serum dan kolostrum.

2. Pembuatan antigen ekstraseluler dari supernatan kultur cair

Isolat B34c, B909 dan B910 disubkultur pada media agar darah 5% dalam cawan Petri dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu malam untuk mengecek kemurniannya. Dua atau tiga koloni hemolitik (alfa hemolitik) disentuh dengan ose bermata, kemudian diinokulasikan pada media cair *tryptic soy broth* volume satu liter, diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu malam sambil dikocok dengan magnitic stirrer. Setelah inkubasi sel dalam kultur diendapkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dipisahkan, disimpan dalam freezer -20°C, atau langsung diproses tahap selanjutnya. Sebanyak 15 ml dimasukkan dalam tabung sentrifuse steril yang jernih, kemudian ditambah 15 ml ammonium sulphate jenuh, disimpan dalam lemari es 4°C selama satu malam. Esok harinya disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang, endapan dilarutkan dalam larutan NaCl fisiologis dengan volume 1/5 dari volume awal supernatan dari kultur cair. Suspensi didialisis melawan larutan garam

NaCl fisiologis pada suhu 4°C selama satu malam. Setelah tahap itu, disterilkan secara filtrasi dengan kertas filter 0,45 mikron. Filtrat yang dihasilkan untuk injeksi mencit dan injeksi kelinci secara intra vena dan untuk diuji ulang pada sel vero *monolayer*, selanjutnya disimpan -20°C sampai saatnya diperlukan. Sementara itu, untuk penyediaan antigen untuk ELISA tidak perlu sterilisasi filtrasi. Setelah didialisis, disentrifugasi, supernatan disimpan -20°C sampai saatnya untuk *coating* cawan ELISA.

Uji respon tanggap kebal pada mencit

Respon tanggap antigen atau vaksin *whole* sel atau antigen dari supernatan masing-masing isolat yang dibuat di atas dilakukan pada lima ekor mencit. Antigen *whole* sel yang diemulsikan dalam alhidrogel (B34c, B909, B910) masing-masing diinjeksikan pada lima ekor mencit secara intra peritoneal dengan dosis 0,2ml, dua minggu berikutnya diinjeksi vaksin (*booster*) dengan dosis yang sama. Sebelum injeksi vaksin dan sebelum injeksi vaksin *booster* darah diambil dan selanjutnya setiap selang dua minggu. Serum darah mencit dipisahkan dan disimpan di dalam freezer -20°C sampai saat uji ELISA dilakukan.

Respon tanggap kebal antigen (vaksin) dari supernatan dilakukan seperti pada percobaan di atas, dengan dosis antigen 0,1 ml tanpa diemulsikan dalam *adjuvant*.

Uji respon tanggap kebal dan toksisitas pada kelinci

Stok *whole* sel yang disiapkan secara aseptis tersebut di atas, diencerkan dalam larutan NaCl non pyrogenik (PT Otsuka, Indonesia), kekentalan sel dibuat setara dengan kekeruhan tabung standard MacFarland no. 6. Masing-masing isolat (B34c, B909, B910) diinjeksikan pada seekor kelinci secara subkutan dosis 0,25 ml, empat hari berikutnya diinjeksi dengan dosis 1 ml. Selanjutnya setiap empat hari diinjeksi antigen secara intra vena dengan dosis bertingkat yaitu 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 2,5 ml. Sebelum injeksi antigen yang pertama dan setiap dua minggu darah diambil, serum dipisahkan dan disimpan dalam freezer -20°C sampai saatnya uji ELISA.

Untuk antigen supernatan diperlakukan seperti di atas. Setelah disterilkan dengan filtrasi diencerkan 1/2 dengan larutan NaCl non pyrogenik (PT Otsuka, Indonesia).

Uji respon antibodi pada sapi perah bunting

Delapan ekor sapi perah bunting (± 7 bulan) dibagi menjadi dua kelompok (A dan B) masing-masing empat ekor. Kelompok A diinjeksi vaksin, yang terdiri atas tiga isolat (B34c, B909 dan B910) yang diemulsikan dalam alhidrogel, seperti tersebut di atas dengan dosis 5 ml, aplikasi subkutan di daerah leher di belakang telinga. Kelompok B diinjeksi vaksin campuran VTEC dan ETEC K99, F41 dan K99F41. Tiga minggu berikutnya diinjeksi vaksin dengan dosis yang sama. Sebelum diinjeksi vaksin dan sebelum *booster*, darah diambil, dan selanjutnya setiap selang waktu 2 minggu. Serum dipisahkan dan disimpan pada suhu -20°C sampai saatnya diperiksa secara ELISA. Dua ekor induk sapi perah bunting sebagai kontrol tidak divaksinasi.

