

VARIASI GENETIK DAN FAKTOR RISIKO GEN FLAGELLIN *SALMONELLA TYPHI* PADA DEMAM TIFOID AKUT DAN KARIER DI SULAWESI TENGAH

M.Sabir¹, Asri Ahram Efendi², Rahman³, M.Hatta⁴

¹Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Tadulako, Palu

²Bagian Ilmu Bedah, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Tadulako, Palu

³Bagian Kesehatan Lingkungan, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Muslim Indonesia, Makassar

⁴Laboratorium Imunologi dan Biologi Molekuler, Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar

Abstract

The study aims to identify the profile of flagellin gene of Salmonella enterica serovar Typhi among carrier and acute typhoid fever (ATF) in Central Sulawesi; to analyze the comparison of flagellin gene of Salmonella enterica serovar Typhi between carriers and ATF and also to evaluate the size of risk of the profile of the flagellin gene on the occurrence of carriers.

*The study was carried out in Molecular Biology and Immunology Laboratory of Microbiology Department, Faculty of Medicine, Hasanuddin University. Using the explorative-analytical method, the result of screening with PCR Nested of 847 faeces samples shows 40 (4.7%) are *S.typhi* positive and 40 (47.6%) out 83 blood samples are also similar. The blood samples of ATF were obtained from community health centres and hospitals and faeces samples of carriers were obtained through house visit based on the medical records in the community health centres and hospitals. The data were analyzed with cross-statistical tabulation followed by chi-square and odd ratio (OR) with a rate of significance ($p < 0.05$).*

*Risk for patients who are infected with *Hi-d*, *z66Ind* and *Hdz66Ind* variants *S.typhi* to become carriers were 1.7 (OR 1.750), 1.6 (OR 1.658) and 1.3 (OR 1.373) times, respectively compared to ATF. Early alternative detection to prediction of carriers can be done through the tracking of flagellin gene (*Hi-d*, *z66Ind* and *Hdz66Ind*).*

Key words: Gene, Typhoid, carrier

Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi profil gen flagelin *Salmonella enterica* serovar Typhi pada Karier dan Demam Tifoid Akut (DTA), menganalisis perbandingan profil gen flagelin *Salmonella enterica* serovar Typhi pada Karier dan DTA, dan menilai seberapa besar risiko profil gen flagelin *S.typhi* terhadap Karier di Sulawesi Tengah.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah Eksploratif analitik. Hasil skrining dengan metode Nested PCR dari 847 sampel feses diperoleh 40 (4.7%) positif *S.typhi* dan dari 83 sampel darah suspek Demam Tifoid diperoleh 40 (47.6%) positif *S.typhi*. Sampel darah suspek DTA diperoleh dari rumah sakit dan Puskesmas dan sampel feses Karier diambil dari kunjungan rumah berdasarkan data *medical record* rumah sakit dan Puskesmas. Data dianalisis dengan menggunakan analisis statistik melalui tabulasi silang yang kemudian dilanjutkan dengan Uji kai-kuadrat dan *odds ratio* (OR) dengan tingkat kemaknaan ($p < 0.05$).

Pasien yang terinfeksi dengan varian *Hi-d*, *z66Ind* dan *Hdz66Ind* *S.typhi* ditemukan berisiko pada Karier 1,7 kali (OR 1.750), 1,6 kali (OR 1.658) dan 1,3 (OR 1.373) kali lebih besar dibandingkan risiko pada DTA. Deteksi alternatif dini terhadap Karier dapat dilakukan dengan pelacakan gen flagelin (*Hi-d*, *z66Ind* dan *Hdz66Ind*).

Kata Kunci : Gen, Demam Tifoid, karier

PENDAHULUAN

Salmonella enterica serovar Typhi (*S.typhi*) merupakan bakteri penyebab Demam Tifoid (DT), dan masih menjadi masalah serius di negara maju maupun negara yang berkembang (Crump and Mintz.,2010). Menurut estimasi WHO,(2003) terdapat 17 juta kasus DT per tahun diseluruh dunia dengan kematian 600.000 jiwa.

Di negara berkembang, kasus DT dilaporkan sebagai penyakit endemis dimana 95% merupakan kasus rawat jalan sehingga insidensi yang sebenarnya adalah 15-25 kali lebih besar dari laporan rawat inap di rumah sakit (Zhou and Pollard,2010), dan 5% diantaranya berakhir dengan kematian (WHO, 2003). Sekitar 70% dari seluruh kematian menimpa penderita DT di Asia (Maskalyk,2003).

Penanganan dan pengobatan DT menjadi sulit karena *S.typhi* memiliki plasmid dengan berbagai variasi gen yang dapat berpindah dengan cara konjugasi seperti adanya gen virulensi dan resistensi antibiotika (Morita *et al*,2010.,Crump and Mintz.,2010).

Di Indonesia, insiden demam tifoid masih tinggi bahkan menempati tertinggi ketiga di antara negara-negara dunia. Kasus ini tersebar secara merata di seluruh propinsi dengan insidensi di daerah pedesaan 358/100.000 penduduk/tahun dan di daerah perkotaan 760/100.000 penduduk/tahun. Umur penderita yang terjangkit penyakit ini di Indonesia dilaporkan antara 3 - 19 tahun pada 91% kasus. (WHO, 2003).

Di Sulawesi Tengah Jumlah penderita DT memperlihatkan peningkatan, pada tahun 2000 terdapat 219/100.000 penduduk menjadi 307/100.000 penduduk tahun 2005 dengan jumlah kematian sekitar 2,9-9,4% pertahun. Berdasarkan data profil Dinas Kesehatan Kota palu, DT termasuk 10 besar penyakit rawat inap memperlihatkan peningkatan, dari 303 kasus tahun 2007 menjadi 344 kasus tahun 2008 (Profil Dinkes Kota Palu,2008).

Salah satu faktor penyebab DT bersifat akut bahkan menyebabkan kematian adalah sifat virulensi flagella. Flagella merupakan alat pergerakan bakteri *S.typhi* yang tersusun dari protein yang disebut flagellin. Flagella meningkatkan kemampuan motilitas dan daya invasif dari *S.typhi*, yang dapat menyebabkan terjadinya perforasi pada usus (jaringan limfoid) (Baker *et al*,2007).

