

EVALUASI STATUS VIRULENSI ISOLAT *Bacillus anthracis* ASAL NUSA TENGGARA DAN PAPUA MENGGUNAKAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION MULTIPLEX*

Polymerase Chain Reaction Multiplex to Evaluate the Virulence Status of Bacillus anthracis Isolates from Nusa Tenggara and Papua

Maxs Urias Ebenhaizar Sanam¹, Widya Asmara², Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni², Michael Haryadi Wibowo², dan Rahmat Setya Adji³

¹Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Nusa Cendana, Kupang

²Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor

E-mail: maxi_sanam@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi status virulensi 22 isolat *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*) asal Nusa Tenggara dan Papua menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR) *multiplex* dengan dua pasang primer nukleotida yang memiliki target amplifikasi gen spesifik pada kedua plasmid. Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode lisis panas. Pasangan primer PA5 dan PA8 digunakan untuk mengamplifikasi gen *pagA* pada pXO1, sedangkan pasangan primer 1234 F dan 1301 R mengamplifikasi gen *capABC* pada pXO2. Hasil reaksi PCR menghasilkan dua pita DNA berukuran sekitar 600 dan 800 bp pada 20 isolat. Namun, dua isolat lain, masing-masing hanya memiliki salah satu dari kedua ukuran pita DNA tersebut. Sebagian besar koleksi isolat asal Nusa Tenggara dan Papua (91%) masih memiliki kedua plasmid secara lengkap (pXO1+/2+) dan karena itu bersifat virulen, sedangkan dua isolat lain (9%) telah kehilangan salah satu plasmid virulennya sehingga bersifat avirulen. Disimpulkan bahwa PCR *multiplex* dengan dua pasang primer dengan target amplifikasi pada plasmid dapat digunakan untuk evaluasi status virulensi isolat *B. anthracis*.

Kata kunci: *Bacillus anthracis*, plasmid, PCR *multiplex*, virulensi

ABSTRACT

The virulence of *Bacillus anthracis* is determined by two megaplasmids, pXO1 and pXO2. This study aimed to reveal the virulence status of 22 isolates of *B. anthracis* originated from Nusa Tenggara and Papua by applying a multiplex PCR employing two pairs of nucleotide primers that have specific amplification target on genes in the two plasmids. DNA extraction was conducted by heat lysis. Primers PA5 and PA8 were used to amplify the *pagA* gene on pXO1, while the primer pair 1234 F and 1301 R were used to amplify *capABC* genes on pXO2. PCR reaction resulted in two DNA bands of approximately 600 and 800 bp each on 20 isolates. However, two other isolates, each only has one of the two DNA bands. The study concluded that multiplex PCR composed of two pairs of primer targeting on the amplification of genes in the respected plasmids can be applied to confirms the virulence status of *B. anthracis* isolates. Most of the collection of isolates from Nusa Tenggara and Papua (91%) are still containing the two virulence plasmids (pXO1+/2+) and hence they are of virulence isolates, whereas the others (9%) had lost one of its virulence plasmid and became avirulent isolates.

Key words: *Bacillus anthracis*, PCR Multiplex, plasmids, virulence

PENDAHULUAN

Antraks adalah penyakit bakteri yang menyerang herbivora dan mamalia lainnya, termasuk manusia. Bakteri penyebab antraks adalah *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*), bersifat Gram positif, berbentuk batang, nonmotil, dan membentuk spora (WHO, 2008a). Virulensi sebagian besar *strain B. anthracis* dihubungkan dengan dua megaplasmid yaitu pXO1 dan pXO2, masing-masing berukuran 181.677 dan 94.830 bp (Ravel *et al.*, 2009). Kehilangan salah satu plasmid ini menyebabkan *strain* berubah menjadi avirulen atau mengalami atenuasi secara nyata (WHO, 2008a). Plasmid pXO1 diperlukan untuk sintesis tiga protein toksin antraks yaitu *edema factor* (EF), *lethal factor* (LF), dan *protective antigen* (PA). Ketiga protein tersebut bekerja dalam kombinasi biner untuk menghasilkan dua toksin antraks yaitu toksin edema yang merupakan kombinasi PA dan EF; dan toksin letal sebagai kombinasi PA dan LF (Young dan Collier, 2007; Koehler, 2009). Plasmid pXO2 membawa gen

yang diperlukan untuk sintesis asam *poly-D-glutamic*, komponen utama kapsula yang berfungsi sebagai antifagositosis (Koehler, 2009).

