

ДА ЛИ ЈЕ ДИФТЕРИЈА ЗАБОРАВЉЕНА БОЛЕСТ?

Љилјана Павловић,¹ Владан Шапоњић,¹ Славица Дацић,¹ Христина Господиновић,¹ Драгомир Јовановић²¹ Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут”, Београд, Србија² Гинеколошко-акушерска клиника „Народни фронт”, Београд, Србија

IS DIPHTHERIA A FORGOTTEN DISEASE?

Ljiljana Pavlović,¹ Vladan Šaponjić,¹ Slavica Dacić,¹ Hristina Gospodinović,¹ Dragomir Jovanović²¹ Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanović Batut”, Belgrade, Serbia² Obstetrics and Gynaecology Clinic “Narodni front”, Belgrade, Serbia

Сажетак

Дифтерија је тешка заразна болест која се може спречити вакцинацијом. У протеклих неколико деценија се поново јавља у вези са смањеним обухватима вакцинацијом у земљама захваћеним ратом или социјалним немирима. Мигрантска криза је током протекле деценије додатно утицала на поновно јављање дифтерије, посебно кожных облика. С друге стране, у многим земљама се дифтерија сматра елиминисаном zarazом те се временом смањила и позорност према овој инфекцији, као и ниво знања о лабораторијској и клиничкој дијагностици. Сумња на могуће присуство кожных или респираторних форми дифтерије код миграната који пролазе тзв. Балканском рутом иницирала је разматрање успостављања система активног надзора у циљу раног препознавања могућих случајева, адекватног узорковања, лабораторијског тестирања, лечења и примене одговарајућих мера према изложеним контактима. Циљ овог прегледног чланка је да се подигне ниво свести лекара који могу доћи у контакт са оболелима од дифтерије, као и да се обнове знања потребна за адекватну лабораторијску потврду дијагнозе и надзор. У раду је приказан преглед актуелне литературе у овој области, као и препоруке за лабораторијски рад и надзор.

Кључне речи: *Corynebacterium diphtheriae*, дифтерија, дифтерични токсин

Abstract

Diphtheria is a severe infectious disease that can be prevented by vaccination. In the past few decades, it has re-emerged in connection with reduced vaccination coverage in the countries affected by war or social unrest. During the past decade, the migrant crisis additionally influenced the reappearance of diphtheria, especially its cutaneous forms. On the other hand, in many countries, diphtheria is considered an eliminated infection, and over time attention paid to this disease has decreased, as has the level of knowledge about laboratory and clinical diagnostic methods. Suspicion of the cutaneous or respiratory forms of diphtheria potentially present in migrants who pass the so-called Balkan route initiated the establishment of an active surveillance system to be considered with the aim of early detection of potential cases, adequate sampling, laboratory testing, treatment and implementation of relevant measures regarding exposed contacts. The aim of this review article was to raise the level of awareness of physicians who may come into contact with diphtheria patients, as well as to revise the knowledge required for adequate laboratory confirmation of the diagnosis and supervision. The paper presents an overview of the current literature in this field, as well as recommendations for laboratory work and supervision.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*, diphtheria, diphtheria toxin

Увод

Дифтерија је заразна болест која се најчешће манифестује у респираторној или кожној форми и може имати тешку клиничку слику, а без лечења и летални исход. Изазивачи болести су потенцијално токсигене бактерије рода *Corynebacterium*: *C. diphtheriae* (по којој је и названа), *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*. Вакцинација против дифтерије се од друге половине 20. века спроводи рутински, те дифтерија данас спада у болести које се могу спречити вакцинама.

Масовна рутинска имунизација дуги низ година показује успех у спречавању и сузбијању великог броја заразних болести на нивоу света, али под одређеним окол-

Introduction

Diphtheria is an infection that is most often manifested in the respiratory or cutaneous forms and can have a severe clinical presentation and, without treatment, it can be the cause of deaths. The causative agents of this disease are potentially toxigenic bacteria belonging to the *Corynebacterium* genus: *C. diphtheriae* (after which the infection was named), *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis*. Since the second half of the 20th century, routine immunization against diphtheria have been used and today diphtheria is one of the diseases that can be prevented by vaccination.

For many years, routine mass immunization has been successful in preventing and controlling a large number of

ностима обухват имунизацијом може бити угрожен. То доводи до могућности поновне појаве ових болести укључујући и дифтерију и то не само на нивоу спорадичних случајева, већ и у епидемијском облику [1, 2]. Стога епидемиологија заразних болести против којих се врши вакцинација, па и епидемиологија дифтерије, пре свега зависи од обухвата вакцинацијом. Поред обухвата у појединачним земљама, неопходно је узети у обзир све чешће и све обимније миграције становништва на глобалном нивоу, односно кретање популација различитог (и често непознатог) вакциналног статуса [3]. Остали фактори који могу утицати на епидемиолошку слику дифтерије су одложена дијагноза дифтерије као и растући удео дифтерије узроковане другим потенцијално токсигеним врстама рода *Corynebacterium*, поред *C. diphtheriae*. У складу с тим су, поред имунизације, за контролу и сузбијање ширења дифтерије значајни: тачна и благовремена микробиолошка дијагноза болести, идентификација контаката и носилаца и клиничко лечење пацијената [4, 5].