Pada flagella bakteri *S.typhi* terdapat gen FliC atau fase 1 yang mengkode antigen *Hi-d*. gen flagelin *Hi-d* ini merupakan gen potensial daya invasif terhadap inang dan dimiliki oleh *S.typhi* pada penderita demam tifoid diseluruh dunia (McQuiston,2004). Penelitian lanjutan oleh Patrick *et al*,(2001) dan Susanna *et al*,(2005) dari *S.typhi* menemukan serotipe flagella yang berbeda yakni *HI-j* dan sekitar 10-50% hanya ditemukan pada isolat *S.typhi* asal Indonesia dan belum ada data yang menunjukkan eksistensinya di negara lain.

Ternyata selain antigen *Hi-d* dan *Hi-j* di Indonesia juga ditemukan antigen yang berbeda yakni z66 (Susanna *et al*,2005). Hasil penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa antigen z66 di kode pada plasmid linear yang disebut

pBBBS1 sedangkan gen *fliC* yang mengkode antigen *Hi-d* dan *Hi-j* terletak pada kromosom (Baker *et al.*, 2007 & 2008; Xu, *et al.*, 2008). Hatta *et al.*, (2011) lebih lanjut menemukan antigen *z66Ind S.typhi* dan diduga berhubungan erat dengan tingginya risiko klinis DT yang berat.

Masih belum jelasnya profil gen flagelin (*Hi-d*, *Hi-j*, *z66* dan *z66Ind*) *S.typhi* pada Karier dalam menimbulkan manifestasi klinis inilah yang mendasari peneliti untuk mengidentifikasi perbedaan profil gen flagelin *S.typhi* pada Karier dengan profil gen flagelin *S.typhi* pada DT.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksploratif-analitik dengan pendekatan *Cross sectional study* untuk mengidentifikasi dan menilai besar risiko satu atau lebih dari profil genetic gen flagelin *S.typhi* pada Karier dan DTA di Kota Palu Sulawesi Tengah.

Pengambilan sampel dilaksanakan pada bulan Agustus 2012 s/d Desember 2013. Sampel feses Karier asimptomatik diekstraksi untuk memperoleh genom DNA, kemudian dilakukan pemeriksaan *Nested PCR* untuk mengidentifikasi profil gen flagelin *S.typhi* dengan menggunakan 2 pasang primer (ST1/ST2 dan ST3/ST4) dengan elektroforesis akhirnya akan diperoleh fragmen DNA gen flagelin 343 bp, Hasil pemeriksaan gen flagelin dengan *Nested PCR* selanjutnya di lakukan pemeriksaan multipleks PCR untuk melihat variasi gen flagelin (*Hi-d*, *Hi-j*, *z66*) dan *aroC* sebagai kontrol positif. Hasil amplifikasi Multipleks PCR di

elektroforesis untuk melihat profil genetik bakteri *S.typhi* dari sampel feses. Hasil elektroforesis akan diperoleh fragmen DNA untuk *Hi-d* (1521 bp), *Hi-j* (1273 bp) dan *z66* (1500 bp). Dan untuk *z66Ind* dilakukan PCR tersendiri, selanjutnya dilakukan elektroforesis untuk mendapatkan fragmen DNA dengan 579 bp. Proses ekstraksi genom DNA, pemeriksaan *Nested PCR*, *Multipleks* dan *Unipleks PCR* dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar.

Sampel dan besar sampel penelitian sampel dalam penelitian ini adalah *S.typhi* dari sampel Feses penderita Karier asimptomatik yang positif atau negatif mengandung *S.typhi* dengan pemeriksaan *Nested PCR*. Besar sampel dalam penelitian ini sebanyak 50 sampel positif *S.typhi* Yang di isolasi dari sampel feses karier asimptomatik dan diskriminasi dengan menggunakan metode *Nested PCR*.

Isolasi DNA metode Boom (Hatta and Smits, 2007)

1. Ekstraksi DNA sampel feses

100 µl sampel dicampurkan dengan 900 µl larutan buffer lisis L6 pada *tube* yang mempunyai penutup berupa sekrup, kemudian campuran ini disentrifus pada 12.000 rpm selama 10 menit. Sedimen sampel yang telah dipekatkan ini dihomogenkan selama 30 menit. Sebelum ditambahkan suspensi diatom, campuran *buffer* L6 yang telah mengandung DNA hasil ekstraksi disentrifus selama 2-3

menit pada kecepatan 12.000 rpm, dengan tujuan agar DNA hasil ekstraksi mengendap di bagian dasar tabung. Suspensi diatom 20 µl ditambahkan ke dalam tabung, suspensi diatom harus selalu *divortex* dan diaduk dengan menggunakan *gyratory shaker*, kecepatan 100 rpm selama 10 menit. Campuran diatom dan buffer L6 *divortex* kembali menggunakan sentrifus dengan mikrosentrifus *eppendorf* pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik. Supernatan yang terbentuk dari setiap vial dipisahkan dengan menggunakan pengisap yang terbuat dari pipet Pasteur plastik tanpa balon udara dan dihubungkan dengan *vacuum pump*, untuk mencegah hilangnya diatom dalam suspensi tadi, sekitar 10 µl dari suspensi tersebut disisakan.

Supernatan dicuci sebanyak 2 (dua) kali dengan menggunakan 1 ml buffer pencuci L2. Buffer pencuci L2 ditambahkan sebanyak 1 ml, *divortex* dan disentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik, kemudian supernatan dibuang. Endapan dicuci kembali dengan 1 ml etanol 70% sebanyak 2 (dua) kali, lalu *divortex* dan disentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik, supernatannya dibuang, endapan dicuci lagi dengan 1 ml aseton, *divortex* dan disentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik, kemudian supernatannya kembali dibuang. Aseton yang tersisa dalam endapan (sedimen) diuapkan dengan membuka penutup vial dan dipanaskan dengan oven pada suhu 50-55°C selama kurang lebih 10 menit.

Setelah sedimen mengering, TE buffer elusi ditambahkan sebanyak 60 µl, kemudian *divortex* secara merata sehingga sedimen dan suspensi tersebut dapat larut.

Kemudian vial diinkubasi dalam oven pada suhu 56°C selama 10 menit. Kemudian, campuran tersebut kemudian disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Supernatan diambil secara hati-hati sebanyak 40-50 µl dari supernatan dan dimasukkan ke dalam tabung vial baru. Hasil ekstraksi dapat disimpan pada suhu -20°C atau suhu -80°C.