Prosedur ELISA

Antigen ELISA disiapkan dari supernatan yang bersifat verotoksigenik isolat *E. coli* B34c, B909, B910, seperti tersebut di atas. Masing-masing antigen disuspensikan dalam *buffer carbonate-bicarbonate* ber-pH 9,6, dengan pengenceran 1:10 dari hasil titrasi secara ELISA. Sementara itu, antigen pili untuk ELISA dalam deteksi respon anti-K99 atau -F41, antibodi dibuat mengikuti metode SUPAR dan HIRST (1991).

Teknik ELISA untuk deteksi respon antibodi terhadap antiverotoksik antibodi mengikuti metode SUPAR dan HIRST (1991) dengan sedikit modifikasi. Tiap lubang cawan mikro ELISA dengan dasar lengkung dilapisi 50 μl antigen ELISA yang dilarutkan dalam *buffer carbonate-bicarbonate*, cawan ditutup dan dimasukkan dalam kantong plastik, kemudian diinkubasikan dalam lemari es dengan suhu 4°C selama satu malam. Esok harinya tiap lubang cawan dicuci empat kali dengan *phosphate buffer saline* (PBS) yang mengandung tween 0,05% (PBST), masing-masing pencucian dilakukan selama 4 menit. Serum yang akan diuji diencerkan 1 : 200 dalam PBST, 50 μl dimasukkan ke dalam lubang secara duplikat (satu sampel dua lubang). Kontrol serum negatif selalu disertakan dalam tiap cawan. Serum positif diencerkan *in situ* mulai dari 1/200 dalam lubang cawan (11, 12) dengan faktor pengenceran 1/2 sampai baris G11, 12, sedangkan lubang pada baris H11, 12 berisi PBST. Setelah sampel dimasukkan ke dalam lubang cawan secara duplikat, cawan ditutup dan dibungkus dengan kertas saring yang dibasahi dengan air dan dimasukkan

ke dalam kantong plastik, kemudian diinkubasikan di dalam inkubator pada suhu 37°C selama satu jam. Tiap cawan dilapisi satu jenis antigen untuk menguji serum suntikan antigen yang *homologous* atau *heterologous*, untuk mengetahui tinggi-rendahnya respon antibodi terhadap antigen yang *homologous* dan *heterologous*. Setelah inkubasi, cawan dicuci empat kali seperti sebelumnya. Sebanyak 50 μl konjugate anti-(mencit, kelinci, sapi) IgG horseradish peroksidase (Silenus Australia) yang diencerkan dalam PBST yang mengandung 0,02% ovalbumin (*chicken egg albumin* Sigma) dimasukkan ke dalam setiap lubang. Cawan dibungkus dan diinkubasikan seperti sebelumnya. Cawan dicuci empat kali dengan PBST seperti sebelumnya. Seratus μl suspensi substrat yang terdiri dari 200 μl dari 1 mM 2,2-azino di (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (Sigma Pty., Ltd.) yang dilarutkan dalam air dicampurkan dalam 10 ml larutan 0,1 M *citrate-phosphate buffer* pH 4,2 yang mengandung 2,5 M H_2O_2 , dimasukan ke dalam tiap lubang. Cawan ditutup, dibungkus dan diinkubasikan seperti sebelumnya selama satu jam. Reaksi enzyme yang terikat dalam kompleks reaksi antigen-antibodi terhadap substrat dibaca dengan alat pembaca ELISA (Titertek Multiskan) dengan panjang gelombang 414 nm, yang sebelumnya alat tersebut sudah distandarisasi dengan non reaktif substrat. Data hasil-hasil pembacaan ELISA disusun dalam tabel, untuk memudahkan cara evaluasi dalam melihat perkembangan terbentuknya respon tanggap kebal.

Untuk ELISA dalam deteksi respon tanggap kebal terhadap K99, F41 antigen mengikuti tahap-tahap seperti pengujian respon tanggap kebal antigen verotoksik seperti tersebut di atas (SUPAR dan HIRST, 1991)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sifat patogenesis isolat *E. coli* verotoksigenik (B34c, B909, B910) pada mencit disajikan pada Tabel 1. Pada 24 jam sesudah infeksi, mencit yang diinjeksi kuman aktif 0,1 ml tanpa diencerkan untuk isolat B34c mati 60%, B909 80%, dan B910 100%. Pada enceran 1/10 kematian mencit berturut-turut 40%, 40% dan 80%. Pengenceran lebih lanjut tidak menimbulkan kematian. Maka tingkat pengenceran ini (10^{-1}) akan dipakai untuk ujiantang mencit yang divaksin.

