

Analisis Gen *Tox Corynebacterium Diphtheriae* Penyebab Difteri di Beberapa Wilayah Indonesia

ANALYSIS OF THE TOX GENE OF CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE CAUSED DIPHTHERIA CASES IN THE SEVERAL AREAS OF INDONESIA

Dwi Febriyana, Yudi Hartoyo, Sundari Nursofiah, Tati Febrianti, Ratih Dian Saraswati, Nelly Puspendari, Ida Susanti, Khariri, Kambang Sariadji, Yuni Rukminiati, Fauzul Muna, dan Sunarno*

Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan

*Email: no_nar@yahoo.com

Submitted : 01-10-2020, Revised : 06-01-2021, Revised : 25-01-2021, Accepted : 12-02-2021

Abstract

Diphtheria is a vaccine-preventable disease. The clinical features and complications of diphtheria are associated with toxins produced by the causative bacteria. Diphtheria toxin synthesis is encoded by tox gene. This study aimed to provide an overview of the DNA sequences of the tox gene of Corynebacterium diphtheriae causing diphtheria in several region of Indonesia. A total of 65 Corynebacterium diphtheriae isolated from several provinces in Indonesia (2010-2017) were used as samples. Isolates recultured on blood agar medium (BA), incubated at 37°C overnight. DNA extraction conducted using the QiaAmp DNA Mini Kit. The DNA sequencing was carried out using the Whole Genome Sequencing (WGS) approach. The data conversion and analysis conducted using U-gene and BioEdit programs. Examination of 65 isolate C. diphtheriae with 1683 bp of tox gene sequences showed that there are 3 patterns of gene sequences with 3 mutation site. All mutations were silent mutation. The mutation sites were also not commonly used as 3' end binding site of the PCR primer. We concluded that tox gene of C. diphtheriae that causes diphtheria in some provinces in Indonesia have limited variations and these variations do not encode amino acid changes. This indicates that the vaccines used in Indonesia are still in accordance with the variations in circulating bacteria and PCR can be used for screening and predicting the toxigenicity of diphtheria-causing bacteria.

Keywords: C. diphtheriae, gene tox, diphtheria, Indonesia

Abstrak

Difteri merupakan salah satu penyakit yang dapat dicegah dengan imunisasi (PD3I). Gambaran klinis dan komplikasi difteri dikaitkan dengan toksin yang diproduksi oleh bakteri penyebab. Sintesis toksin difteri dikode oleh gen *tox*. Penelitian ini bertujuan untuk memberikan gambaran sekuens DNA gen *tox Corynebacterium diphtheriae* penyebab difteri di beberapa wilayah Indonesia. Sebanyak 65 isolat *C. diphtheriae* tersimpan milik Badan Litbangkes yang diisolasi dari beberapa wilayah Indonesia tahun 2010-2017 dijadikan sebagai sampel. Rekultur dilakukan pada medium agar darah (BA), diinkubasi pada suhu 37 °C selama sehari semalam. Ekstraksi DNA menggunakan kit QiaAmp DNA Minikit. Sekuensing DNA dilakukan dengan pendekatan *Whole Genome Sequencing* (WGS). Konversi dan analisis data menggunakan program *U-gene* dan *BioEdit*. Pemeriksaan 65 isolat *C. diphtheriae* dengan 1683 bp sekuens gen *tox* menunjukkan ada 3 pola sekuens gen dengan 3 lokasi mutasi. Seluruh mutasi bersifat *silent mutation*. Lokasi mutasi juga bukan merupakan tempat penempelan ujung 3' primer PCR yang umum digunakan. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa variasi gen *tox* yang ditemukan pada *C. diphtheriae* penyebab difteri di Indonesia memiliki variasi yang terbatas dan mutasi yang ada tidak mengkode perubahan asam amino. Hal ini mengindikasikan bahwa vaksin yang digunakan di Indonesia masih sesuai dengan variasi bakteri yang bersirkulasi. Hasil penelitian juga mengindikasikan bahwa PCR dapat digunakan untuk skrining dan memprediksi toksigenisitas bakteri penyebab difteri.