Као што је очекивано, број случајева дифтерије је низак у земљама где је обухват вакцином дифтерија-тетанус-пертусис (DTP3) висок и обратно. У мета-анализи спроведеној на подацима из великог броја земаља, невакцинисани пацијенти су чинили 32% случајева у земљама у којима се јављају спорадични случајеви, док је у земљама са високим бројем случајева удео невакцинисаних међу пацијентима оболелим од дифтерије већи од 65%. Поред тога, у земљама са ниским обухватом DTP3 вакцинацијом, већину случајева чине деца млађа од 15 година [3]. Субоптималном обухвату вакцинацијом могу допринети различити фактори као што су привремена несташица вакцина или, све чешће, опадање поверења у вакцинацију. Неповећење исказују родитељи, али и део педијатара, што битно омета спровођење програма имунизације и дугорочно компромитује њене ефекте [2].

У земљама захваћеним ратом или социјалним немирима обухват вакцинацијом је додатно угрожен, а миграција становништва управо из ових земаља је у значајном порасту током последњих неколико деценија. У Европи је у 2019. години живело око 90 милиона миграната, што чини око 15% становништва Европе и више од једне трећине миграната у свету [1, 3]. Значајан део миграната који бораве у Европи пролази тзв. Балканском рутом. Сумња на могуће присуство кожных или респираторних форми дифтерије код ових миграната иницирала је разматрање успостављања система активног надзора у циљу раног препознавања могућих случајева, адекватног узорковања, лабораторијског тестирања, лечења и примене одговарајућих мера према

infectious diseases worldwide, however, under certain circumstances immunization coverage may be compromised. This leads to the possible reappearance of these diseases, including diphtheria, not only at the level of sporadic cases, but also in an epidemic form [1, 2]. Therefore, the epidemiology of infectious diseases against which immunization is carried out, including the epidemiology of diphtheria, primarily depends on immunization coverage. In addition to coverage in individual countries, it is necessary to take into account the more frequent and more extensive population migrations at the global level i.e., the movement of people with different (and often unknown) vaccination status [3]. Other factors that may affect the epidemiological picture of diphtheria are the delayed diagnosis of diphtheria as well as the growing percentage of diphtheria cases caused by other potentially toxigenic species of the *Corynebacterium* genus, in addition to *C. diphtheriae*. Accordingly, accurate and timely microbiological diagnosis of the disease, identification of contacts and carriers, and clinical treatment of patients are important, in addition to immunization, and in order to control and suppress the spread of diphtheria [4, 5].

As expected, the number of diphtheria cases is small in countries where diphtheria-tetanus-pertussis (DTP3) vaccine coverage is high, and vice versa. In a meta-analysis conducted on data collected from a large number of countries, unvaccinated patients accounted for 32% of cases in countries with sporadic cases, while in countries with a high number of cases, the share of unvaccinated patients among those with diphtheria was greater than 65%. In addition, in countries with low DTP3 vaccination coverage, the majority of cases included children under 15 years of age [3]. Various factors can contribute to suboptimal vaccination coverage, such as temporary vaccine shortages or, increasingly, declining confidence in vaccination. Distrust is expressed by parents, as well as by some pediatricians, which significantly hinders the implementation of the immunization program and compromises its effects in the long term [2].

In the countries affected by war or social unrest, vaccination coverage is further compromised, and population migration from these countries has been increasing significantly over the last few decades. About 90 million migrants lived in Europe in 2019, which accounts for about 15% of European population and more than one third of migrants in the world [1, 3]. A significant number of migrants staying in Europe go along the so-called Balkan route. Suspicion of the cutaneous or respiratory forms of diphtheria potentially present in these migrants initiated the establishment of an active surveillance system to be considered with the aim of early detection of possible cases, adequate sam-

изложеним контактима.

Тачна микробиолошка дијагностика болести је од пресудног значаја. У земљама у којима је дифтерија елиминисана или се јавља спорадично, временом јој се придаје мање пажње, а ниво знања о клиничкој и лабораторијској дијагностици се снижава, те дијагноза може бити одложена. То доводи до високог леталитета који у неендемским земљама достиже ниво сличан оном пре масовне имунизације, око 16% [6]. Стога су, без обзира на мали број или тренутно одсуство случајева, у земљама неопходни адекватни лабораторијски капацитети који укључују континуирано одржавање довољног броја обученог особља, лабораторијску опрему, усавршавање у иновативним методама и техникама као што су молекуларна типизација и секвенционирање гена и стабилно финансирање [4].