Tabel 1. Patogenesis *E. coli* verotoksigenik pada mencit

<i>E. coli</i> yang diuji		Patogenesis pada mencit pada pengenceran							
		Tanpa enceran		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}	
n	Mati	n	Mati	n	Mati	n	Mati	n	Mati

B34c	5	3	5	2	5	0	5	0	5	0
B909	5	4	5	2	5	0	5	0	5	0
B910	5	5	5	4	5	0	5	0	5	0

Pengamatan daya proteksi vaksin mati monovalen pada mencit, yang disiapkan dari tiap isolat *E. coli* B34c, B909, B910 dilakukan pada hewan percobaan yang terbatas. Imunogen disiapkan dalam bentuk *whole* sel, ekstrak yang dibuat dari sel yang disonikasi dan imunogen verotoksigenik dari cairan kultur TSB yang diendapkan dengan amonium sulfat. Hasil ujiantang dapat dilihat pada Tabel 2. Dari ketiga jenis imunogen tersebut yang paling tinggi memberikan proteksi ialah imunogen dari endapan supernatan. Kontrol mencit yang tidak diinjeksi vaksin mati dengan dosis yang sama, mati dalam waktu 24 jam.

Pengamatan daya proteksi vaksin pada anak sapi perah dilakukan dengan menggunakan jumlah hewan yang sangat terbatas. Hasil pengamatan ujiantang anak sapi lahir dari induk diinjeksi vaksin *E. coli* verotoksigenik atau campuran isolat verotoksigenik (VTEC) dan enterotoksigenik (ETEC K99, F41) yang ditantang secara per oral dapat dilihat pada Tabel 3. Pada anak sapi yang lahir dari induk yang tidak divaksin, setelah ditantang dengan kuman hidup, mengalami diare berdarah. Sementara itu, pada kelompok yang divaksin, tidak mengalami diare walaupun ditantang dengan campuran VTEC dan ETEC.

Tabel 2. Daya proteksi vaksin *E. coli* verotoksigenik pada mencit terhadap ujiantang isolat yang homolog

Isolat untuk vaksin	Uji tantang dengan isolat homolog				Keterangan
	Tanpa enceran		Enceran 10 ⁻¹		
	n	Mati	n	Mati	
<i>E. coli</i> (B34c)					
Endapan supernatan	3	0	3	0	baik
Ekstrak sonikasi	3	2	2	2	
<i>Whole</i> sel	3	3	3	3	
<i>E. coli</i> (B909)					
Endapan supernatan	5	0	5	0	baik
Ekstrak sonikasi	2	1	2	1	
<i>Whole</i> sel	3	3	3	1	
<i>E. coli</i> (B910)					
Endapan supernatan	2	0	2	0	baik
Ekstrak sonikasi	2	2	2	0	
<i>Whole</i> sel	3	2	3	1	

Tabel 3. Percobaan daya proteksi vaksin VTEC dan VTEC plus ETEC K99, F41

Nomor sapi	Vaksin	Tanggal vaksin ke-1	Tanggal vaksin ke-2	Tanggal beranak	Tanggal tantang	Keterangan
543	VTEC	31-3-1998	20-4-1998	15-5-1998	18-5-1998 VTEC	Tidak diare
545	VTEC	31-3-1998	20-4-1998	5-5-1998		Mati saat beranak
544	VTEC	31-3-1998	20-4-1998	28-5-1998	31-5-1998 VTEC	Tidakdiare
547	VTEC	31-3-1998	20-4-1998	29-7-1998	1-8-1998 VTEC	Tidak diare
548	VTEC+ETEC	31-3-1998	20-4-1998	19-6-1998	22-6-1998 VTEC	Tidak diare
549	VTEC+ETEC	31-3-1998	20-4-1998	24-5-1998	27-5-1998 VTEC+ETEC	Tidakdiare
550	VTEC+ETEC	31-3-1998	20-4-1998	24-6-1998	27-5-1998 VTEC+ETEC	Tidak diare
736	VTEC+ETEC	31-3-1998	20-4-1998	28-6-1998	1-7-1988 VTEC	Tidak diare
546	Tidak divaksin	-	-	28-3-1998	1-4-1998	Diare berdarah

Keterangan : VTEC: *E. coli* verotoksigenik (B34c, B909, B910), ETEC: *E. coli* K99 dan F41 polivalen

Hasil pengamatan respon tanggap kebal pada hewan percobaan mencit yang dipantau dengan ELISA dari masing-masing vaksin monovalen dapat dilihat pada Tabel 4. Antigen yang dipakai untuk *coating* sebagai penangkap (*capture*) antibodi ialah endapan supernatan kultur cair TSB, sama dengan yang dipakai

untuk imunogen pada mencit dan bersifat verotoksigenik. Ketiga isolat mempunyai sifat verotoksik terhadap jaringan sel *vero monolayer*. Dari pengamatan respon tanggap kebal bahwa mencit yang diinjeksi imunogen *whole* sel dan endapan supernatan isolat *E. coli* B34c mempunyai respon tanggap kebal

rendah terhadap antigen ELISA endapan supernatan isolat *E. coli* B909 dan B910. Sebaliknya respon tanggap kebal supernatan B909 dan B910 terhadap antibodi *capture* antigen supernatan B34c rendah. Dari hasil ini isolat B909 sama dengan B910 namun berbeda

dengan B34c. Untuk mempertegas perbedaan tersebut perlu penelitian lebih lanjut mengenai sifat karakteristiknya dengan elektroforesis dan *immuno-blotting*.