Kata kunci : *C. diphtheriae*, gen *tox*, difteri, Indonesia

PENDAHULUAN

Difteri merupakan salah satu penyakit yang dapat dicegah dengan imunisasi (PD3I). Sebelum era vaksinasi, difteri menjadi masalah kesehatan serius di negara-negara maju. Sejak dijalkannya vaksinasi difteri secara menyeluruh di berbagai negara, kejadian difteri menurun secara drastis. Saat ini di negara-negara maju, difteri klasik dengan gambaran klinis khas sangat jarang dijumpai. Namun, lain halnya dengan negara berkembang. Ribuan kasus difteri terus terjadi setiap tahunnya, tidak terkecuali di Indonesia. Meskipun, tidak menempati urutan terbanyak kasus difteri secara global, Indonesia selalu berada dalam kelompok 5 besar negara dengan kasus difteri terbanyak di dunia. Kematian kasus (CFR) difteri cukup tinggi antara 2-10 persen. Pada kasus berat, kematian meningkat hingga lebih dari 30 persen, bahkan hampir 100%.¹⁻⁴

Gambaran klinis difteri umumnya berupa panas, sakit tenggorok, kelelahan, stridor, muntah, diikuti terbentuknya pseudo membran yang menyertai proses inflamasi di sekitar focal infeksi dan kadang timbul pembengkakan leher (*bull neck*). Bila penyakit berlanjut dapat terjadi komplikasi berupa obstruksi jalan nafas serta gangguan jantung, saraf, dan ginjal. Kematian kasus umumnya berhubungan dengan terjadinya komplikasi tersebut. Gambaran klinis dan komplikasi difteri dikaitkan dengan efek toksin yang diproduksi oleh bakteri penyebab (umumnya *Corynebacterium diphtheriae*). Toksin difteri akan berikatan dengan reseptor pada permukaan sel host (HbEGF), menyebabkan kegagalan sintesis protein dan pada akhirnya terjadi kematian sel dan jaringan.⁵⁻⁸

Sintesis toksin difteri oleh bakteri penyebab difteri dikode oleh gen *tox* atau *dtx* (*diphtheria toxin*). Gen *tox* dibawa oleh sejenis bakteriofaga yang masuk ke dalam kromosom bakteri melalui proses lisogenik. Sekuens DNA gen *tox* telah banyak dipelajari terkait dengan efektifitas vaksin difteri. Perbedaan sekuens pada tingkat asam amino diduga menurunkan efektifitas vaksin difteri seperti pada kasus yang disebabkan oleh *Corynebacterium ulcerans*. Sebaliknya, mutasi yang terjadi juga dapat menyebabkan kegagalan sintesis toksin seperti yang terjadi pada tipe *non-toxigenic tox gene bearing* (NTTB). Hal yang tidak kalah penting terkait pengetahuan tentang sekuens gen *tox* adalah pemeriksaan toksigenitas

bakteri dengan teknik molekular, baik dengan PCR maupun sekuensing DNA.⁹⁻¹¹ Penelitian ini bertujuan untuk memberikan gambaran sekuens DNA gen *tox* dari *C. diphtheriae* yang diisolasi dari kasus difteri di beberapa wilayah Indonesia bagian Barat. Penelitian ini merupakan kelanjutan dari *preliminary study* yang dilakukan sebelumnya.¹²