2. Deteksi *S.typhi* dengan *Nested PCR*

Setelah diperoleh DNA hasil ekstraksi, disiapkan campuran reaksi PCR sebanyak 52X dan setiap campuran reaksi 1X terdiri dari : 28,5 µl dH₂O, 5 µl buffer PCR 10X, 2 µl dNTPs, Primer ST1 dan ST2 masing-masing 1 µl dan 0,5 µl Taq Polimerase. Campuran reaksi ini dimasukkan ke dalam tabung 0,5 ml dan ditambahkan 2,5 µl ekstrak DNA hasil ekstraksi. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR sebanyak 29 siklus. Denaturasi awal dilakukan selama 3 menit pada suhu 94°C, kemudian setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 57°C selama 1 menit 15 detik dan polimerisasi pada suhu 72°C selama 3 menit. Pada terminasi atau elongasi akhir dan pendinginan pada suhu pada suhu 16°C.

Sebanyak 5 µl produk amplifikasi pertama kemudian ditambahkan dengan campuran reaksi PCR kedua. Campuran reaksi kedua ini hampir sama dengan campuran reaksi PCR pertama, hanya saja primer untuk amplifikasi kedua ini adalah ST3 dan ST4.

Amplifikasi kedua dilakukan dengan menggunakan mesin PCR sebanyak 29 siklus. Denaturasi awal dilakukan selama 3 menit pada suhu 94°C kemudian setiap

siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, annealing pada suhu 68°C selama 1 menit 15 detik dan polimerisasi pada suhu 72°C selama 3 menit. Pada terminasi atau elongasi akhir dan pendinginan pada suhu 16°C.

PCR Mix1: Di dalamnya terdapat pasangan primer oligonukleotida pertama yaitu: 25 pmol ST1 (5'-ACT GCT AAA ACC ACT ACT-3') dan 2,200 µmol ST2 (5'-TTA ACG CAG TAA AGA GAG-3') yang digunakan pada siklus pertama dari PCR dapat mengamplifikasi fragmen 458 base pairs (bp) dari gen *flagellin S. typhi*.

PCR Mix2: Didalamnya terdapat pasangan primer oligonukleotida kedua yaitu: ST3 (5'-AGA TGG TAC TGG CGT TGC TC-3') dan ST4 (5'-TGG AGA CTT CGG TCG CGT AG-3') yang digunakan untuk mengamplifikasi produk dari PCR pertama dan produk akhir dirancang untuk mengamplifikasi fragmen 343 bp dari gen *flagellin S. typhi*. PCR tahap pertama dengan primer PCR Mix 1 mempunyai sensitivitas yang sangat tinggi sehingga dapat menimbulkan hasil yang positif palsu. Untuk menghindari hasil positif palsu tersebut, maka dapat dilakukan PCR tahap kedua dengan menggunakan primer PCR Mix 2 yang juga spesifik untuk *S. typhi* dan *S. Muenchen*. Elektroforesis untuk dapat fragmen pita DNA 343 bp *S.typhi* positif. Jika Positif hasil ekstraksi DNA selanjutnya akan digunakan untuk multipleks PCR. Sebagai positif kontrol adalah *S.typhi* strain Ty2 (Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, CB10 1SA, Cambridge, Inggris) dan negatif kontrol adalah aquades.

3. Deteksi gen *fliC* dan *z66* dengan multipleks PCR

Bahan-bahan yang siap untuk di PCR dimasukkan ke dalam tabung eppendorf Go PCR Beads, setiap tabung berisi PCR mix dengan komposisi 2,5 µl 10x buffer (10 mM Tris HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% gelatin), 1 µl primer *forward* (*fliC_F* 5'-TTAACGCAGTAAAGAGAG-3' 1 µl *fliC_R* 3'-ATGGCACAAGTCATTAATAC-5' produk 1521 (Hi-d) dan 1273 bp (Hi-j), 1 µl primer *forward* *z66_F* 5'-ATGGCACAAGTCATCAATAC-3' dan 1 µl *z66_R* 3'-TTAACGCAGCAGAGACAGTAC-5' produk 1500 bp; 1 µl primer *forward* kontrol positif menggunakan gen *aroC* : *aroCFor* CCTGGCACCTCGCGCTATAC dan 1 µl *aroCRev* CCACACACGGATCGTGGCG produk 800 bp. Posisi primer pada kromosom *fliC_F* 2011173 dan *fliC_R* 2012674 dan *aroC_F* 2450480 dan *aroC_R* 2449674., 0,5 µl *Taq* DNA polimerase, 2,5 µl dNTP, aquades 11 µl dan 2,5 µl DNA sampel.

Amplifikasi pada mesin PCR dilakukan sebanyak 30 siklus, dimana 1 siklus terdiri dari denaturasi selama 1 menit pada suhu 94°C, *annealing* selama 1 menit pada suhu 60°C dan *extension* selama 1 menit pada suhu 72°C. Setelah selesai 30 siklus, kemudian diikuti dengan pemanasan pada suhu 72°C selama 7 menit. Hasil amplifikasi dianalisis dengan menggunakan elektroforesis dalam gel agarose. Sebagai positif kontrol adalah *S.typhi* strain Ty2 (Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome

Campus, Hinxton, CB10 1SA, Cambridge, Inggris) dan negatif kontrol adalah aquades.

4. Deteksi gen *z66Ind* dengan *unipleks PCR*

Bahan-bahan yang siap untuk di PCR dimasukkan ke dalam tabung eppendorf Go PCR Beads, setiap tabung berisi PCR mix dengan komposisi 2,5 µl 10x buffer (10 mM Tris HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% gelatin), 1 µl primer *forward* (F 5'-ATG TCG GAA ATC AAC CGT ATC T-3' dan 1 µl primer *reverse* *z66ind_R* 3'-CAG GCC GTC AAC CTG AGA C-5' produk 597 bp), 0,5 µl *Taq* DNA polimerase, 2,5 µl dNTP, aquades 15 µl dan 2,5 µl DNA sampel. Sebagai positif kontrol *S.typhi* strain *z66Ind* dan negatif kontrol adalah aquades.