Tabel 4. Respon tanggap kebal mencit yang diinjeksi antigen *E. coli* verotoksigenik bentuk *whole* sel atau *crude* supernatan yang dideteksi secara ELISA dari serum dua minggu sesudah *booster*

Antigen <i>E. coli</i> untuk injeksi	Optikal densitas (OD) 414 nm pada enceran serum							Antigen untuk uji ELISA	
	1/200	1/400	1/800	1/1.600	1/3.200	1/6.400	1/12.800		
B910									
Whole sel	1,61	1,12	0,51	0,40	0,29	0,12	0,10	Supernatan <i>E. coli</i> B34c	
Supernatan	1,08	0,44	0,18	0,11	0,09	0,08	0,07		
B909									
Whole sel	1,86	1,84	1,26	0,68	0,45	0,25	0,18		
Supernatan	1,37	0,86	0,26	0,26	0,12	0,08	0,08		
B34c									
Whole sel	1,88	1,34	0,87	0,51	0,32	0,19	0,14		
Supernatan	1,94	1,83	1,33	0,88	0,53	0,40	0,20		
B910									
Whole sel	1,92	1,74	0,93	0,49	0,28	0,17	0,12	Supernatan <i>E. coli</i> B909	
Supernatan	1,68	1,51	0,83	0,47	0,22	0,15	0,11		
B909									
Whole sel	1,90	1,82	1,31	0,72	0,43	0,25	0,15		
Supernatan	2,00	1,95	1,57	0,96	0,56	0,29	0,10		
B34c									
Whole sel	1,10	0,64	0,27	0,14	0,11	0,07	0,07		
Supernatan	0,47	0,38	0,23	0,17	0,14	0,08	0,07		
B910									
Whole sel	1,95	1,74	1,00	0,50	0,36	0,22	0,13	Supernatan <i>E. coli</i> B909	
Supernatan	1,85	1,64	0,78	0,46	0,34	0,25	0,12		
B909									
Whole sel	1,96	1,80	1,20	0,86	0,54	0,39	0,21		
Supernatan	2,13	1,97	1,50	1,02	0,67	0,45	0,27		
B34c									
Whole sel	1,00	0,89	0,37	0,30	0,27	0,23	0,14		
Supernatan	0,72	0,50	0,38	0,28	0,19	0,15	0,12		

Hasil pengamatan respon tanggap kebal pada kelinci mendapatkan hasil yang serupa, bahwa isolat B34c sebagian sifat-sifat imunogenisitasnya berbeda dengan isolat B909, B910 (Tabel 5), terutama respon tanggap kebal yang ditimbulkan pada mencit yang diinjeksi imunogen *whole* sel. Bila hasil tersebut di

atas dikaitkan dengan perkembangan terbentuknya respon tanggap kebal pada mencit sejak dari awal sebelum injeksi imunogen dan *booster* sangat jelas berbeda (Tabel 7). Namun demikian perbedaan tersebut tidak terjadi pada perkembangan terbentuknya respon tanggap kebal pada kelinci yang tertulis pada Tabel 8.

Tabel 5. Respon tanggap kebal kelinci yang diinjeksi antigen *E. coli* verotoksigenik bentuk *whole* sel atau *crude* supernatan yang dideteksi secara ELISA dari serum dua minggu sesudah injeksi antigen terakhir