BAHAN DAN METODE

Sampel

Sampel penelitian terdiri dari 65 isolat *C. diphtheriae* tersimpan milik Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan yang diisolasi dari beberapa provinsi di wilayah Indonesia bagian Barat tahun 2010-2017. Isolat disimpan dalam medium Trypticase Soy Broth (TSB) + glycerol pada suhu *ultra low temperature*. Rekultur dilakukan pada medium agar darah (BA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama sehari semalam. Identifikasi ulang isolat dilakukan dengan metode konvensional untuk pemeriksaan laboratorium difteri mengikuti panduan yang dikeluarkan oleh WHO dengan tanpa kultur pada medium selektif⁽¹³⁾. Koloni bakteri dipanen dan dimasukkan ke dalam tabung berisi 0,5 ml aquadest untuk dilakukan ekstraksi DNA.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan kit komersial QIAamp DNA mini kit mengikuti prosedur dari pabrikan dengan sedikit modifikasi.¹⁴ Hasil akhir DNA ditempatkan ke dalam *molecular water*, bukan *eluent buffer* yang ada di dalam kit. Hal ini dilakukan karena *eluent buffer* mengandung komponen yang dapat mempengaruhi proses sekuensing DNA. Pengukuran kualitas dan kuantitas DNA dilakukan dengan *Qubit DNA quantification* dan *gel electrophoresis*.

Sekuensing DNA

Sekuensing DNA dilakukan dengan pendekatan *Whole genome sequencing* (WGS) menggunakan mesin MiSeq (Illumina). Preparasi sampel dilakukan dan pencampuran reagen sebelum masuk mesin sebagaimana telah dijelaskan pada publikasi sebelumnya⁽¹⁵⁾. Sebuah *DNA libraries* disiapkan menggunakan *Nextera XT DNA Flex Library Prep Kit* (Illumina). Selanjutnya dilakukan pengecekan kualitas *libraries* menggunakan *Agilent 4200 TapeStation system* sebelum proses *running* di dalam mesin Miseq.

Analisis Data

Output hasil pemeriksaan sekuensing dalam format file BAM dikonversi menggunakan program *U-gene* ke dalam format file FASTA. Data sekuens DNA gen *tox* (1683 bp) semua isolat di-copy ke dalam sebuah file dengan format txt. File ini kemudian dianalisis dengan cara *alignment* terhadap sekuens referensi (*C. diphtheriae* PW8) dengan program *BioEdit*. Hasil *alignment* digunakan untuk mengidentifikasi jenis dan jumlah mutasi yang terjadi pada tiap sampel. Prediksi pengaruh mutasi terhadap perubahan asam amino juga dilakukan dengan program *BioEdit*. Data

dukung berupa data global sekuens gen *tox* yang teregistrasi di genBank diperoleh secara gratis dari situs: www.ncbi.nlm.nih.gov. Sementara itu, data sekuens primer dengan target gen *tox* diperoleh dari beberapa publikasi yang telah ada.

HASIL

Distribusi Sampel

Distribusi sampel berdasarkan daerah asal isolat dan tahun isolasi dapat dilihat pada Tabel 1 dibawah ini.

Tabel 1. Distribusi Sampel Berdasarkan Asal Isolate dan Waktu Isolasi

Propinsi	N	f (%)	Tahun Isolasi
Aceh	1	1,79	2017
Banten*	24	42,86	2010, 2011, 2012, 2014, 2015, 2015, 2016, 2017
Jakarta*	20	35,71	2012, 2013, 2015, 2016, 2017
Jawa Barat*	9	16,07	2010, 2016, 2017
Jawa Tengah	1	1,79	2017
Kalimantan Barat	9	16,07	2012, 2013
Kalimantan Tengah	1	1,79	2016
Total	65	100	

Tabel 1 menunjukkan bahwa sebagian besar sampel berasal dari Jakarta dan Banten yang meliputi sekitar 78% dari total sampel.

Sekuens DNA

Hasil *alignment* sekuens DNA dengan strain referensi (*C. diphtheriae* PW8) yang dilakukan dengan program *BioEdit* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pola Mutasi Gen *tox* Berdasarkan Alignment terhadap Sekuens Referensi

	Basa-84	Basa-415	Basa-705
<i>C. diphtheriae</i> PW8 (referensi)	T	T	G
Tipe-1	T	T	G
Tipe-2	T	C	A
Tipe-3	C	C	A