Постављање дијагнозе је додатно отежано појавом нетоксигених сојева *C. diphtheriae* са атипичним током болести у коме се јављају и системске компликације, као што су ендокардитис, миокардитис, септички артритис и тешке епизоде гушобоље које се понављају.

Сви наведени фактори доприносе поновној појави дифтерије, сматране „старом болешћу” која је још увек изазивала велике епидемије и била смртоносна у првим деценијама 20. века када је преживљавање увелико зависило од доступности дифтеричног антитоксина [7], а већ од друге половине 20. века је „побеђена” масовном имунизацијом. Међутим, услед раније наведених фактора, број случајева у свету флукутира са повременим пиковима. Током 2015–2019, епидемије дифтерије су се догодиле у земљама захваћеним социоекономским кризама и/или оружаним сукобима: у Јемени, Бангладешу, на Хаитију и у Венецуели. Епидемија у Бангладешу је била највећа међу скорашњим епидемијама, са 8403 случаја међу избеглицама из суседног Мианмара (припадници народа Рохинџа). Ове епидемије су захватиле све старосне групе [3, 8].

Расту броја случајева, посебно у Европи, доприносе инфекције другим потенцијално токсигеним врстама: *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*. Ове врсте изазивају зоонозе, а *C. ulcerans* преузима примат у инфекцијама детектованим код људи. Токсигене врсте *C. ulcerans* изоловане су и код различитих врста домаћих животиња [5]. Тиме се појачава потреба да се идентификују потенцијално токсигене коринебактерије, посебно у областима високог ризика. Значајна је интердисциплинарна сарадња лекара који могу срести пацијенте оболеле од дифтерије у својој клиничкој пракси, лабораторија, сектора епидемиологије, а у светлу скоријег изолова-

pling, laboratory testing, treatment and implementation of relevant measures in respect to exposed contacts.

Accurate microbiological diagnosis of the disease is of crucial importance. In countries where diphtheria has been eliminated or occurs sporadically, attention paid to this infection has decreased over time, and so has the level of knowledge about clinical and laboratory diagnostics, therefore, the diagnosis can be delayed. This leads to high mortality, which in non-endemic countries reaches a level similar to that present before mass immunization i.e., about 16% [6]. Therefore, regardless of the small number of cases or currently absent cases, countries need adequate laboratory capacities that include the continuous maintenance of a sufficient number of trained staff, laboratory equipment, training on innovative methods and techniques such as molecular typing and gene sequencing, and stable funding [4].

The diagnosis is further complicated by the appearance of non-toxigenic strains of *C. diphtheriae* with an atypical course of the disease presenting with systemic complications, such as endocarditis, myocarditis, septic arthritis and severe recurrent episodes of sore throat.

All of the above factors contribute to the re-emergence of diphtheria, which is considered an “old disease” that caused large epidemics and was deadly in the first decades of the 20th century when survival depended largely on the availability of diphtheria antitoxin [7], and since the second half of the 20th century has been “defeated” by mass immunization. However, due to the previously mentioned factors, the number of cases worldwide fluctuates with occasional peaks. During the period of 2015–2019, diphtheria outbreaks occurred in the countries affected by socioeconomic crises and/or armed conflicts: Yemen, Bangladesh, Haiti, and Venezuela. The outbreak in Bangladesh was the largest one among recent outbreaks, with 8,403 cases among refugees from neighboring Myanmar (members of the Rohingya people). All age groups were affected by these epidemics [3, 8].

Infections caused by other potentially toxigenic species: *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis* contribute to the increase in the number of cases, especially in Europe. These species cause zoonoses, and *C. ulcerans* is the leading cause of infections detected in humans. Toxigenic species of *C. ulcerans* have also been isolated in various domestic animals [5]. This reinforces the need to identify potentially toxigenic corynebacteria, especially in high-risk areas. The interdisciplinary cooperation between physicians who may meet diphtheria patients in their clinical practice, laboratories, epidemiology sector, and in light of the recent isolation

ња *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* и ветеринарског сектора, те је адекватно применити и приступ „Једно здравље”.

Од четири биотипа које ствара *C. diphtheriae*: *gravis*, *mitis*, *intermedius* и *belfanti*, за биотип *belfanti* је таксономским студијама недавно показано да представља грану која је јасно разграничена од *C. diphtheriae* биотип *mitis* и *gravis*. На основу ових налаза је предложена нова врста, *Corynebacterium belfantii* sp. nov [9].