Antigen <i>E. coli</i> untuk injeksi	Optikal densitas (OD) 414 nm pada enceran serum							Antigen untuk uji ELISA
	1/400	1/800	1/1.600	1/3.200	1/6.400	1/12.800	1/25.600	
B910								
Whole sel	0,30	0,15	0,12	0,12	0,06	0,05	0,05	
Supernatan	1,72	1,56	1,40	1,02	0,65	0,39	0,20	Supernatan
B909								<i>E. coli</i>
Whole sel	0,72	0,46	0,33	0,23	0,17	0,13	0,10	B34c
Supernatan	1,74	1,66	1,60	1,40	1,08	0,70	0,40	
B34c								
Whole sel	1,84	1,80	1,74	1,74	1,60	1,30	0,90	
Supernatan	1,75	1,67	1,53	1,27	0,90	0,58	0,40	
Tidak divaksin	0,58	0,35	0,23	0,16	0,09	0,08	0,07	
	0,59	0,34	0,23	0,15	0,09	0,09	0,06	
B910								
Whole sel	1,79	1,48	1,26	0,92	0,57	0,31	0,10	
Supernatan	1,70	1,69	1,59	1,45	1,22	0,80	0,40	Supernatan
B909								<i>E. coli</i>
Whole sel	1,82	1,72	1,60	1,46	1,35	1,00	0,70	B909
Supernatan	1,77	1,69	1,40	1,20	0,90	0,60	0,50	
B34c								
Whole sel	1,30	1,08	0,76	0,49	0,25	0,17	0,17	
Supernatan	1,64	1,46	1,01	0,88	0,54	0,35	0,25	
Tidak divaksin	0,57	0,33	0,20	0,13	0,10	0,08	0,07	
	0,61	0,34	0,23	0,15	0,10	0,08	0,06	
B910								
Whole sel	1,70	1,47	1,00	0,85	0,53	0,28	0,20	
Supernatan	1,70	1,63	1,61	1,38	1,16	0,70	0,40	Supernatan
B909								<i>E. coli</i>
Whole sel	1,93	1,70	1,68	1,64	1,14	0,90	0,56	B910
Supernatan	1,70	1,60	1,50	1,40	1,11	0,82	0,45	
B34c								
Whole sel	0,90	0,57	0,33	0,25	0,15	0,10	0,09	
Supernatan	1,44	0,80	0,74	0,67	0,36	0,27	0,15	
Tidak divaksin	0,54	0,34	0,25	0,20	0,15	0,12	0,09	
	0,52	0,32	0,21	0,16	0,13	0,10	0,09	

Tabel 6. Respon tanggap kebal pada induk sapi perah bunting yang diinjeksi antigen *E. coli* verotoksigenik (B34c, B909, B910) dan *E. coli* K99, dan F41 dideteksi secara ELISA dari serum dua minggu *booster*

Nomer sapi yang diinjeksi vaksin	Optikal densitas (OD) 414 nm pada enceran serum							Antigen uji

VTEC +ETEC	1/400	1/800	1/1.600	1/3.200	1/6.400	1/12.800	1/25.600	ELISA
548	1,93	1,77	1,34	0,90	0,51	0,28	0,18	Supernatan <i>E. coli</i> B34c
549	1,68	1,35	0,77	0,39	0,22	0,16	0,11	
550	1,48	0,99	0,49	0,30	0,18	0,13	0,11	
736	1,36	1,06	0,54	0,34	0,21	0,14	0,11	
Tidak divaksin	0,43	0,30	0,19	0,14	0,10	0,08	0,08	
	0,44	0,32	0,19	0,16	0,12	0,09	0,09	
548	1,69	1,33	0,66	0,35	0,21	0,16	0,12	Supernatan <i>E. coli</i> B909
549	1,78	1,25	0,95	0,70	0,46	0,27	0,23	
550	1,88	1,28	0,70	0,42	0,26	0,17	0,12	
736	1,70	1,39	0,78	0,50	0,30	0,23	0,20	
Tidak divaksin	0,23	0,18	0,20	0,20	0,20	0,16	0,16	
	0,39	0,22	0,17	0,13	0,11	0,08	0,16	
548	1,64	1,24	0,64	0,33	0,21	0,13	0,10	Supernatan <i>E. coli</i> B910
549	1,65	1,30	0,70	0,44	0,27	0,17	0,11	
550	1,68	1,24	0,62	0,38	0,24	0,15	0,12	
736	1,57	1,32	0,66	0,41	0,23	0,15	0,11	
Tidak divaksin	0,23	0,15	0,11	0,11	0,11	0,11	0,08	
	0,39	0,25	0,17	0,11	0,11	0,08	0,09	
548	1,87	1,58	1,17	0,73	0,52	0,52	0,23	Pili K99
549	1,96	1,70	1,52	0,90	0,59	0,59	0,20	
550	1,52	1,21	0,80	0,50	0,26	0,26	0,12	
736	1,98	1,92	1,80	1,70	1,40	1,40	0,57	
Tidak divaksin	0,25	0,18	0,14	0,10	0,08	0,09	0,08	
	0,23	0,15	0,10	0,09	0,08	0,08	0,08	
548	1,99	1,43	0,79	0,50	0,24	0,15	0,12	Pili F41
549	1,83	1,58	1,07	0,58	0,29	0,17	0,12	
550	1,70	1,20	0,62	0,38	0,18	0,12	0,10	
736	1,98	1,92	1,73	1,38	0,73	0,41	0,27	
Tidak divaksin	0,20	0,13	0,11	0,08	0,08	0,08	0,08	
	0,24	0,17	0,11	0,09	0,08	0,08	0,08	