Wilayah Nusa Tenggara, kecuali Bali, hingga kini masih merupakan daerah endemis antraks sedangkan Papua pernah mengalami kasus antraks pada babi di Kabupaten Paniai pada 1983 tetapi sudah dinyatakan bebas sejak 2003. Wabah antraks di NTB tercatat pertama kali di Pulau Sumbawa pada 1917, di NTT terjadi pertama kali di Rote pada 1887 (Akoso, 2009; Putra, 2011). Meski upaya-upaya pengendalian telah dilaksanakan, kasus antraks di Sumbawa, Sumba, dan Flores masih sering terjadi bahkan cenderung berulang hampir setiap tahun (Djohar, 2010; Putra, 2011). Di samping kajian epidemiologis, kajian-kajian bakterio-logis, khususnya menyangkut virulensi *B. anthracis* yang sering menyerang di daerah ini perlu dilakukan agar dapat digunakan dalam perbaikan strategi pengendalian penyakit antraks.

Konfirmasi keberadaan kedua plasmid virulen *B. anthracis* merupakan prosedur standar dalam diagnosis

terhadap dugaan antraks (WHO, 1998; Inoue *et al.*, 2004). Di masa lalu, upaya konfirmasi ini dilakukan dengan menginokulasi hewan coba yang rentan seperti mencit atau marmut dan diamati gejala sakit atau mati hewan tersebut minimal selama 24 jam (WHO, 2008a). Namun seiring dengan menguatnya isu-isu kesejahteraan hewan dan risiko propagasi agen infeksius secara berlebihan sehingga berpeluang mencemari lingkungan maka penggunaan hewan coba dalam uji-uji patogenisitas tersebut sudah mulai dihindari dan digantikan dengan metode lain yang lebih ramah lingkungan. Metode molekuler berupa *polymerase chain reaction* (PCR) selain tidak merusak lingkungan, juga memberikan hasil konfirmasi yang jauh lebih cepat dan tepat dibandingkan uji-uji konvensional.

Metode PCR *multiplex* merupakan varian PCR yang memanfaatkan lebih dari satu pasang primer untuk mengamplifikasi beberapa target *sequence* sekaligus dalam satu reaksi (Elnifro *et al.*, 2000). Hal ini dimaksudkan untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifitas PCR dibandingkan bila hanya menggunakan satu pasang primer sebagaimana pada PCR standar (PCR *uniplex*). Metode PCR *multiplex* untuk diagnosis antraks sudah dikembangkan, antara lain yang memanfaatkan 3 pasang primer (Ko *et al.*, 2003), 5 pasang primer (Ramisse, 1996) dan 8 pasang primer (Kumar *et al.*, 2012) dengan target amplifikasi gen pada kedua plasmid (pXO1 dan pXO2), dan kromosom. Namun penggunaan primer yang terlalu banyak ini kurang efisien jika hanya digunakan untuk mengonfirmasi virulensi isolat *B. anthracis*, tetapi sering ditemui kesulitan secara teknis berupa terjadinya *primer dimer* sehingga produk target tidak teramplifikasi secara sempurna (Elnifro *et al.*, 2000). Pembacaan profil DNA hasil amplifikasi *sequence*

dengan multiprimer juga menjadi sulit karena sering ditemukan pita DNA yang tumpang-tindih (Ramisse *et al.*, 1996).

Penelitian ini bertujuan mengetahui status virulensi dari isolat-isolat *B. anthracis* yang berhubungan dengan kasus antraks di Nusa Tenggara dan Papua dalam rentang waktu isolasi tahun 1996-2012 menggunakan metode PCR *multiplex* yang memanfaatkan dua pasang primer nukleotida. Upaya konfirmasi ini penting mengingat beberapa isolat dalam koleksi tersebut belum dikarakterisasi secara molekuler sejak diisolasi.