Циљ овог рада је да се кроз преглед литературе пружи потребан ниво знања из области надзора над дифтеријом, нарочито у домену лабораторијске дијагностике, и да се тиме подигне ниво свести лекара који могу доћи у контакт са оболелима од дифтерије у циљу благовременог препознавања могућих случајева и адекватног поступања са оболелом особом.

Потенцијално токсигене врсте коринебактерија

C. diphtheriae

Дифтеријски токсин је главни фактор вируленције бактерије *C. diphtheriae* и доводи до тешких клиничких компликација као што су респираторна опструкција, миокардитис и неуролошка оштећења. Токсин дифтерије је протеин кодиран бактериофагом и поред *C. diphtheriae* производе га и друге две потенцијално токсичне врсте, *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*.

И током рутинског скрининга и током истраживања могућег случаја, лабораторијска дијагностика подразумева детекцију токсина као најважнији тест, који се први и без одлагања спроводи на било ком изолату за који постоји сумња на дифтерију. Реакцијом ланчане полимеризације (PCR) може се детектовати ген за токсин дифтерије директно из клиничких узорака. Неопходно је култивисати све позитивне узорке, а изолате тестирати на производњу токсина дифтерије. За спречавање ширења болести кључно је и идентификовати контакте, потенцијалне клицоноше.

C. ulcerans

C. ulcerans може да произведе дифтеријски токсин имунолошки веома сличан оном који експримира *C. diphtheriae*, јер поседује ген за токсин који се налази на лизогеном бактериофагу. Истовремено, организам може да производи и егзотоксин, фосфолипазу Д, у различитим размерама [10].

of *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis*, the veterinary sector as well, is important, therefore, it is appropriate to apply the “One Health” approach.

Among the four biotypes created by *C. diphtheriae*: *gravis*, *mitis*, *intermedius* and *belfanti*, the *belfanti* biotype has recently been shown, by taxonomic studies, to represent a branch that is clearly demarcated from *C. diphtheriae* biotypes *mitis* and *gravis*. Based on these findings, a new species was proposed, *Corynebacterium belfantii* sp. nov [9].

The aim of this paper was to provide, through an overview of the literature, the necessary level of knowledge in the field of diphtheria surveillance, especially in the domain of laboratory diagnostic methods, and thereby to raise the level of awareness of physicians who may come into contact with diphtheria patients with the aim of timely detection of possible cases and providing adequate treatment of such patients.

Potentially toxigenic corynebacterium species

C. diphtheriae

The main virulence factor of *C. diphtheriae* is diphtheria toxin, which leads to severe clinical complications such as respiratory obstruction, myocarditis and neurological disorders. Diphtheria toxin is a protein encoded by bacteriophages and, in addition to *C. diphtheriae*, it is produced by two other potentially toxic species, *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis*.

Both during routine screening and examination of a possible case, laboratory diagnostics includes toxin detection as the most important test, which is performed first and without delay on any isolate suspected of diphtheria. Polymerase chain reaction (PCR) can detect the diphtheria toxin gene directly from clinical samples. It is necessary to culture all positive samples, and to test isolates for diphtheria toxin production. To prevent the spread of the disease, it is crucial to identify contacts i.e., potential germ carriers.

C. ulcerans

C. ulcerans can produce a diphtheria toxin immunologically very similar to that expressed from *C. diphtheriae*, as it possesses toxin genes found to be carried by lysogenic bacteriophages. At the same time, the organism can also produce the exotoxin phospholipase D, in different proportions [10].

C. ulcerans is a ubiquitous bacterium and can be found

C. ulcerans je убиквитарна бактерија и може се наћи у широком спектру домаћина. Поред говеда и коза, код којих је раније изолована, у скорије време ова бактерија је нађена код свиња, кућних љубимаца, али и многих врста дивљих животиња [11]. Идентификована је као редак узрочник говеђег маститиса [12]. Инфекција вишена може бити дуготрајна, док излучивање у млеко може бити повремено. Стога *C. ulcerans* утиче и на безбедност хране, јер је сирово млеко идентификовано као један од извора инфекције код људи. *C. ulcerans* је пронађен и код клинички оболелих, али и код здравих дивљих и домаћих животињских врста [11].

C. pseudotuberculosis

Слично врсти *C. ulcerans*, и *C. pseudotuberculosis* има способност да производи дифтеријски токсин који садржи ген који се преноси фагом, али и егзотоксин фосфолипазу Д. Овај ензим функционише као сфингомијелиназа и делује на васкуларне ендотелне ћелије, што може објаснити његову способност да повећа васкуларну пермеабилност и поспеши ширење инфекције кроз лимфни систем домаћина. Фосфолипаза посредује у избегавању имуног одговора инхибиторним ефектом на фагоците. Отпорности на убијање од стране фагоцита доприносе и миколичне киселине у цитотоксичном површинском липидном омотачу, које олакшавају интрацелуларно преживљавање и формирање апсцеса [13]. Према способности разградње нитрата *C. pseudotuberculosis* је класификован у два биотипа, где оба производе егзотоксин али се сојеви могу разликовати у патогености услед варијација у производњи токсина [1].