Tabel 7. Pengamatan perkembangan respon tanggap kebal pada mencit yang diinjeksi antigen dari isolat *E. coli* hemolitik, verotoksigenik (B34c, B909, B910), evaluasi adanya reaksi silang di antara isolat tersebut

Antigen <i>E. coli</i> yang diinjeksikan	Optikal desitas (OD) 414 nm serum yang diambil pada				Antigen untuk uji ELISA
	Sebelum injeksi	Sesudah injeksi antigen (minggu)			
		2	4	6	7

Isolat <i>E. coli</i>						
B910						
Whole sel	0,14	0,16	0,18	0,24	0,39	Supernatan <i>E. coli</i> B34c
Supernatan	0,15	0,17	0,18	0,38	0,59	
B909						
Whole sel	0,13	0,19	0,26	0,38	0,52	Supernatan <i>E. coli</i> B34c
Supernatan	0,11	0,66	1,20	1,14	1,06	
B34c						
Whole sel	0,13	0,38	0,64	0,88	1,10	Supernatan <i>E. coli</i> B909
Supernatan	0,11	0,74	1,12	1,24	1,36	
B910						
Whole sel	0,36	0,58	0,71	1,22	1,88	Supernatan <i>E. coli</i> B909
Supernatan	0,27	0,68	1,90	1,55	1,40	
B909						
Whole sel	0,15	0,48	0,82	1,22	1,63	Supernatan <i>E. coli</i> B910
Supernatan	0,23	0,80	1,37	1,64	1,91	
B34c						
Whole sel	0,15	0,38	0,30	0,35	0,39	Supernatan <i>E. coli</i> B910
Supernatan	0,21	0,33	0,46	0,42	0,48	
B910						
Whole sel	0,20	0,45	0,65	1,10	1,38	Supernatan <i>E. coli</i> B910
Supernatan	0,21	1,03	1,55	1,40	1,20	
B909						
Whole sel	0,20	0,48	0,65	1,05	1,44	Supernatan <i>E. coli</i> B910
Supernatan	0,23	0,80	1,35	1,67	1,69	
B34c						
Whole sel	0,26	0,37	0,38	0,45	0,52	Supernatan <i>E. coli</i> B910
Supernatan	0,28	0,40	0,42	0,43	0,45	

Tabel 8. Pengamatan respon tanggap kebal kelinci yang diinjeksi antigen isolat *E. coli* hemolitik, verotoksigenik (B34c, B909, B910)

Antigen <i>E. coli</i> yang diinjeksikan	Optikal desitas (OD) 414 nm sampel serum				Antigen untuk uji ELISA
	Sebelum injeksi	Sesudah injeksi antigen (minggu)			
		3	4	6	7
Isolat <i>E. coli</i>					
B910					

B909	Whole sel	0,32	0,66	0,76	0,65	1,20	Supernatan <i>E. coli</i> B34c
	Supernatan	0,45	0,71	1,80	1,88	1,82	
B34c	Whole sel	0,33	0,70	1,11	1,30	1,30	
	Supernatan	1,20	1,82	1,88	1,93	1,88	
B910	Whole sel	0,82	1,91	1,93	1,97	1,92	
	Supernatan	0,41	1,96	1,98	1,96	1,95	
B909	Whole sel	0,47	1,86	1,81	1,82	1,85	Supernatan <i>E. coli</i> B909
	Supernatan	0,36	1,88	1,89	1,89	1,85	
B34c	Whole sel	0,33	1,89	1,89	1,92	1,86	
	Supernatan	0,84	1,88	1,88	1,96	1,89	
B910	Whole sel	0,60	1,40	1,50	1,62	1,62	
	Supernatan	0,47	1,82	1,94	1,94	1,89	
B909	Whole sel	0,25	1,90	1,87	1,89	1,89	Supernatan <i>E. coli</i> B910
	Supernatan	0,30	1,90	1,84	1,84	1,90	
B34c	Whole sel	0,29	1,94	1,90	1,93	1,89	
	Supernatan	0,40	1,95	1,92	1,92	1,89	
B910	Whole sel	0,70	1,24	1,51	1,66	1,79	
	Supernatan	0,40	1,66	1,88	1,90	1,85	

Respon tanggap kebal induk sapi bunting yang diinjeksi vaksin VTEC trivalen dan yang dicampur dengan ETEC dapat dikatakan sangat homogen dilihat berdasar atas nilai OD pada pembacaan ELISA (Tabel 6, 9 dan 10). Sulit dibedakan respon tanggap kebal hewan yang divaksin terhadap masing-masing antigen yang dipakai untuk menangkapi antibodi.