5. Elektroforesis

Setelah amplifikasi, 10 µl hasil amplifikasi PCR dan 1 µl *loading buffer* dicampur dan dimasukkan ke dalam cetakan gel agarose 2% yang sudah diberi *Ethidium Bromide*. Agar gel direndam pada wadah yang berisi buffer TBE. Selanjutnya elektroforesis dijalankan selama 1 jam dengan tegangan konstan 158 volt. Setelah proses elektroforesis selesai, gel diangkat untuk mengamati di bawah sinar UV. Hasil positif jika

Hasil skrining deteksi keberadaan *S.typhi* dengan menggunakan *nested PCR* dengan dua set primer (ST1/ST2) dan (ST3/ST4) dari sampel feses dan darah tersaji pada gambar 1.

terdapat pita DNA dan negatif jika tidak terdapat pita DNA pada gel.

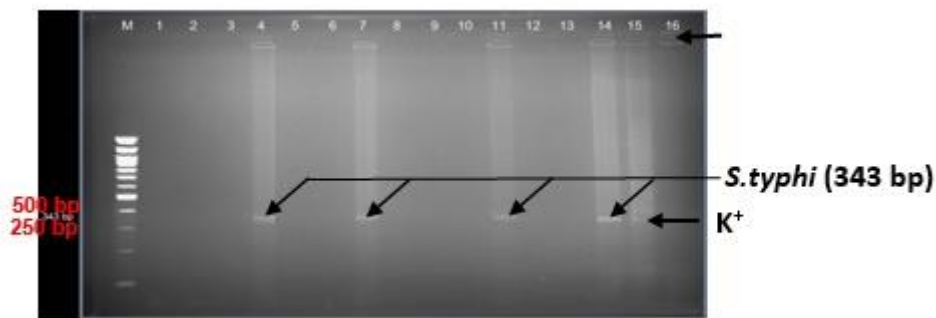
Analisis Statistik

Analisis data dari profil genetik bakteri *S.typhi* dari penderita *Karier asimptomatik* dalam bentuk univariat dan bivariat yang disertai dengan penjelasan dan besar risiko profil genetik bakteri *S.typhi* pada *Karier asimptomatik* dengan menggunakan Uji *Chi-Kuadrat* dan Uji *mutlak Fisher* dengan menggunakan tingkat kemaknaan $p < 0,05$ dan besarnya risiko dengan *odds ratio* (OR;95%;CI).

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perbandingan profil gen flagelin *S.typhi* pada *Karier asimptomatik* dan besar risiko variasi genetik dari bakteri *S.typhi* terhadap kejadian *Karier asimptomatik* di Kota Palu Sulawesi Tengah. Penelitian telah dilaksanakan dari bulan Agustus 2012 sampai bulan Desember 2013.

Jumlah sampel feses yang diskriming dengan menggunakan metode *nested PCR* dari 847 sampel feses diperoleh hasil 40 (4.7%) sampel positif *S.typhi* sedangkan sampel darah yang diskriming dengan menggunakan metode *nested PCR* dari suspek Demam Tifoid sebanyak 83 sampel diperoleh hasil 40 (47.6%) positif *S.typhi*.



Gambar 1. Elektroforesis produk nested PCR positif *S.typhi*.

- Slot 1 = Marker
- Slot 5 = sampel no.4 (*S.typhi* +)
- Slot 8 = sampel no.7 (*S.typhi* +)
- Slot 12 = sampel no.11 (*S.typhi* +)
- Slot 15 = sampel no.14 (*S.typhi* +)
- Slot 16 = positif kontrol (*S.typhi* strain Ty2)
- Slot 17 = Negatif kontrol

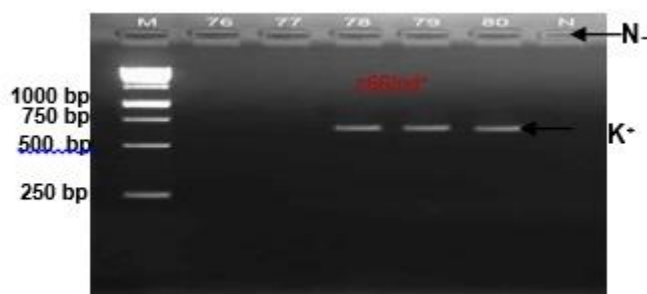
Hasil skrining dengan menggunakan nested PCR dari keseluruhan sampel (feses dan darah) diperoleh masing-masing 40 sampel positif *S.typhi*. selanjutnya masing-masing gen flagelin *fliC* dan *z66* dideteksi dengan multipleks PCR dan gen flagelin *z66Ind* dideteksi dengan unipleks PCR gen *z66Ind*. Hasil deteksi keberadaan gen flagelin *S.typhi* dengan amplifikasi gen *fliC* dan *z66* menggunakan multipleks PCR tersaji pada gambar 2.



Gambar 2. elektroforesis produk multipleks PCR gen *fliC* dan *z66*

- Slot 1 = Marker
- Slot 2 = sampel no.1 (Hi-d 1521 bp)
- Slot 3-8,11,14-16 = sampel no.2-7,10,13-15 (Hi-j⁺ (1273 bp) & z66⁺ (1500 bp)
- Slot 9-10 = sampel no.8-9 (Hi-j⁺ (1273 bp)
- Slot 12 = sampel no.11 (z66⁺ (1500 bp) & Hi-j⁺ (1273 bp)
- Slot 13 = sampel no.12 (Hi-j⁺)
- Slot 2-16 = Kontrol positif aroC (800 bp)
- Slot 17 = kontrol negatif

Untuk mendeteksi keberadaan gen flagelin *z66Ind* menggunakan unipleks PCR mengingat proses amplifikasi gen flagelin *z66Ind* ini berbeda dengan gen flagelin *fliC* dan *z66*, oleh karena itu proses amplifikasi gen flagelin *z66Ind* ini dilakukan tersendiri. Hasil deteksi keberadaan gen flagelin *z66Ind* dengan menggunakan primer spesifik pada sampel tersaji pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil elektroforesis produk PCR gen flagelin *z66Ind S.typhi*

- Slot 1 = Marker
- Slot 2,3 = sampel no. 76,77
- Slot 4-5 = sampel no 78-79 (*z66Ind*⁺)
- Slot 6 = Kontrol positif (*S.typhi* strain *z66Ind*)
- Slot 7 = kontrol negatif (aquades)

Dari keseluruhan hasil pemeriksaan PCR sampel, selanjutnya dibuat tabel karakteristik dan gejala klinis yang diperoleh dalam pengambilan data dan hasil skrining dengan Nested PCR dalam penelitian ini disajikan dalam tabel 1. Deteksi keberadaan gen flagelin *S.typhi* dari 40 sampel feses dan 40 sampel darah dengan metode multipleks PCR dengan primer specific *fliC* (*Hi-d*, *Hi-j*) dan *z66* dan metode unipleks PCR dengan primer spesifik *z66Ind* diperoleh profil gen flagelin *S.typhi* di Sulawesi Tengah yang tersaji dalam tabel 1.