C. pseudotuberculosis изазива казеозни лимфаденитис код оваца и коза, који се манифестује површинским или унутрашњим апсцесима. Површински апсцеси који захватају лимфне чворове су чешћи и лако уочљиви, док се инфекција манифестована унутрашњим лезијама може открити само на обдукцији [14]. Инфекција овом врстом се јавља и код крава и коња, где изазива улцеративни лимфангитис. Код говеда се јављају и пиогрануломатозне реакције, формирање апсцеса и маститичне и висцералне форме, док се и код коња јављају спољашњи и унутрашњи апсцеси. *C. pseudotuberculosis* се преноси са животиње на човека, директним контактом са зараженом животињом или месом заражене животиње. Стога је већина пријављених инфекција у руралном окружењу и то међу сеоским овчарима или код месара, као акутни или хронични лимфаденитис. Поред тога, *C. pseudotuberculosis* је детектован и у козјем и крављем млеку [1].

in a wide range of hosts. In addition to cattle and goats, in which it was previously isolated, this bacterium has recently been found in pigs, pets, and many wild animal species [11]. It has been detected as a rare cause of bovine mastitis [12]. Infections of the udder can be long-lasting, while excretion in milk can be intermittent. Therefore, *C. ulcerans* can also affect food safety, as raw milk has been identified as one of the sources of infection in humans. *C. ulcerans* has been found in clinical patients as well as in healthy wild and domestic animal species [11].

C. pseudotuberculosis

Similar to the *C. ulcerans* species, *C. pseudotuberculosis* has the ability to produce diphtheria toxin containing phage encoded genes, but also the exotoxin phospholipase D. This enzyme functions as a sphingomyelinase and affects vascular endothelial cells, which may explain its ability to increase vascular permeability and promote the spread of infection through the host's lymphatic system. Phospholipase mediates evasion of the immune response by an inhibitory effect on phagocytes. Mycolic acids found in the lipid-rich cell walls, facilitating intracellular survival and abscess formation, also contribute to resistance to phagocytosis [13]. According to ability to break down nitrates, *C. pseudotuberculosis* is classified into two biotypes, both producing exotoxin, but their strains can differ in pathogenicity due to variations in toxin production [1].

C. pseudotuberculosis causes caseous lymphadenitis in sheep and goats, which manifests as superficial or internal abscesses. Superficial abscesses involving lymph nodes are more common and easily visible, while infections manifested as internal lesions can only be detected at autopsy [14]. Infections caused by this species also occur in cows and horses, where it causes ulcerative lymphangitis. Pyogranulomatous reactions, abscess formation and mastitic and visceral forms also occur in cattle, while external and internal abscesses are also found in horses. *C. pseudotuberculosis* is transmitted from animals to humans by direct contact with an infected animal or through the meat of an infected animal. Therefore, most of the reported infections are in rural areas, among rural shepherds or in butchers, as acute or chronic lymphadenitis. In addition, *C. pseudotuberculosis* has been detected in both goat and cow milk [1].

Transmission and germination

The source of infection is an infected person or an asymptomatic carrier of the pathogen. The infection is transmitted through droplets from the respiratory tract, as well as through contact with respiratory secretions or the contents

Трансмисија и клицоноштво

Извор инфекције је оболела особа или асимптоматски носилац узрочника. Инфекција се преноси преко капљица из дисајних путева, као и контактом са респираторним секретима или садржајем кожных лезија особа оболелих од дифтерије. Инкубација је обично 2–5 дана, изузетно може бити и до 10 дана.

Асимптоматски пренос потенцијално токсигених коринебактерија (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*) може се јавити током периода инкубације, реконвалесценције или код здравих особа. У земљама где је дифтерија ендемична, код 3–5% здравих клицоноша се може очекивати присуство ових организама у назофаринксу. Насупрот томе, у неендемским земљама изолација потенцијално токсичних коринебактерија је релативно ретка [15]. У тропским подручјима дифтерија је често ендемска и карактеристична је кожна форма. Код путника који су се враћали из земаља са ендемском дифтеријом са инфекцијама рана утврђено је присуство токсигене кожне дифтерије. Кожне лезије могу бити извор узрочника и за фарингеалне форме болести [16].