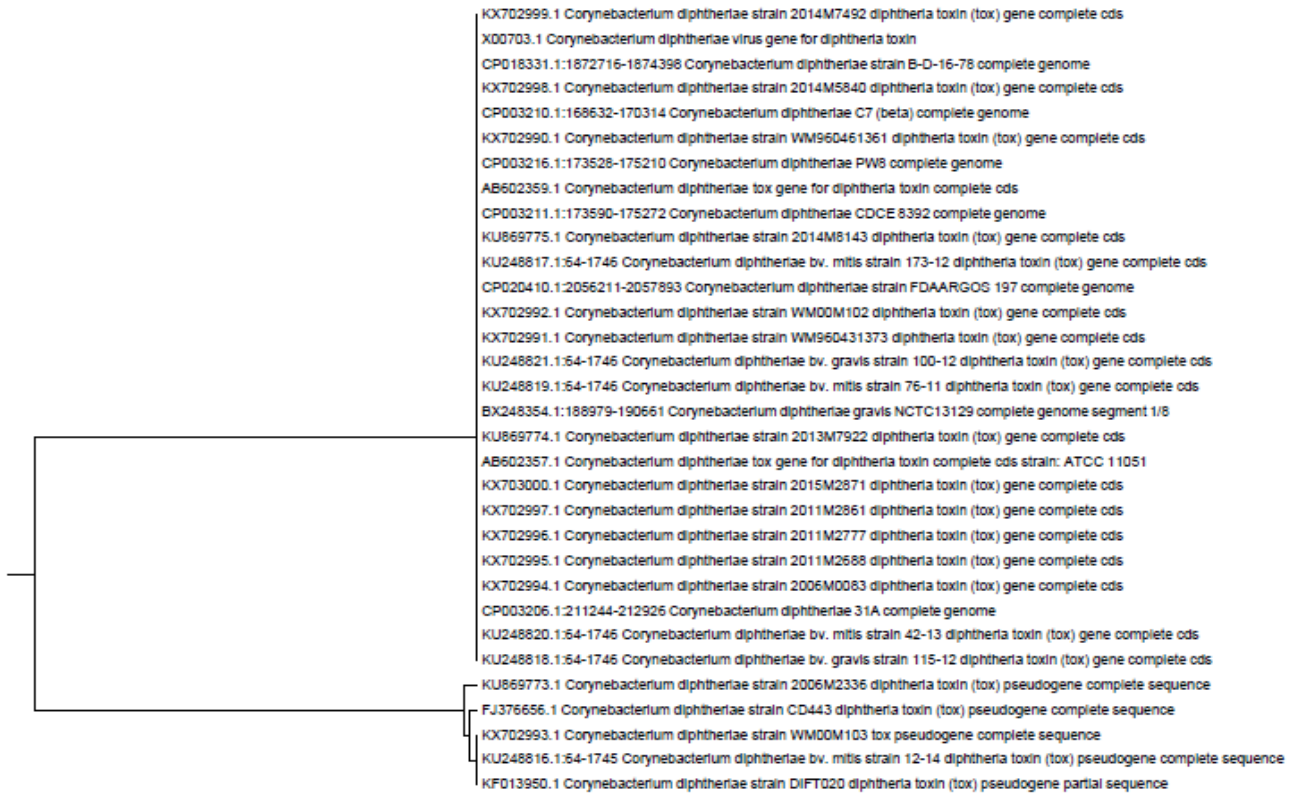
Tabel 2. menunjukkan bahwa hanya ada 2 pola mutasi (1 sama dan 2 berbeda dengan sekuens referensi) yang ditemukan pada isolat yang diperiksa dengan total mutasi titik (SNP) sebanyak 3 lokasi, yaitu basa ke-84, ke-415, dan ke-705. Semua SNP berupa substitusi atau perubahan basa. Hal yang penting bahwa dari seluruh sampel yang diperiksa tidak ditemukan delesi maupun insersi. Delesi 1 basa pada gen *tox* akan menyebabkan *stop codon* yang menyebabkan terjadinya kegagalan sintesis toksin.^{11,16}

Pola dan lokasi mutasi gen *tox* yang terjadi pada *C. diphtheriae* penyebab difteri di beberapa wilayah Indonesia relatif sedikit dibandingkan

data global, sebagaimana terlihat pada Gambar 1 dan 2. Gambar 1 dan 2 menunjukkan hasil analisis gen *tox* (1683 bp) dari 34 strain yang teregistrasi di genBank tahun 2017.