Tabel 1. Profil variasi gen flagelin *S.typhi* pada Karier dan Demam Tifoid Akut di Sulawesi Tengah Tahun 2013

Profil Gen Flagelin	Karier (Feses)		DTA (darah)		OR;95%,CI
	n=40	%	n=40	%	
<i>flicHi-d</i>	35	87.5	29	72.5	1.750 (0.818-3.743)
<i>flicHi-j</i>	5	12.5	12	30	0.529 (0.245-1.142)
<i>z66</i>	19	47.5	28	70	0.635 (0.412-0.979)
<i>z66Ind</i>	21	52.5	11	27.5	1.658 (1.078-2.549)
<i>Hdz66</i>	16	40	24	60	0.667 (0.422-1.052)
<i>Hjz66</i>	2	5	2	5	1.000 (0.366-2.733)
<i>Hdz66Ind</i>	17	42.5	11	27.5	1.373 (0.896-2.103)

Berdasarkan tabel 1. Dari 64 sampel positif *S.typhi*, pada Karier ditemukan gen flagelin *flicHi-d*, *z66Ind* dan *Hdz66Ind*

yang positif masing-masing 35 (87.5%), 21(52.5%) dan 17 (42.5%) dibandingkan pada DTA yang positif 29 (72.5%), 11

(27.5%) dan 11 (27.5%). Hal ini menunjukkan bahwa gen flagelin *z66Ind* ditemukan berisiko 1.6 kali lebih besar pada karier dibandingkan risiko pada DTA ($p=0.022$; $OR\ 1.658\ (1.078-2.549)$), sedangkan *flicHid* dan *Hdz66Ind* juga ditemukan berisiko 1.7 dan 1.3 kali lebih besar pada Karier dibandingkan risiko pada DTA ($p=0.094$; $OR\ 1.750\ (0.818-3.743)$) dan ($p=0.160$; $OR\ 1.373\ (0.896-2.103)$).

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbandingan profil gen flagellin *S.typhi* dari sampel feses Karier dengan profil gen flagelin *S.typhi* sampel darah DTA dan besarnya risiko gen flagelin terhadap terjadinya Karier di Sulawesi Tengah. Sebagai langkah awal dalam penelitian ini dilakukan pemeriksaan gen flagelin *S.typhi* pada sampel darah dan feses dengan menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) *Nested PCR*.

Metode diagnostik dibidang biologi molekuler telah dikembangkan untuk melacak adanya urutan DNA yang spesifik dari mikroorganisme tertentu, Metode ini dipakai sebagai sarana diagnostik skrining pada penderita dengan infeksi mikroba (Hatta and Smits, 2007). Lebih lanjut bahwa metode tersebut mempunyai sensitifitas dan spesifitas yang tinggi dan dapat digunakan pada spesimen darah, feses dan urin.

Hasil penelitian oleh Haque, *et al* (2001), mendapatkan spesifisitas PCR sebesar 100% dengan sensitifitas yang 10 kali lebih baik daripada penelitian sebelumnya yang mampu mendeteksi 1 - 5 bakteri/ml darah. Pada penelitian lain, dari 138 pasien suspek demam tifoid diperoleh sensitifitas dari kultur darah sebesar 61,8%, sedangkan oleh Hatta and smits,(2007) dengan *nested PCR* dari darah, urine, dan feses masing-masing

sebesar 84,5%, 69,3% dan 46,9%, serta uji Widal sebesar 39,0%.

Kemampuan motilitas *S.typhi* ditentukan oleh adanya gen flagelin pada flagella yang berkaitan dengan motilitas *S.typhi* dalam darah. Variasi gen flagelin yang ditemukan memiliki kemampuan berbeda-beda dalam menentukan apakah individu tersebut akan menderita Karier atau Demam Tifoid.

S.typhi dengan varian gen flagelin *Hi-j* dan *z66* memiliki kemampuan yang terbatas dan hanya beredar dalam darah, dengan terapi antibiotik, status gizi yang baik, respon imunitas yang baik bakteri varian jenis ini akan mengalami destruksi dan kematian. Sebaliknya *S.typhi* dengan jenis varian antigen *flicHi-d* dan *z66Ind* atau kombinasi *Hdz66Ind* memiliki motilitas lebih kuat dan daya invasi untuk menembus kandung empedu dan dapat tersimpan dalam kurun waktu yang lama (lebih dari 1 tahun).

Deteksi gen flagellin yang ditandai dengan terbentuknya fragmen pada 1521 bp untuk keberadaan gen *Hi-d*, 1500 bp untuk gen *z66*, 1273 bp untuk gen *Hi-j* dan 597 untuk gen *z66Ind*. Hasil amplifikasi produk multipleks PCR gen *fliC* dan *z66* diperoleh 64 (80%) sampel yang memiliki gen *Hi-d*, 17 (21,25%) gen *Hi-j*, 47 (58.75%) gen *Z66* dan 32 (40%) gen *z66Ind*. Ditemukannya keempat variasi antigen pada penelitian ini menunjukkan adanya biodiversitas gen flagelin di Sulawesi Tengah, khususnya Kota Palu.

Menurut Baker *et al* (2007), ditemukannya variasi flagella di Indonesia terkait dengan dinamika populasi infeksi *S.typhi*. Karena walaupun *Hi-j* telah diisolasi di tempat lain akan tetapi frekwensinya tidak sebanyak dengan yang ditemukan di Indonesia.