У развијеним земљама са ниском инциденцом *C. diphtheriae* све чешће се пријављује *C. ulcerans*, где је највећи удео дифтерије изазван овом врстом. Такође постоје извештаји о преносу узрочника између људи и кућних љубимаца који могу бити потенцијални извори инфекције [11]. Зооноза је доказана молекуларном типизацијом идентичних сојева изолованих и од људи и од њихових кућних љубимаца или других домаћих животиња [17]. Иако не постоје директни докази о преносу *C. ulcerans* са особе на особу, овај пут преноса се не може искључити.

Инфекција врстом *C. pseudotuberculosis* је чешћа код животиња, док је код људи ретка. Хумане инфекције се манифестују локализованим гнојним грануломатозним лимфаденитисом са дугим и рекурентним током. Потенцијално улазно место инфекције су посекотине на кожи код особа које долазе у контакт са зараженим животињама или месом заражених животиња. Стога се дифтерија коју изазива *C. pseudotuberculosis* сматра професионалном болешћу пастира, шишача оваца, радника у кланицама и месара. Други познати ризик за инфекцију људи овим организмом је употреба зараженог непастеризованог млека.

of skin lesions of diphtheria patients. Incubation normally lasts 2–5 days, and exceptionally up to 10 days.

Asymptomatic transmission of potentially toxigenic corynebacteria (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis*) can occur during incubation period, convalescence stage or in healthy individuals. In countries where diphtheria is endemic, the presence of these organisms in the nasopharynx can be expected to be found in 3–5% of healthy carriers. In contrast, in non-endemic countries, the isolation of potentially toxigenic corynebacteria is relatively rare [15]. In tropical regions, diphtheria is often endemic and the skin form is typical. The presence of toxigenic cutaneous diphtheria has been found in travelers returning from countries with endemic diphtheria including wound infections. Skin lesions can be a source of causative agents for pharyngeal forms of the disease as well [16].

In developed countries with a low incidence of *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* is increasingly being reported, where the largest percentage of diphtheria cases is caused by this species. The transmission of pathogens between humans and pets, which may be potential sources of the infection, is also reported [11]. Zoonosis has been proven by molecular typing of identical strains isolated from both humans and their pets or other domestic animals [17]. Although there is no direct evidence of person-to-person transmission of *C. ulcerans*, this route of transmission cannot be ruled out.

Infections caused by the *C. pseudotuberculosis* species are more common in animals, while they are rare in human hosts. Human infections are manifested by localized purulent granulomatous lymphadenitis with a long and recurrent course. Cuts in the skin of people who come into contact with infected animals or the meat of infected animals represent a potential entry point for the infection. Therefore, diphtheria caused by *C. pseudotuberculosis* is considered an occupational disease of shepherds, sheep shearers, slaughterhouse workers and butchers. Another identified risk for human infections caused by this organism is the use of contaminated unpasteurized milk.

Significance and use of serological testing of population and individual immunity/susceptibility to diphtheria

In addition to the reduced vaccination coverage, the lack of immunity in adults can contribute to the outbreak and increased incidence of epidemics worldwide. This lack of immunity may not only be the result of a previous drop in coverage or temporarily reduced availability of vaccines (especially due to natural disasters and wars that threatened the operation of healthcare systems and pub-

Значај и примена серолошког тестирања популације и индивидуалног имунитета/осетљивости на дифтерију

Поред смањеног обухвата вакцинацијом, настанку и порасту учесталости епидемија у свету може допринети недостатак имунитета код одраслих. Овај недостатак имунитета не мора бити само последица претходног пада у обухвату или привремено смањене доступности вакцина (посебно услед природних катастрофа и ратова који су угрозили рад здравствених система и јавно-здравствених служби), већ и могућег опадања имунитета током времена. Због тога је СЗО од 2018. године у своје препоруке, поред три дозе ДТП3 вакцине у првих шест месеци живота, уврстила и три ревакцинације против дифтерије до 15. године живота. Ове препоруке су и део Календара обавезне имунизације у Републици Србији. С обзиром на новија сазнања о дифтерији и повећање броја случајева дифтерије у различитим регионима света, ревакцинације су, поред основне три дозе, од изузетног значаја за колективни имунитет.

За одбрану од инфекције дифтеријом одговоран је пре свега хуморални имунитет, а како је морбидитет од дифтерије скоро у потпуности последица токсина дифтерије, заштита од болести посредована је антителима против тог токсина. У неким европским земљама спроведене су студије популационог имунитета коришћењем теста неутрализације токсина (ТНТ) на култури ткива на *Vero* ћелијама, ензимског имуносорбентног теста (ELISA), имунолошког теста флуоресценције лантанида (DELFIА), теста инхибиције везивања токсина (ТоВI) или пасивне хемаглутинације [18].