Dua dosis vaksin VTEC trivalen atau VTEC plus ETEC polivalen yang diberikan dalam jangka waktu 3 minggu menimbulkan terbentuknya antibodi sangat baik dan tetap tinggi sampai 7 minggu pasca injeksi vaksin *booster*, pada periode tersebut titer antibodi cukup tinggi. Anti K99 atau anti F41, antibodi yang terbentuk pada kelompok induk sapi yang divaksin

dengan campuran VTEC plus ETEC cukup tinggi (Tabel 10). Hasil ini menunjukkan bahwa aplikasi vaksin bakterial yang mengandung berjenis-jenis antigen dalam waktu yang bersamaan tidak menimbulkan efek saling menghambat. Dalam hal ini aplikasi vaksin *E. coli* polivalen dalam upaya untuk pengendalian kolibasilosis pada anak sapi yang ditunjukkan adanya titer antibodi yang tinggi di dalam serum belum dapat dikatakan dapat memberikan proteksi kepada pedet yang dilahirkan. Pada sapi pemindahan maternal antibodi dari induk ke anak atau fetus tidak melalui darah lewat plasenta (TIZARD, 1982), akan tetapi melalui kolostrum atau susu. Namun demikian respon

tanggap kebal terhadap antigen verotoksik, K99 dan F41 belum dapat dikemukakan pada makalah ini.

Tabel 9. Pengamatan perkembangan respon tanggap kebal sapi perah bunting yang diinjeksi vaksin *E. coli* verotoksigenik polivalen (B34c, B909, B910) dideteksi secara ELISA

Nomor sapi	Optikal densitas (OD) 414 nm pada enceran serum							Antigen untuk uji ELISA
	Sebelum injeksi vaksin	Sesudah injeksi vaksin/ <i>booster</i> (minggu)						
		2	3	4	6	8	10	
543	0,44	1,74	1,97	1,67	1,79	1,83	1,71	Supernatan <i>E. coli</i> B34c
544	0,36	1,84	1,95	1,58	1,78	1,76	1,50	
545	0,63	1,42	1,24	1,20	1,98	1,92	1,62	
547	0,50	1,40	1,50	1,66	1,98	1,97	1,97	
546	Tidak divaksin	0,51	0,62	0,75	0,69	0,64	0,83	
543	0,39	1,78	1,97	1,77	1,87	1,91	1,90	Supernatan <i>E. coli</i> B909
544	0,39	1,94	1,96	1,79	1,78	1,81	1,80	
545	0,63	1,47	1,24	1,50	1,84	1,88	1,80	
547	0,70	1,87	1,98	1,63	1,96	1,99	1,92	
546	Tidak divaksin	0,52	0,58	0,75	0,79	0,76	0,74	
543	0,43	1,83	1,99	1,83	1,87	1,83	1,83	Supernatan <i>E. coli</i> B910
544	0,39	1,88	1,94	1,75	1,84	1,82	1,65	
545	0,66	1,42	1,42	1,44	1,83	1,85	1,61	
547	0,70	1,91	1,97	1,94	1,95	1,92	1,94	
546	Tidak divaksin	0,57	0,74	0,76	0,80	0,77	0,80	

Tabel 10. Pengamatan perkembangan respon tanggap kebal sapi perah bunting yang diinjeksi vaksin *E. coli* verotoksigenik polivalen (B34c, B909, B910) dan *E. coli* K99, dan F41 dideteksi secara ELISA

Nomer sapi	Optikal densitas (OD) 414 nm pada enceran serum							Antigen untuk uji ELISA
	Sebelum injeksi vaksin	Sesudah injeksi vaksin/ <i>booster</i> (minggu)						
		2	3	4	6	8	10	
548	0,62	1,76	1,66	1,68	1,26	1,12	1,07	Supernatan <i>E. coli</i> B34c
549	0,31	1,19	1,62	1,63	1,74	1,55	1,44	
550	0,97	1,86	1,84	1,82	1,80	1,68	1,70	
736	0,83	1,68	1,85	1,71	1,88	1,52	1,50	
546	Tidak divaksin	0,67	0,60	0,67	0,64	0,70	0,70	