Lebih lanjut dijelaskan oleh Baker *et.al* (2007 & 2008), bahwa kemungkinan ada

seleksi kekebalan signifikan yang sedang berlangsung dalam populasi *S. Typhi* dan diharapkan untuk tetap bertahan terus menerus. Hasil studi epidemiologi molekuler menunjukkan adanya diversitas genetik yang bermakna diantara strain-strain *S. typhi*. Strain *S. typhi* yang menyebabkan demam tifoid di Indonesia memiliki keunikan dibanding dengan strain-strain yang ditemukan di negara-negara Asia Tenggara.

Menurut Leveque & Mounolou (2003), adanya variasi dalam gen berasal dari mutasi bahan genetika, migrasi antar populasi (aliran gen), dan perubahan susunan gen melalui reproduksi seksual. Variasi juga dapat terjadi dari tukar ganti gen antara spesies yang berbeda melalui transfer gen horizontal pada bakteri. Walaupun terdapat variasi yang terjadi secara terus menerus melalui proses-proses ini, kebanyakan genom spesies adalah identik pada seluruh individu spesies tersebut. Namun, bahkan perubahan kecil pada genotipe dapat mengakibatkan perubahan pada fenotipenya.

Menurut Baker *et al*, (2008), pada dasarnya antigen Hi-j sangat homolog dengan Hi-d. Kecuali delesi 261 bp pada determinan antigen bagian sentral gen fliC dari strain Hi-j yang bertanggung jawab terhadap variasi antigen flagella. Delesi ini terjadi akibat rekombinasi homolog intragenik yang melibatkan pengulangan 11 bp. Ditambahkan oleh Killer & Grimont (1993), rekombinasi intragenik pada bagian sentral gen Hi-d, merusak spesifitas d dan membentuk spesifitas baru dalam fragmen flagella. Penelitian lanjutan yang dilakukan pada beberapa isolat dari Indonesia menemukan adanya antigen khusus atau tambahan yang kemudian dikenal dengan nama antigen z66 (Baker *et al*, 2008; Zu, *et al.*, 2009).

Menurut (Baker *et al*, 2008 & 2009), antigen z66 dikode oleh plasmid linear

bernama pBSSB1 yang merupakan DNA ekstrakromosomal. Hal ini berbeda dengan Hi-d dan Hi-j yang dikode pada kromosom. Penelitian yang dilakukan di beberapa negara menunjukkan tidak ditemukannya antigen z66 selain di Indonesia. Plasmid linear pBSSB1 merupakan plasmid linear pertama yang ditemukan pada bakteri yang tergolong dalam family Enterobacteriaceae. Plasmid jenis ini sering ditemukan pada *Streptomyces* dan *Borrelia*. Pada *S. typhi* jenis plasmid yang biasa ditemukan adalah kelompok IncH1 yang mengkode resistensi terhadap antibiotik (Susanna, *et al.*, 2005). Walaupun pengaturan ekspresi z66 belum banyak dijelaskan akan tetapi menurut Xu, *et al.*,(2008) urutan promotor z66 berbeda dengan fliC maupun fljB strain biphasic lainnya.

Struktur genom wilayah yang mengandung gen flagellin z66 mirip dengan operon fljBA dari *Salmonella enterica* tipe biphasic. Sebuah gen menyerupai fljA ditemukan pada gen flagellin baru ini serta terminator rho-independent terletak antara gen flagellin baru dengan gen seperti fljA akan tetapi gen Hin tidak ditemukan pada plasmid ini. Olehnya itu beberapa ahli menganggap strain z66 merupakan tipe antigen khusus (Zou, *et al.*,2010).

Hasil penelitian Zu, *et al* (2008) menunjukkan adanya perbedaan ekspresi z66 dibandingkan fliC dibawah tekanan osmotik, tekanan asam empedu dan tekanan oksidatif. *S. typhi* yang memiliki antigen z66 menunjukkan ekspresi 10 kali lebih tinggi dari pada fliC pada kondisi osmotik yang rendah dan sedang.

Menurut McQuiston, *et al*, (2004), selain gen flagellin fliC dan/atau fliB yang dimiliki oleh *Salmonella enterica* pada umumnya, beberapa diantaranya mengekspresikan antigen flagella tambahan yang bersifat tidak stabil, sedangkan antigen flagella lainnya bersifat

khusus atau dianggap merupakan variasi dari tipe-tipe antigen flagella pada umumnya.

Meskipun telah dilakukan survei yang intensif pada koleksi isolat *S. typhi* diseluruh dunia, data menunjukkan bahwa z66 hanya pernah terisolasi dari penderita demam tifoid Indonesia atau dari wisatawan yang kembali dari Indonesia.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa biodiversitas genetik juga terjadi pada gen flagellin di Sulawesi Tengah dengan ditemukannya empat variasi antigen yakni Hi-d, Hi-j, z66 dan z66Ind yang tidak lazim ditemukan di negara lain.

Variasi keberadaan antigen flagellin Hi-d, Hi-j, z66 dan z66Ind di Sulawesi Tengah khususnya di Kota Palu melengkapi informasi sebelumnya yang juga telah dilakukan di beberapa kota besar di Indonesia diantaranya Jakarta, Yogyakarta, Palembang, Surabaya dan Makassar yang juga menunjukkan adanya variasi antigen flagellin tersebut meskipun yang ditemukan di Kota Palu terdiri atas empat variasi antigen.

Penyebaran variasi antigen *S.typhi* ini sangat erat hubungannya dengan keberadaan sumber penularan berasal terutama dari feses dan urin yang mengandung *S. typhi*. Penyebarannya dapat berupa kontak langsung dengan ekskreta (sekresi respirasi, muntahan, maupun cairan tubuh) dari penderita tifoid (fase aktif, rekonvalesen, relaps, Karier) dan secara tidak langsung yaitu melalui air, air susu, air es yang telah terkontaminasi atau dilayani oleh orang yang membawa kuman, baik penderita aktif maupun karier (Syahrurahman, *et al.*, 2005).

Makanan dan minuman yang terkontaminasi merupakan sumber transmisi *S.typhi*. Karier pada manusia adalah sumber infeksi. *S.typhi* biasanya berada di air, es, debu, sampah kering, dan

bila masuk ke dalam vehicle yang cocok misalnya daging, kerang dan sebagainya. *S. typhi* akan berkembang biak mencapai dosis infeksius. Penularan penyakit demam tifoid oleh basil *S.typhi* ke manusia melalui makanan dan minuman yang telah tercemar oleh feses dan atau urin. Ada dua sumber penularan yakni penderita demam tifoid baik yang sedang menderita sakit maupun dalam masa penyembuhan.