Gambar 1. menunjukkan bahwa ada 4 pola mutasi gen *tox* secara global. Berdasarkan 4 tipe tersebut ada 51 lokasi mutasi basa di antara 1683 basa sekuens DNA gen *tox* *C. diphtheriae* sebagaimana terlihat pada Gambar 2.

Sekuens gen *tox* juga digunakan untuk memprediksi pengaruh mutasi terhadap efektifitas vaksin toksoid difteri. Prediksi translasi asam amino pada lokasi mutasi dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 1. Pola Mutasi Gen *tox* 34 *C. diphtheriae* yang Teregistrasi di genBank Berdasarkan Gambaran Filogenetik



Gambar 2. Lokasi Mutasi pada Sekuens Gen *tox* 34 *C. diphtheriae* yang Teregistrasi di genBank

Tabel 3. Prediksi Pengaruh Mutasi pada Perubahan Asam Amino

Lokasi Mutasi	Perubahan Basa	Perubahan Asam Amino	Tipe Mutasi
Basa-84	GAT → GAC	Asp → Asp	<i>Silent mutation</i>
Basa-415	TTG → CTG	Leu → Leu	<i>Silent mutation</i>
Basa-705	AGG → AGA	Arg → Arg	<i>Silent mutation</i>

Tabel 4. Beberapa Sekuens Primer PCR dengan Target Gen *tox C. diphtheriae*

No	Sekuens Primer PCR (5' → 3')	Basa Ujung 3'	Referensi
1	ATCCACTTTTAGTGCGAGAACCTTCGTCA	338	(20)
2	GAAAACTTTTCTTCGTACCACGGGACTAA	146	(20)
3	ATACTTCCTGGTATCGGTAGC	1011	(20)
4	CGAATCTTCAACAGTGTTC	1267	(20)
5	CGGGATGGTGCTTCGCG	473	(20)
6	CGCGATTGGAAGCGGGT	1365	(20)
7	GTTCGGTGATGGTGCTTCGC	472	(20)
8	CGCCTGACACGATTCCTGC	634	(20)
9	GGCGTGGTCAAAGTGACGTA	329	(20)
10	CTTGCTCCATCAACGGTTCA	408	(20)
11	CGCCCTAAATCTCCTGTTTATGTT	1512	(20)
12	GTACCCAAGAACGCCTATGGAA	1596	(20)
13	TTATCAAAAGGTTGCGGTGATGGTG	460	(20)
14	AATCTCAAGTTCTACGCTTAAC	549	(20)
15	GAAAACTTTTCTTCGTACCACGGGACTAA	493	(20)
16	ATCCACTTTTAGTGCGAGAACCTTCGTCA	146	(20)
17	AATAAATACGACGCTGCGGGATAC	338	(20)
18	CTGTAGATAATGAAAACCCGCTC	270	(20)
19	GGGATAatTTGTGAGCAGAAAAGTGGTTC	25	(21)
20	CAACATCATaAtaattTatATGGGCTGAAGGTGGGgCCCC	52	(21)
21	CGTGGTCAAAGTGACGTATCCAGGACTG	339	(21)
22	AGGATGCTCTAATGCCGTTTGATGAAATTCTTC	816	(21)

Tabel 3. menunjukkan bahwa semua mutasi yang terjadi bersifat *silent mutation* atau tidak merubah asam amino sehingga diprediksi tidak akan mempengaruhi efektifitas vaksin difteri.

Selain terkait vaksin, gen *tox* juga digunakan sebagai marker dalam skrining toksigenisitas bakteri penyebab difteri dengan metode PCR^(17,18). Pemeriksaan PCR akan terganggu jika terdapat mutasi pada tempat penempelan primer PCR, khususnya ujung 3', baik *forward* maupun *reverse*⁽¹⁹⁾. Hasil identifikasi beberapa sekuens primer PCR dengan target gen *tox* dapat dilihat pada Tabel 4. Dalam tabel 4 menunjukkan bahwa tidak ada satupun sekuens primer PCR dengan ujung 3' yang terletak pada lokasi mutasi (Tabel 2 dan 3). Meskipun basa415 merupakan lokasi penempelan primer PCR no 10, hal ini diprediksi tidak terlalu berpengaruh karena lokasi mutasi

berada pada bagian tengah sekuens primer.