548	0,66	1,58	1,46	1,40	1,87	1,30	1,00	
549	0,30	0,86	1,40	1,40	1,78	1,56	1,48	Supernatan
550	0,95	1,78	1,86	1,84	1,84	1,87	1,63	<i>E. coli</i>
736	0,99	1,71	1,94	1,83	1,96	1,80	1,68	B909
546	Tidak divaksin	0,62	0,53	0,75	0,79	0,76	0,63	
548	0,50	1,57	1,54	1,50	1,24	0,97	0,98	
549	0,23	0,78	1,46	1,13	1,36	1,17	0,95	Supernatan
550	0,96	1,68	1,75	1,72	1,73	1,57	1,43	<i>E. coli</i>
736	0,73	1,50	1,82	1,80	1,57	1,48	1,28	B910
546	Tidak divaksin	0,54	0,45	0,47	0,58	0,40	0,50	
548	0,52	1,80	1,80	1,84	1,37	1,48	1,15	
549	0,27	0,58	1,87	1,88	1,86	1,76	1,56	Pili K99
550	0,82	1,67	1,85	1,88	1,80	1,50	1,50	
736	0,54	1,70	1,92	1,87	1,91	1,55	1,54	
546	Tidak divaksin	0,32	0,40	0,40	0,52	0,50	0,50	
548	0,39	1,68	1,77	1,76	1,42	1,20	1,00	
549	0,24	0,35	1,80	1,72	1,65	1,48	1,10	Pili F41
550	0,67	1,73	1,87	1,84	1,74	1,30	1,32	
736	0,59	1,70	1,84	1,64	1,77	1,20	1,01	
546	Tidak divaksin	0,42	0,49	0,52	0,59	0,50	0,55	

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dikemukakan di atas disimpulkan bahwa galur lokal *E. coli* hemolitik (B34c, B909, B910) memproduksi ekstra selular toksin bersifat verotoksigenik, antigenik, imunogenik dan imunoprotektif. Vaksin sel utuh yang dibuat dari isolat tersebut dapat menimbulkan respon antiverotoksik antibodi dalam hewan percobaan mencit, kelinci dan sapi perah bunting, dapat dideteksi dengan ELISA, verotoksin sebagai *capture* antibodi. Aplikasi vaksin mati campuran VTEC trivalen dan ETEC polivalen dalam waktu yang bersamaan tidak menimbulkan efek saling menghambat terbentuknya masing-masing respon antibodi protektif (anti verotoksik antibodi, anti K99 dan F41 antibodi). Anak sapi perah yang diberi kolostrum induknya yang diinjeksi vaksin campuran VTEC dan ETEC terlindungi terhadap uji tantang dari bakteri homolog dan campuran. Vaksin polivalen VTEC dan ETEC dapat dipakai untuk pengendalian kolibasilosis dan disenteri *E. coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- BAMFORTH, J. and J. A. DUDGEON. 1952. The haemolytic activity of bacteria *Coli*. *J. Path. Bacteriol.* LXIV: 751-761.
- CAVALIERI, S. J., G. A. BOHACH, and I. S. SNYDER. 1984. *Escherichia coli* alfa hemolytic, characteristic and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 48: 326-343.
- GAASTRA, W. and F. K. DE GRAAF. 1982. Host specific fimbrial adhesins of non invasive *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* 46: 129-161.
- KARMALI, M. A. 1989. Infection by verotoxin producing *Escherichia coli*. *Clinic. Microbiol. Rev.* 2: 15-38.
- KAUFFMANN, F. 1954. *Enterobacteriaceae. Collected Studies on Salmonella, Arizona, and Escherichia (including Alcalescent-Dispar and Bethesda-Ballerup), Klebsiella, Hafnia, Shigella, Proteus and Providencia*. Copenhagen, Ejnar Munksgaard Publisher.
- KONOWALCHUK, J., J. I. SPEIR, and S. STAVRIC. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18:775-779.

- KUSMIYATI dan SUPAR. 1998. *Escherichia coli* verotoksigenik dari anak sapi perah penderita diare. Prosiding Hasil-hasil Penelitian Veteriner. Balai Penelitian Veteriner, Bogor. 103-108.
- O'BRIEN, A. D. and G. D. LAVECK. 1983. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* I-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40: 675-683.
- O'BRIEN, A. D. and D. H. HOLMES. 1987. Shiga and shiga-like toxin. *Microbiol. Rev.* 51: 206-220.
- ORSKOV, I., F. ORSKOV, W. J. SOJKA, and M. LEACH. 1961. Simultaneous occurrence of *Escherichia coli* B and L antigen in strains from disease of swine. *Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect. B* 53:404-422.
- ORSKOV, I., F. ORSKOV, H. W. SMITH, and W. J. SOJKA. 1975. Establishment of K99 thermolabile transmissible *Escherichia coli* K antigen previously called Kco possessed by calf and lamb enteric pathogen strains. *Act. Path. Microbiol. Scand. B* 83: 31-36.
- SUPAR and R. G. HIRST. 1991. Development of a whole vaccine from *Escherichia coli* bearing K88, K99, F41 and 987P fimbrial antigens: Studies on the immunogenicity on the fimbrial antigens. *Penyakit Hewan XXIII*(41): 1-9.
- TIZARD, I. 1982. *An Introduction to the Veterinary Immunology*. Second Ed. W. B. Saunder Company, Philadelphia, London. 154-177.