MATERI DAN METODE

Isolat *Bacillus anthracis*

Dua puluh dua isolat *B. anthracis* digunakan dalam penelitian ini yang terdiri atas 20 isolat koleksi Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor, dan 2 isolat hasil isolasi kasus lapang (Tabel 1). Konfirmasi fenotipe terhadap *B. anthracis* dilakukan melalui uji-uji karakteristik koloni dan sifat hemolitik pada *tripticase soy agar* (TSA) mengandung 5% darah domba, pertumbuhan pada kaldu alkalis, serta pewarnaan Gram, spora, dan kapsula. Untuk pengujian kapsula, koloni bakteri ditumbuhkan pada media TSA dengan natrium bikarbonat 0,8% dan diinkubasi pada CO₂ 5%. Seluruh prosedur pengujian ini mengacu pada panduan WHO (2008a) dan dilakukan di ruangan *biosafety level* (BSL 2 plus), Laboratorium Antraks, Balitvet, Bogor.

Ekstraksi DNA

Deoxyribonucleic acid (DNA) dari setiap isolat *B. anthracis* diekstraksi dengan metode lisis panas (Keim *et al.*, 2000; Hoffmaster *et al.*, 2002). Kuman *B.*

Tabel 1. Isolat *Bacillus anthracis* yang digunakan dan hasil uji keberadaan plasmidnya *

No	Kode Isolat	Sumber	Asal/Daerah	Tahun Isolasi	Status Plasmid
1.	BCC 2494	Tulang	NTT	2004	pXO1+/2+
2.	03/231	Tanah	NTB	2003	pXO1+/2+
3.	Kupang	-	-	-	pXO1+/2+
4.	01/351	Tanduk dan tanah	BPPV Bali	2001	pXO1+/2+
5.	NTB	-	NTB	-	pXO1+/2+
6.	Sumbawa	-	Sumbawa, NTB	-	pXO1+/2+
7.	BCC2476	Sapi	NTT	1999	pXO1+/2+
8.	02/727	Sapi	NTB	2002	pXO1-/2+
9.	BCC2475	Tanduk dan tanah	NTB	1999	pXO1+/2+
10.	01/352	Tanah	NTT	2001	pXO1+/2+
11.	-	Babi	Irian Jaya/Papua	1983	pXO1+/2+
12.	07/1360	Tanah bercampur darah domba	NTB	2007	pXO1+/2+
13.	07/1360	Tanah bercampur darah domba	NTB	2007	pXO1+/2+
14.	06/052	Kulit telinga kambing	NTB	2006	pXO1+/2+
15.	05/1284	Kulit dan tanah	Sumbawa, NTB	2005	pXO1+/2+
16.	BCC2486	Kulit telinga sapi	Raba, Bima, NTB	2003	pXO1+/2+
17.	BCC2472	Kuda	NTT	1996	pXO1+/2+
18.	12/010	Tanah	NTB	2010	pXO1+/2+
19.	12/010	Darah kapur	NTB	2010	pXO1+/2-
20.	Ende1**	Tanah bercampur darah kerbau	Ende, NTT	2012	pXO1+/2+
21.	Ende2**	Tanah bercampur darah kerbau	Ende, NTT	2012	pXO1+/2+
22.	Sabu NTT	Tanah	Sabu, NTT	2011	pXO1+/2+

* Isolat koleksi Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor; ** Isolasi dari sampel dugaan kasus antraks di Ende, NTT; - Data tidak tersedia; pXO1-/2+: isolat kehilangan plasmid pXO1; pXO1+/2-: isolat kehilangan plasmid pXO2

anthracis ditumbuhkan pada media nutrisi agar atau agar darah, diinkubasikan 16-18 jam, diambil satu ose penuh (*loop full*) dan dilarutkan ke dalam 250-500 µl *nuclease free water* kemudian diaduk dengan *vortex* sampai homogen. Suspensi tersebut dipanaskan pada suhu 100° C selama 10 menit, selanjutnya disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 12.000-14.000 rpm. Supernatan yang diperoleh digunakan sebagai *template* DNA. Proses sentrifugasi dikerjakan di dalam kabinet pengaman hayati BSL2 untuk mencegah kemungkinan penyebaran aerosol. Supernatan yang diperoleh ditransfer ke dalam tabung mikrosentrifus baru dan disimpan pada suhu -20° C hingga digunakan.