PEMBAHASAN

Sampel penelitian berasal dari wilayah Indonesia bagian Barat, khususnya Jakarta dan sekitarnya. Hal ini sesuai dengan pembagian wilayah kerja laboratorium rujukan nasional difteri. Data Pusat Data dan Informasi (Pusdatin) Kementerian Kesehatan menunjukkan bahwa provinsi Jakarta dan sekitarnya (Banten dan Jawa Barat) menyumbang 72,5% kasus difteri secara nasional tahun 2018.²² Selain Jakarta dan sekitarnya, kasus terbanyak berasal dari Jawa Timur. Namun, dalam penelitian ini tidak ada isolat dari Jawa Timur mengingat laboratorium rujukan difteri untuk Jawa Timur adalah Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK)

Surabaya.

Hasil sekuensing DNA menunjukkan bahwa tidak terlalu banyak variasi gen *tox* yang ditemukan pada isolat *C. diphtheriae* yang beredar di Indonesia. Bahkan, hasil ini sama persis dengan *preliminary study* yang dilakukan sebelumnya di pulau Jawa dan Kalimantan dengan jumlah sampel terbatas dan publikasi sebelumnya dengan wilayah terbatas (Jakarta dan sekitarnya).^{12,15} Hasil berbeda didapatkan pada penelitian yang dilakukan oleh Nakao terhadap isolat yang berasal dari wabah difteri di Rusia dan sekitarnya yang menunjukkan variasi cukup banyak.²³ Perbedaan ini diprediksi terjadi karena banyaknya kasus difteri di Rusia dan sekitarnya saat terjadi wabah.¹ Perbedaan khususnya pada jumlah lokasi mutasi juga terlihat bila dibandingkan data global sekuens gen *tox* yang teregistrasi di genBank.

Hasil prediksi translasi asam amino berdasarkan sekuens DNA juga mengungkap bahwa mutasi yang terjadi hanya bersifat *silent mutation*. Sekuens referensi yang digunakan adalah sekuens gen *tox C. diphtheriae* PW8 karena merupakan strain penghasil *seed* vaksin toksoid difteri yang digunakan secara global.²⁴ Hasil ini mengindikasikan bahwa vaksin difteri yang digunakan selama ini masih sesuai dengan bakteri yang bersirkulasi dan menyebabkan difteri di Indonesia. Namun ada sebuah pertanyaan, ketika vaksin masih sesuai mengapa kasus difteri tetap terjadi. Hal ini terjadi karena vaksin difteri berupa toksoid yang mencegah terjadinya toksisitas, namun tidak sepenuhnya mencegah invasi bakteri penyebab. Beberapa penelitian menunjukkan banyaknya kasus difteri terjadi pada individu dengan riwayat imunisasi dengan gambaran klinis umumnya ringan.^{25,26}

Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer PCR yang umum dipakai untuk skrining dan prediksi toksigenisitas *C. diphtheriae* dapat diaplikasikan di Indonesia. Sesuai dengan panduan WHO,¹³ pemeriksaan PCR digunakan untuk skrining toksigenisitas bakteri penyebab difteri. Pada isolat yang terdeteksi gen *tox*, validasi dilanjutkan dengan pemeriksaan Elek tes. Namun pada isolat yang tidak terdeteksi gen *tox*, tidak perlu dilakukan pemeriksaan Elek tes dan dapat langsung disimpulkan sebagai non-toksigenik.