DT dapat dialami semua orang dan tidak ada perbedaan yang nyata antara insiden pria dan perempuan. Insiden DT dengan usia 12-30 tahun 70-80%, usia 31-40 tahun 10-20%, usia > 40 5-10%. Penelitian yang dilakukan oleh Punjabi, (2004), mengatakan bahwa kebiasaan jajan diluar berisiko terkena DT 3.6 kali lebih besar dibandingkan dengan kebiasaan tidak jajan diluar (OR=3.65) dan kebiasaan tidak mencuci tangan sebelum makan berisiko terkena DT 2.7 kali lebih besar dibandingkan dengan kebiasaan mencuci tangan sebelum makan (OR=2.75).

Kota Palu merupakan daerah dengan jumlah penduduk yang tinggi dibandingkan daerah lainnya di Sulawesi Tengah. Disamping itu posisi kota Palu sebagai ibukota propinsi otomatis menjadi pusat perekonomian dan pendidikan menyebabkan arus urbanisasi yang semakin meningkat. Bertambahnya penduduk dan munculnya pemukiman baru tidak diikuti oleh penataan kota dan sistem drainase yang baik dan hal ini menyebabkan menumpuknya sampah serta berkurangnya sumber air bersih.

Hal ini sejalan dengan yang dikemukakan oleh Punjabi,(2004) dan Nandagopal, *et al.*, (2010), bahwa meningkatnya kasus demam tifoid di perkotaan dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti meningkatnya arus urbanisasi, kepadatan dan penyebaran penduduk yang sangat cepat, sanitasi buruk dan kasus asimtomatik yang tidak terdeteksi.

Lebih lanjut oleh Punjabi,(2004) mengatakan bahwa hygiene perorangan yang kurang berisiko terkena DT 20.8 kali lebih besar dibandingkan dengan hygiene perorangan yang baik (OR=20.8). dan kualitas air minum yang tercemar berat dengan coliform berisiko terkena DT 6.4 kali lebih besar dibandingkan dengan kualitas air minum yang tidak tercemar berat dengan coliform (OR=6.4).

Ditambahkan oleh Baker *et al*,(2007), jumlah kasus DT di Indonesia merupakan salah satu yang tertinggi di dunia, dengan adanya variasi serta biodiversitas gen flagelin yang tinggi di Indonesia dibandingkan negara lain mungkin terkait dengan dinamika populasi pada *S.typhi*. Ada kemungkinan adanya seleksi kekebalan yang terjadi yang sedang berlangsung di dalam populasi *S.typhi*. Hal ini mungkin terkait akan potensi untuk bertahan terus menerus.

Variasi gen flagelin yang ditemukan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa ada proses adaptasi yang dilakukan oleh bakteri *S.typhi* baik DNA maupun plasmid. Perubahan yang terjadi pada DNA *S.typhi* sebagai bentuk adaptasi dalam populasi bakteri dalam mempertahankan diri secara bertahap dan terus menerus. Hal ini dijelaskan oleh Leveque & Mounolou, (2003), bahwa adaptasi makhluk hidup termasuk bakteri terhadap perubahan lingkungan merupakan respon terhadap seleksi alam untuk tetap bertahan. Adaptasi ini dapat berupa perilaku dan fisik. Fenomena ini disebut mikroevolusi dan akumulasi dari perubahan ini dalam jangka waktu yang panjang mengakibatkan adanya makroevolusi dan pada akhirnya menghasilkan spesies baru.

Penyebaran kuman *S.typhi* dari seorang pembawa kuman tergantung pada tingkat infeksi, keadaan hygiene perorangan dan lingkungan serta jenis pekerjaan, terutama apakah penderita menangani atau

menyediakan bahan makanan atau minuman (Hatta *et al*, 2002). Manifestasi klinik tergantung pada jumlah bakteri, virulensi dan imunitas tubuh. Faktor penyebab lainnya adalah tingkat kemiskinan dan kondisi lingkungan yang tidak bersih. Pada masa penyembuhan penderita umumnya masih mengandung *S.typhi* dalam kandung empedu dan ginjal. Sumber infeksi dari karier berasal dari kandung empedu dan ginjal (infeksi kronis, batu atau kelainan anatomi), terapi medika-mentosa yang gagal harus dilakukan operasi untuk menghilangkan batu atau memperbaiki kelainan anatominya.

Peran karier sebagai sumber penularan seharusnya menjadi perhatian dalam upaya penanggulangan penyakit DT dan variasi antigen flagelin yang ditemukan di beberapa daerah di Indonesia termasuk di kota palu Sulawesi Tengah menjadikan peluang dan tantangan dalam penanganan karier dalam upaya preventif dan eradikasi terjadinya Demam Tifoid.

KESIMPULAN

1. Profil gen flagelin yang ditemukan pada karier dan DTA memiliki variasi adalah Hi-d, Hi-j, z66, z66Ind, Hi-dz66, Hi-jz66, Hi-dz66Ind.
2. Profil gen flagelin pada Karier (gen z66Ind $p=0.022$) dan DTA (gen Hi-j $p=0.041$) ditemukan bermakna secara statistik (*Chi-Square* $p < 0.05$).
3. Gen Hi-d, z66Ind dan Hdz66Ind ditemukan berisiko pada Karier 1,7 kali (OR 1.750), 1,6 kali (OR 1.658) dan 1,3 (OR 1.373) kali lebih besar dibandingkan risiko pada DTA.

SARAN

1. Perlu penelitian lanjut untuk melihat hubungan variasi gen flagelin *S.typhi*, gen resistensi antibiotik dan riwayat penggunaan antibiotik yang adekuat dengan gejala klinis penyakit Demam Tifoid, termasuk kaitannya dengan penyakit batu empedu di Sulawesi Tengah.
2. Deteksi dini terhadap karier dapat dilakukan dengan melacak keberadaan gen flagelin (*Hi-d*, *z66Ind* dan *Hdz66Ind*) pada individu dengan riwayat DT.
3. Pada tingkat rumah tangga dengan salah satu anggota keluarga yang menjadi Karier diharapkan memotong kuku satu kali seminggu dan cuci tangan dengan antiseptik sebelum dan sesudah makan.