Polymerase Chain Reaction Multiplex

Dua pasang primer dengan target masing-masing pada pXO1 dan pXO2 digunakan dalam teknik PCR *multiplex* ini. Kedua pasang primer tersebut adalah pasangan PA5/PA8 dan 1234F/1301R (Tabel 2) merupakan primer rujukan WHO untuk mengonfirmasi keberadaan plasmid pXO1 dan pXO2 (WHO, 1998; Inoue *et al.*, 2004). Primer-primer tersebut disintesis oleh 1st BASE FBCO, Singapore.

Metode amplifikasi PCR merujuk pada prosedur yang digambarkan WHO (1998) dengan modifikasi seperlunya. Reaksi PCR dilangsungkan di dalam tabung PCR volume 50 µl per reaksi. Komposisi kit PCR (Invitrogen), primer, dan *template* sebagai berikut: 5 µl PCR buffer 10x; 1,5 µl MgCl₂ (50 mM); 1 µl dNTP mix (10 mM); 1 µl primer (10 pM) masing-masing; 0,25 µl Tag DNA polimerase; 33,25 µl *nuclease free water*; dan 5 µl DNA *template*. Parameter reaksi PCR yang

digunakan adalah denaturasi awal pada 94° C selama 2 menit; 35 siklus amplifikasi yang terdiri atas denaturasi pada 94° C selama 1 menit, *annealing* pada 55° C selama 1 menit, dan ekstensi pada 72° C selama 1 menit; serta ekstensi akhir pada suhu 72° C selama 7 menit. Produk PCR yang terbentuk dievaluasi dengan melakukan elektroforesis. Sepuluh mikroliter produk PCR dicampur dengan 2 µl *loading dye* dan selanjutnya dielektroforesis pada gel *agarose* 1,5% (1,5 g *agarose* dalam 100 ml TAE *buffer*) yang ditambahkan *etidium bromide* 0,5 µg/ml bersama 100-bp *ladder* (Invitrogen) sebagai *marker*. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 120 V selama 50 menit. Visualisasi DNA menggunakan *transluminator ultraviolet* (UV) dan hasilnya didokumentasikan dengan kamera digital Canon EOS 550D.