Dalam skema tersebut, sensitifitas pemeriksaan PCR sangat dibutuhkan dan hal ini terkait dengan primer PCR yang digunakan. Kegagalan amplifikasi akibat terjadinya mutasi pada tempat penempelan ujung 3' primer dapat berakibat fatal karena tipe toksigenik akan disimpulkan sebagai non-toksigenik. Toksigenisitas bakteri berkaitan dengan kemampuan sintesis toksin yang merupakan faktor virulensi utama bakteri penyebab difteri. Sintesis toksin difteri berkaitan dengan manifestasi klinik dan komplikasi yang terjadi pada difteri. Komplikasi ini menentukan prognosis penyakit dan tingginya kasus kematian.⁵⁻⁸

KESIMPULAN

Hasil penelitian menemukan bahwa gen *tox* pada *C. diphtheriae* penyebab difteri di Indonesia memiliki variasi yang terbatas dan mutasi yang ada tidak mengkode perubahan asam amino. Hal ini mengindikasikan bahwa vaksin yang digunakan di Indonesia masih sesuai dengan variasi bakteri yang bersirkulasi. Hasil penelitian juga mengindikasikan bahwa PCR dapat digunakan untuk skrining dan memprediksi toksigenisitas bakteri penyebab difteri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada semua pihak yang berperan dalam penelitian ini, khususnya Aulia Rizki, Novi Amalia, dan Sauma Roma Intan. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan kepada Vivi Setiawaty sebagai Kepala Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (PBTDK) dan Rita Marleta Dewi sebagai Ketua Panitia Pembina Ilmiah (PPI) PBTDK atas bantuan dan bimbingannya.

DAFTAR RUJUKAN

1. Sharma NC, Efstratiou A, Mokrousov I, Mutreja A, Das B, Ramamurthy T. Diphtheria. *Nat Rev.* 2019;5:81.
2. WHO. Diphtheria Reported Cases [Internet]. 2020. Available from: https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tsincidencediphtheria.html