Keterbatasan penelitian

Dalam penelitian ini tidak dilakukan eksplorasi terhadap pelacakan gen resistensi antibiotik pada *S.typhi* dan riwayat penggunaan antibiotik secara adekuat dari subjek penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Baker, S., Jonathan, H, Kenneth E.S, Michael, Q, Goodhead, I, Kingsley,R.A, Parkhill,J, Bruce, S, and Daugan,G. 2007a. A Novel Linear Plasmid Mediates Flagellar Variation in *Salmonella typhi*. *PLoS Pathog*; 3(5): e59.
- Baker, S., Holt, K., Whitehead, S.,Goodhead, I., Perkins, T., Stocker, B., H, J., Dougan G. 2007b. A linear plasmid truncation induces

unidirectional flagellar phase change in H:z66 positive *Salmonella typhi*. *Mol Microbiol*. 6(5):1207-18.

- Baker, S., Holt, K., Vosse, E, V., Roumagnac, P., Whitehead, S., King, E., Ewels, P., Keniry,A., Weill, FS., Lightfoot, D., Dissel, J, T., Sanderson, K, E., Farrar, J., Achtman, M., Deloukas, P., and Dougan, G. 2008. High-Throughput Genotyping of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Allowing Geographical Assignment of Haplotypes and Pathotypes within an Urban District of Jakarta, Indonesia. *Journal Of Clinical Microbiology*, Vol. 46, No. 5:1741–1746.

- Crump J.A, and Mintz E.D 2010. Global trends in Typhoid and paratyphoid fever. *Clin. Infect. Dis.*,50(2):241-246

- Dinas Kesehatan Prop.Sul-Tengah.2008. *Profil Kesehatan Sulawesi Tengah 2008*.

- Haque, A., Ahmed N., Peerzada A., Raza A., Bashir S., Abbas G. 2001. Utility of PCR in Diagnosis of Problematic Cases of Typhoid. *Jap J Trop Dis* 54: 237 – 239.

- House, D., Wain, J., and Diep, T.O. 2001, Serology of Typhoid Fever In An Area Of Endemicity And Its Relevance To Diagnostic, *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 39 No.3:1002-1007

- Hatta, M., and Smits, H. 2007, Detection of *Salmonella thypi* by Nested Polymerase Chain Reaction in

- Blood, Urine and Stool Samples., *Am J.Med.Hyg* 76(1), 2007:139-143.
- Hatta M, Sulthan AR, Pastoor R, Smits HL.2011. New Flagelin Gene for *Salmonella enterica serovar* Typhi from the East Indonesian Archipelago.*Am.J.Trop.Med.Hyg.*,8 4(3);pp 429-434
- Kilger, G and Patrick A.D. 1993. Differentiation of *Salmonella* Phase 1 Flagellar Antigen Types by Restriction of The Amplified *fliC* Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 31 No. 5; 1108-1110.
- Kwenang, O. A. 2007, Serologic and Molecular Analysis On Typhoid Endemic Population To Determine The Endemic Level In Jeneponto, South Sulawesi, Disertasi of Hasanuddin University, Makassar.
- Leveque, C. and Mounolou,J. (2003) *Biodiversity*. New York: John Wiley.
- Maskalyk J 2003. Typhoid fever. *JAMC*;169(2)132
- Morita M, Takai N, Terjima J, Watanabe H, Kurokawa M, Sagara H, Ohnishi K, Izumiya H 2010.Plasmid-mediated resistance to chephalosporins in *Salmonella enterica serovar typhi*. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 54(9):3991-3392
- McQuiston, J.R., R. Parrenas, M. Ortiz-Rivera, L. Gheesling, F. Brenner, and P.I. Fields. 2004, Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and flap from *Salmonella*, *J.Clin. Microbial.* 42; 1932.
- Nandagopal,B.,Sankar,S; Lingesan,K; Appu, Kumarasekharan,C; Padmini, B; Sridharan, G; Gopinath, AK. 2010. Prevalence of *Salmonella typhi* among Patients with Febrile Illness in Rural and Peri-Urban Populations of Vellore District, as Determined by Nested PCR Targeting the Flagellin Gene. *Molecular Diagnosis & Therapy*; 14(2):107-112.
- Patrcik Y. Woo, Ami M. Y. Fung, Samson S. Y. Wong, Hoi-Wah Tsoi, and Kwok-Yung Yuen. 2001. Isolation and Characterization of a *Salmonella enterica* Serotype Typhi Variant and Its Clinical and Public Health Implications. *Jurnal of Clinical Microbiology*. Vol. 39, No. 3: 1190-1194.
- Punjabi, N.H. 2004. Beban Penyakit Demam Tifoid Serta Salmonellosis Lainnya Berdasarkan Hasil Surveilans Pasif Di Dua Kecamatan Jakarta Utara Indonesia. *Regional Center For Community Nutrition University Indonesia*, Jakarta
- Raffatellu, M., Wilson, R, P., Winter, S, E., Bäumlér, A, J. 2008. Clinical pathogenesis of typhoid fever. *J Infect Developing Countries*; 2(4): 260-266.
- Sjahrurahman, A. 2005, Peranan Kultur dalam Pengelolaan Penderita Penyakit Infeksi, *Majalah Kedokteran Indonesia*, 55; 341.
- Susanna, L., Patrick, W; Clair, C; Wai-Lan, W; Gibson, W; Kwok-Yung,

- Y. 2005. Typhoid fever associated with acute appendicitis caused by an H1-j strain of *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Journal of clinical microbiology*,43(3):1470-2
- WHO, 2003: Diagnosis of Typhoid Fever: The diagnosis, Treatment and Prevention of Typhoid Fever:7-18.
- Xu, S., Zhang, H., Sheng, X., Xu, H., Huang, X. 2008. Transcriptional Expression Of Fljb:Z66, A Flagellin Gene Located On A Novel Linear Plasmid Of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Under Environmental Stresses. *The New Microbiologica*. vol. 31, no2, pp. 241-247.
- Zhou, L and Pollard, A.J. 2010. A fast and highly sensitive blood culture PCR method for clinical detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9:14:1-8.
- Zou X, Huang X, Xu S, Zhou L, Sheng X, Zhang H, Xu H, Ezaki T. 2009. Identification of a fljA gene on a linear plasmid as the repressor gene of *fliC* in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Microbiol Immunol.*,53 (4):191-7.