HASIL DAN PEMBAHASAN

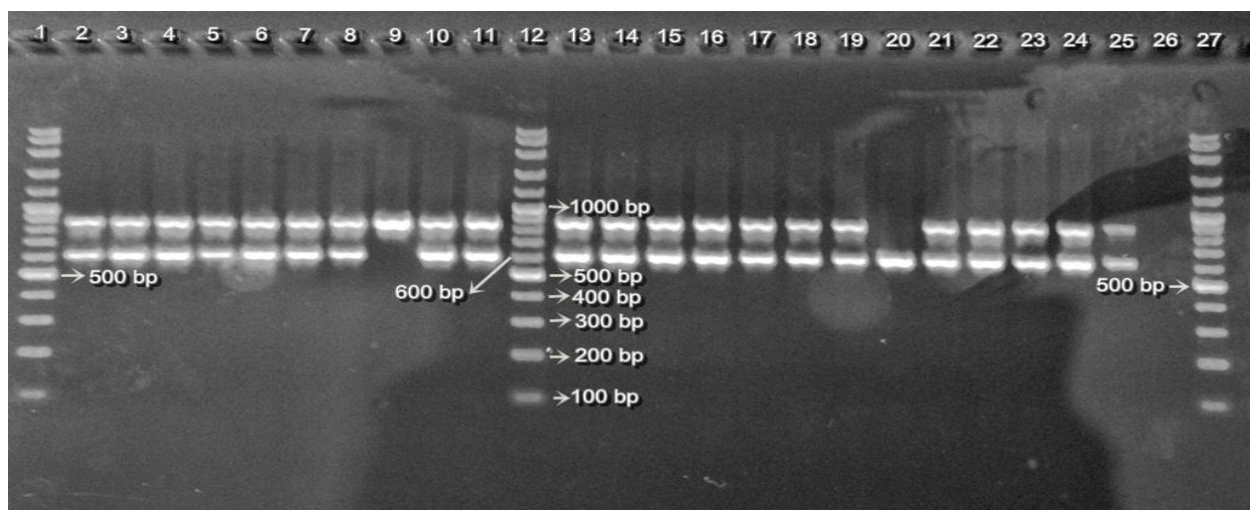
Karakter Fenotipe *B. anthracis*

Gambaran karakter fenotipe yang diamati pada semua isolat uji, kecuali respons terhadap pewarnaan kapsula dan pertumbuhan pada media bikarbonat relatif sama antara isolat satu dengan yang lain dan sesuai dengan yang digambarkan dalam WHO (2008b). Koloni *B. anthracis* yang tumbuh pada media agar darah berdiameter 2-3 mm, nonhemolitik, berwarna putih keabu-abuan dengan tepi yang tidak rata karena adanya penjuluran-penjuluran halus. Pada pewarnaan Gram, bakteri berbentuk batang dengan sudut yang jelas, membentuk rantai, dan bersifat Gram positif. Pada pewarnaan dengan metode Ziehl-Neelsen spora berwarna merah, sedangkan sel vegetatif biru.

Tabel 2. Urutan nukleotida primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen pada pXO1 dan pXO2

Target gen	Primer*	Sekuens primer (5'-3')	Ukuran ampikon (bp)
<i>pagA</i>	PA 5	TCCTAACACTAACGAAGTCG	596
	PA 8	GAGGTAGAAGGATATACGGT	
<i>Cap</i>	1234F	CTGAGCCATTAATCGATATG	846
	1301R	TCCCACCTACGTAATCTGAG	

*WHO (1998)



Gambar 1. Hasil amplifikasi gen *pagA* dan *cap* dengan metode PCR *multiplex* memperlihatkan dua pita DNA masing berukuran sekitar 600 dan 850 bp yang mengonfirmasi adanya plasmid pXO2 dan pXO1 (Lajur 2 - 11, dan 13 - 24 adalah isolat-isolat yang diuji; Lajur 25 adalah kontrol positif; Lajur 26 adalah kontrol negatif; Lajur 1, 12, dan 27 adalah *Marker* DNA *ladder* 100-bp)

Pertumbuhan kultur pada *nutrient broth* menunjukkan kekeruhan menyerupai benang kapas terutama di bagian dasar dan tengah tabung. Pada media agar bikarbonat, semua koloni tampak mukoid kecuali koloni isolat nomor 18. Pada pewarnaan kapsula dengan *polychrome methylene blue*, terbentuk materi berwarna *pink* mengitari *bacilli* yang hitam kebiruan. Kapsula ditemukan pada hampir semua isolat, kecuali isolat nomor 18. Hasil pewarnaan ini memperkuat temuan tentang tekstur koloni yang kasar pada media bikarbonat sebelumnya sebagai indikasi absennya kapsula dan plasmid pXO2 pada isolat tersebut (WHO, 2008a). Meski secara fenotipe telah terbukti, isolat yang terindikasi kehilangan pXO2 ini tetap diikuti dalam uji PCR *multiplex* untuk konfirmasi secara molekuler.

PCR Multiplex

Keberadaan plasmid pXO1 dan pXO2 pada isolat-isolat uji disajikan pada Gambar 1. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa kedua pasang primer yang digunakan serta parameter reaksi PCR *multiplex* yang diprogramkan sudah tepat sehingga mampu mengamplifikasi target-target *sequence* yang diinginkan. Dua pita DNA berukuran masing-masing sekitar 600 dan 850-bp ditemukan pada hampir semua isolat uji kecuali pada dua isolat uji asal Nusa Tenggara Barat (NTB). Pada lajur 9 dan 20 terlihat hanya satu pita, yang mengindikasikan kedua isolat tersebut telah kehilangan salah satu dari dua plasmid virulennya. Isolat 02/727 asal NTB yang diisolasi di tahun 2002 kehilangan plasmid pXO1, sedangkan isolat 12/010 asal NTB yang diisolasi pada tahun 2010 kehilangan plasmid pXO2. Penelitian ini juga berhasil mengonfirmasi status virulensi dua isolat lapang baru (isolat nomor 20 dan 21), yang diisolasi dari sampel tanah di sekitar kerbau yang mati dengan dugaan antraks di Kecamatan Kota Baru, Ende, NTT pada Juni 2012.