3. Besa NC, Coldiron ME, Bakri A, Raji A, Nsuami MJ. Diphtheria outbreak with high mortality in northeastern Nigeria. *Epidemiol Infect.* 2014;142:797–802.
4. Quick ML, Sutter RW, Kobaidze K, Malakmadze N, Strebel PM, Nakashidze R, et al. Epidemic diphtheria in the Republic of Georgia, 1993-1996: Risk factors for fatal outcome among hospitalized patients. *J Infect Dis.* 2000;181(SUPPL. 1):130–7.
5. Arguni E, Karyanti MR, Satari HI, Hadinegoro SR. Diphtheria outbreak in Jakarta and Tangerang, Indonesia: Epidemiological and clinical predictor factors for death. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(2 February):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0246301>
6. Vong S, Baidjoe A, Id JD, Id FF, Habib ZH, Halder CE, et al. Epidemiological , clinical , and public health response characteristics of a large outbreak of diphtheria among the Rohingya population in Cox ’ s Bazar , Bangladesh , 2017 to 2019 : A retrospective study. *Plos Med* [Internet]. 2021;126:1–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1003587>
7. Agus AABA, Husada D, Lestari P. Clinical Profile and Epidemiological Aspects of Diphtheria Cases In Ruang Isolsi Khusus RSUD Dr. Soetomo From January Until December 2015. *J Kedokt Syiah Kuala.* 2019;19(1):29–34.
8. Murphy JR. Mechanism of diphtheria toxin catalytic domain delivery to the eukaryotic cell cytosol and the cellular factors that directly participate in the process. *Toxins (Basel).* 2011;3(3):294–308.
9. Parveen S, Bishai WR, Murphy JR. *Corynebacterium diphtheriae*: Diphtheria Toxin, the *tox* Operon, and Its Regulation by Fe²⁺ Activation of apo-DtxR. *Microbiol Spectr.* 2019;7(4):1154–64.
10. de Souza de Oliveira Dias AA, Santos LS, Sabbadini PS, Santos CS, Junior FCS, Napoleão F, et al. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: An emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Rev Saude Publica.* 2011;45(6):1176–91.
11. Zakikhany K, Neal S, Efstratiou A. Emergence and molecular characterisation of non-toxigenic *tox* gene-bearing *corynebacterium diphtheriae* biovar *mitis* in the United Kingdom, 2003-2012. *Eurosurveillance.* 2014;19(22):1–8.
12. Mulyastuti Y, Rahayu SI, Sunarno, Santoso S, Wasito EB. Short communication: Investigation of diphtheria in indonesia: Dtxr and *tox* genes analysis of *Corynebacterium diphtheriae* collected from outbreaks. *Biodiversitas.* 2017;18(2):784–7.
13. WHO. Workshop on Laboratory Diagnosis of Diphtheria. Geneva : WHO Reg Off Eur. 2017.
14. Sunarno, Muna F, Fitri N, Malik A, Kurniawati A, Soebandrio A. Metode Cepat Ekstraksi DNA *Corynebacterium diphtheriae* Untuk Pemeriksaan PCR. *Bul Penelit Kesehat.* 2014;42(2):85–92.
15. Sunarno S, Rukminiati Y, Saraswati RD. ST534: The new sequence type of *corynebacterium diphtheriae* causing diphtheria in jakarta and surrounding areas, Indonesia. *Turkish J Med Sci.* 2020;50(1):267–70.
16. Doyle CJ, Mazins A, Graham RMA, Fang NX, Smith H V., Jennison A V. Sequence analysis of toxin gene-bearing *corynebacterium diphtheriae* strains, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(1):105–7.
17. Sunarno, Kambang Sariadji, Holly Arif Wibowo. Potensi Gen *dtx* Dan *dtxR* Sebagai Marker Untuk Deteksi Dan Pemeriksaan Toksigenitas *Corynebacterium diphtheriae*. *Bul Penelit Kesehat.* 2013;41(1):1–10.
18. Sunarno, Sariadji K. Perbandingan Pemeriksaan Toksigenitas secara Genotip dan Fenotip pada Beberapa Isolat *Corynebacterium diphtheriae* Penyebab Difteri di Indonesia. *Biotek Medisiana Indones.* 2016;5(2):143–51.
19. Borah P. Primer designing for PCR. *Sci Vis.* 2011;11(3):134–6.
20. Berger A, Hogardt M, Konrad R, Sing A. *Corynebacterium diphtheriae* and related toxigenic species: Genomics, pathogenicity and applications. Burkovski A, editor. Vol. 1, Springer Netherlands. 2014. 1–293 p.
21. Sunarno, Khariri, Muna F, Sariadji K, Rukminiati Y, Febriyana D, et al. New approach for the identification of potentially

- toxigenic *Corynebacterium* sp. using a multiplex PCR assay. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2021;184(March):106198. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106198>
22. Ministry of Health. Indonesia Health Profile Year 2018. Kurniawan, Yudianto, Hardhana, Siswanti, editors. DKI Jakarta : Kementerian Kesehatan RI; 2019.
23. Nakao H, Pruckler JM, Mazurova IK, Narvskaja O V., Glushkevich T, Marijevski VF, et al. Heterogeneity of diphtheria toxin gene, *tox*, and its regulatory element, *dtxR*, in *Corynebacterium diphtheriae* strains causing epidemic diphtheria in Russia and Ukraine. *J Clin Microbiol.* 1996;34(7):1711–6.
24. Suwanpatcharakul M, Pakdeecharoen C, Visuttitewin S, Pesirikan N, Chauvatcharin S, Pongtharangkul T. Process optimization for an industrial-scale production of Diphtheria toxin by *Corynebacterium diphtheriae* PW8. *Biologicals* [Internet]. 2016;44(6):534–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.08.002>
25. Gower CM, Scobie A, Fry NK, Litt DJ, Cameron JC, Chand MA, et al. The changing epidemiology of diphtheria in the United Kingdom, 2009 to 2017. *Eurosurveillance.* 2020;25(11):1–10.
26. Mahomed S, Archary M, Mutevedzi P, Mahabeer Y, Govender P, Ntshoe G, et al. An isolated outbreak of diphtheria in South Africa, 2015. *Epidemiol Infect.* 2017;145(10):2100–8.