Поред примене у процени имунолошког статуса популације или појединца, серолошка испитивања могу бити корисна и за лабораторијску дијагнозу дифтерије, с обзиром на то да током инфекције титрови антитела против патогена (па и против токсина) у серуму расту. Ипак, титар антитела није препоручени критеријум за потврду [1].

Тест неутрализације токсина на култури ћелија је златни стандард за *in vitro* одређивање антитела. Међутим, недостаци овог теста су дуго време потребно за извођење теста и захтеви које морају испуњавати специјализовани објекти за гајење културе ткива. Ово су ограничавајући фактори за примену у клиничким лабораторијама, те су развијени бројни имунобиохемијски тестови. Предности и недостаци ових тестова ће бити размотрени нешто касније, али лакоћа извођења, као главна заједничка предност имунобиохемијских метода, их чини најчешћим избором за испитивање имуни-

lic health services), but also of a possible weakening of immunity over time. Therefore, since 2018, the WHO has included three booster doses of vaccine against diphtheria that should be given until the age of 15, in addition to three DTP3 vaccine doses given in the first six months of life, in its recommendations. These recommendations are part of the mandatory immunization schedule in the Republic of Serbia. Considering the newly-gained knowledge about diphtheria and the increase in the number of diphtheria cases in different regions of the world, booster doses, in addition to the basic three vaccine doses, are extremely important for collective immunity.

Humoral immunity is primarily responsible for defense against diphtheria infection, and since diphtheria morbidity is almost entirely caused by diphtheria toxin, protection against the disease is mediated by antibodies acting against this toxin. In some European countries, population immunity studies have been conducted by the application of toxin neutralization test (TNT) in the *Vero* cell cultures, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay (DELFIА), toxin binding inhibition (ТоВI) test or by passive hemagglutination method [18].

In addition to being used in the assessment of the immune status of a population or an individual, serological tests can also be useful for the laboratory diagnosis of diphtheria, considering that the antibody titers against the pathogen (even against the toxin) in the serum increase in the course of the infection. However, antibody titers are not the recommended confirmation criteria [1].

The toxin neutralization test in cell culture is considered the gold standard for *in vitro* measuring of antibodies. However, the disadvantages of this test include the long time needed to perform the test and the requirements that must be met by specialized tissue culture facilities. These are limiting factors for the application in clinical laboratories, and a number of immunobiochemical tests have been developed. The advantages and disadvantages of these tests will be discussed below, but the ease of performance, as the main common advantage of immunobiochemical methods, makes them the most common choice for testing the immunity of the population and individual patients. However, due to the variability of these methods (especially between different laboratories and countries), the dependence on critical reagents and the limited number of validation studies, the use of a common protocol and well-defined standardized reagents is required [19]. The limitations of these methods in respect to measuring protective antibody levels should always be taken into consideration when performing immunity tests. In order

тета популације и појединачних пацијената. Ипак, због варијабилности ових метода (посебно између различитих лабораторија и земаља), зависности од критичних реагенаса и ограниченог броја валидационих студија, потребна је употреба заједничког протокола и добро дефинисаних стандардизованих реагенаса [19]. Увек треба имати на уму ограничења ових метода у одређивању заштитних нивоа антитела при испитивању имунитета. Како би се обезбедила тачност и репродукцибилност, али и омогућило поређење података из различитих клиничких испитивања и студија популационог имунитета, имунобиохемијски тестови морају бити валидирани и стандардизовани применом међународног стандардног препарата или на одговарајући начин калибрисаног секундарног референтног препарата, а титри антитела треба да буду изражени у интернационалним јединицама. Препоручује се употреба Међународног стандарда СЗО за дифтеријски антиотоксин (*Human, NIBSC product code 10/262*) за који је потврђено да је погодан за калибрацију имунобиохемијских тестова за дифтерију у студијама имунитета становништва. Показало се да је стандард подударан са узорцима људског серума у најчешће коришћеним тестовима. Употреба овог стандарда ће дати бољи увид у перформансе примењеног теста [20].

Процедуре за испитивање антиотоксина дифтерије

Историјски, одређивање дифтеријског антиотоксина је вршено *in vivo*. Најраније методе за мерење нивоа антиотоксина у серуму заснивале су се на титрацији токсина дифтерије и одређивању неутрализационог капацитета серумског антиотоксина употребом крви замораца као осетљивог детекционог система. Развили су их крајем 19. века *Behring, Ehrlich* и *Roux*. Европска фармакопеја и даље прописује методу на заморцима за одређивање нивоа антиотоксичних глобулина у животињским серумима намењеним за имунотерапију (хиперимуни серумима коња или других сисара). Због очигледних недостатака рутинске примене тестова на животињама (етичке дилеме, логистички захтеви одржавања виваријума и експеримената на животињама, висока цена и велике количине серума потребне за испитивање), развијена је *in vitro* алтернатива која за тест неутрализације токсина (TNT) користи културе *Vero* ћелија. [21]. *Vero* ћелије су идентификоване као погодан модел за специфичну детекцију функционалних антитела против дифтерије и у хуманим и у животињским серумима.