Strain virulen *B. anthracis* dicirikan oleh adanya dua plasmid virulen yaitu pXO1 dan pXO2 (WHO, 2008a). *Strain* yang kehilangan salah satu dari dua plasmid tersebut umumnya bersifat avirulen dan biasanya merupakan *strain* vaksin. *Strain-strain* vaksin tersebut adalah *B. anthracis strain* tipe Sterne yang kehilangan pXO2, dan *strain* tipe Pasteur yang kehilangan pXO2 (Koehler, 2009). Di samping *strain-strain* vaksin yang avirulen tersebut, beberapa peneliti telah mengamati *strain-strain* lapang virulen yang berubah menjadi avirulen karena kehilangan salah satu atau bahkan kedua plasmidnya. Antwerpen *et al.* (2011) menguji 40 isolat dan menemukan 27 isolat kehilangan kedua plasmid virulen (pXO1-/pXO2-); 4 isolat kehilangan salah satu plasmid 4 isolat (pXO2+), sementara hanya 9 isolat yang masih memiliki kedua plasmid lengkap (pXO1+/pXO2+). Fenomena hilangnya plasmid virulensi pada sejumlah koleksi isolat lapang juga dilaporkan oleh Marston *et al.* (2005) dan Jula *et al.* (2011).

Seluruh isolat dalam penelitian ini, termasuk kedua isolat yang kehilangan plasmid tersebut, adalah isolat

yang dikultur dan diisolasi langsung dari kasus antraks klinis di lapangan. Menarik untuk dicermati bahwa ada 2 isolat (isolat nomor 18 dan 19) berasal dari kasus yang sama namun hanya isolat nomor 18 yang kehilangan plasmid pXO2. Hal ini mengindikasikan bahwa faktor eksternal memicu hilangnya plasmid tersebut. Faktor eksternal penyebab hilangnya plasmid virulen pada dua isolat dalam penelitian ini tidak dapat dijelaskan dengan pasti. Namun demikian, faktor lama penyimpanan dan pasase berulang sering dijadikan alasan hilangnya plasmid isolat *B. anthracis* (Marston *et al.*, 2005; Antwerpen *et al.*, 2011). Di samping itu, dibuktikan bahwa penyimpanan isolat *B. anthracis* pada media kultur biasa, lebih rentan mengalami kehilangan plasmid dibandingkan penyimpanan secara liofilisasi (Marston *et al.*, 2005). Faktor usia isolat mungkin menjadi alasan tingginya proporsi isolat yang mengalami kehilangan plasmid pada penelitian Antwerpen *et al.* (2011) yaitu 31/40 atau 77,5% dibandingkan pada penelitian ini sebesar 2/22 atau 1%. Isolat-isolat dalam penelitian ini usia penyimpanannya rata-rata masih kurang dari 10 tahun.

Kehilangan plasmid dan virulensi ini diduga bersifat tidak dapat balik (*irreversible*) atau sebaliknya, sehingga perlu diteliti dengan inokulasi isolat mutan pada hewan coba yang peka dan kemudian dikonfirmasi secara fenotipe dan molekuler. Konfirmasi molekuler tidak saja berkaitan dengan keberadaan pita plasmid pXO1 dan pXO2 tetapi juga dilakukan *sequencing* untuk memastikan *sequence* nukleotida gen target pada kedua plasmid tersebut.

KESIMPULAN

Aplikasi PCR multiplex dengan memanfaatkan primer yang memiliki target pada gen dalam plasmid pXO1 dan pXO2 dapat mengonfirmasi status virulensi isolat-isolat *Bacillus anthracis*. Sebagian besar koleksi isolat asal Nusa Tenggara dan Papua (91%) masih memiliki kedua plasmid secara lengkap (pXO1⁺/2⁺) dan karena itu bersifat virulen, sedangkan dua isolat lain (9%) telah kehilangan salah satu plasmid virulennya sehingga bersifat avirulen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Direktur Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian RI, atas pemberian rekomendasi penelitian; dan kepada Kepala Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor yang telah memberikan izin dan akses pemanfaatan koleksi isolat *B. anthracis* dan fasilitas laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Akoso, B.T. 2009. **Epidemiologi dan Pengendalian Antraks**. 2009. Kanisius, Yogyakarta.
- Djohar, S.K. 2010. Kajian kasus kontrol antraks di Flores dengan desa sebagai unit kajian. **Tesis**. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

- Elnifro, E.M., A.M. Ashshi, R.J. Cooper, and P.E. Klapper. 2000. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. **Clin. Microbiol. Rev.** 13:559-570.
- Hoffmaster, A.R., C.C. Fitzgerald, E. Ribot, L.W. Mayer, and T. Popovic. 2002. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, United States. **Emerg. Infect. Dis.** 8:1111-1116.
- Inoue, S., A. Noguchi, K. Tanabayashi, and A. Yamada. 2004. Preparations of a positive control DNA for molecular diagnosis of *Bacillus anthracis*. **Jpn. J. Infect. Dis.** 57:29-32.
- Keim, P., L.B. Price, A.M. Klevytska, K.L. Smith, J.M. Schupp, R. Okinaka, P.J. Jackson, and M.E. Hugh-Jones. 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. **J. Bacteriol.** 182:2928-2936
- Ko, K.S., J.M. Kim, J.K. Kim, B.Y. Jung, W. Kim, I.J. Ik Jung Kim, and Y.H. Kook. 2003. Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.** 41:2908-2914
- Koehler, T.M. 2009. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. **Mol. Aspects Med.** 30:386-396.
- Kumar, S., U. Urmil Tuteja, K. Sarika, and O. Kumar. 2012. A multiplex PCR assay for the simultaneous identification of virulent & avirulent *Bacillus anthracis* targeting genes of plasmids and chromosomal DNA. **Indian J. Med. Res.** 135:917-919.
- Marston, C.K., A.R. Hoffmaster, K.E. Wilson, S.L. Bragg, B. Plikaytis, P. Brachman, S. Johnson, A.F. Kaufmann, and T. Popovic. 2005. Effects of long-term storage on plasmid stability in *Bacillus anthracis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 71:7778-7780.
- Okinaka, R.T., K. Cloud, O. Hampton, A.R. Hoffmaster, K.K. Hill, P. Keim, T.M. Koehler, G. Lamke, S. Kumano, J. Mahillon, D. Manter, Y. Martinez, D. Ricke, R. Svenson, and P.J. Jackson. 1999. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. **J. Bacteriol.** 181:6509-6515.
- Putra, A.A.G. 2011. **Antrax di Nusa Tenggara**. Direktorat Jenderal Peternakan & Kesehatan Hewan, Kementerian Pertanian RI, Jakarta.
- Ramisse, V., G. Patra, H. Garrigue, J.L. Guesdon, and M. Mock. 1996. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. **FEMS Microbiology Letters** 145:9-16.
- Ravel, J., L. Jiang, S.T. Stanley, M.R. Wilson, R.S. Decker, T.D. Read, P. Worsham, P.S. Keim, S.L. Salzberg, C.M. Fraser-Liggett, and D.A. Rasko. 2009. **J. Bacteriol.** 191:445-446.
- WHO. 1998. Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals. 3rd ed. World Health Organization. Geneva. http://www.who.int/csr/resources/publications/anthrax/whoemczi986_text.pdf.
- WHO. 2008a. Anthrax in Humans and Animals. 4th ed. World Health Organization. Geneva. http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241547536_eng.pdf.
- WHO. 2008b. Anthrax in Humans and Animals. 4th ed. World Health Organization. Geneva. http://www.who.int/csr/resources/publications/anthrax_web_colour.pdf.
- Young, J.A.T. and R.J. Collier. 2007. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. **Annu. Rev. Biochem.** 76:243-65.