Тест се изводи на плочама за културу ткива са више бунарчића у којима се ћелије осетљиве на токсин дифтерије (најчешће *Vero* ћелије) инкубирају са сме-

to ensure accuracy and reproducibility, but also to enable comparison of data from different clinical trials and population immunity studies, immunobiochemical tests must be validated and standardized using an international standard preparation or an appropriately calibrated secondary reference preparation, and antibody titers should be expressed in international units. The use of the WHO International Standard for diphtheria antitoxin (Human, NIBSC product code 10/262) is recommended and has been confirmed to be suitable for calibration of immunobiochemical tests for diphtheria in population immunity studies. The standard has been shown to match human serum samples in the most commonly used assays. The use of this standard will provide a better insight into the performances of the test applied [20].

Diphtheria Antitoxin Testing Procedures

Traditionally, the detection of diphtheria antitoxin was performed *in vivo*. The earliest methods for measuring serum antitoxin levels were based on diphtheria toxin titration and on determining the neutralizing capacity of serum antitoxin in guinea pig blood as a sensitive detection system. They were developed at the end of the 19th century by *Behring, Ehrlich* and *Roux*. The European Pharmacopoeia still prescribes the guinea pig method for measuring the level of antitoxic globulins in animal serum intended for immunotherapy (hyperimmune sera of horses or other mammals). Due to the obvious drawbacks of the routine application of animal tests (ethical dilemmas, logistic requirements for maintaining vivariums and animal experiments, high cost and large amounts of serum required for testing), an *in vitro* alternative using *Vero* cell cultures for the toxin neutralization test (TNT) has been developed [21]. *Vero* cells have been identified as a suitable model for the specific detection of functional diphtheria antibodies in both human and animal sera.

The assay is performed using multi-well plates for tissue culture in which cells sensitive to diphtheria toxin (most commonly *Vero* cells) are incubated with a mixture of toxin and tested or reference serum. The concentration of toxins comprised in the mixture is predefined and fixed. An increasing concentration of the tested serum and reference antitoxin of known neutralization value expressed in international units - IU is used as the second component of the mixture. The end point is determined by applying a chemical dye that can visually distinguish between live and dead cells and represents the lowest concentration of the tested and reference antitoxin, which enables *Vero* cells protection against the cytotoxic effect of diphtheria toxin. The concentration of the tested serum sample is calculated in relation to the reference standard and is expressed in IU/

шом токсина и испитиваног или референтног серума. Концентрација токсина у смеши је унапред одређена и фиксна. Као друга компонента смеше користи се растућа концентрација испитиваног серума и референтног антитоксина познате неутрализационе вредности изражене у интернационалним јединицама – и. ј. (*international units* – IU). Завршна тачка се одређује применом хемијске боје која може визуелно разликовати живе и мртве ћелије и представља најнижу концентрацију тестираног и референтног антитоксина, која може да заштити *Vero* ћелије од цитотоксичног дејства токсина дифтерије. Концентрација узорка испитиваног серума се израчунава у односу на референтни стандард и изражава се у IU/mL. Сваки тест мора да садржи позитивне и негативне контроле да би био валидан [22].

Због раније поменутих недостатака *in vitro* TNT у рутинском мерењу нивоа антитоксина дифтерије у хуманим серумима примењују се имунобиохемијске методе: ELISA, мултиплекс имуноесеј (*multiplex immunoassay*, MIA), модификоване ELISA методе, као што су имуносорбентни тест са двоструким антигеном (*double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay*, DAE) [23], dDA-DELFIА [24, 25] и ToBI [26]. Комерцијални комплети доступни за серолошка испитивања су углавном засновани на директном ELISA формату. Ови комплети се често користе у екстерним шемама за процену квалитета за тестирање антитела на дифтерију [19]. Мерење титра антитела у серуму даје критичне информације за процену имунолошког статуса појединца и осетљивости на дифтерију. У ту сврху се користе успостављени критеријуми СЗО [27] (табела 1).

mL. Each test must contain positive and negative controls in order to be valid [22].

Due to the previously mentioned shortcomings of *in vitro* TNT, in regard to the routine measurement of diphtheria antitoxin levels in human serum, immunobiochemical methods are applied as follows: ELISA, multiplex immunoassay (MIA), modified ELISA methods, such as double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay (DAE) [23], dDA-DELFIА [24, 25] and ToBI [26]. Commercial kits available for serological testing are mostly based on direct ELISA format. These kits are often used in external quality assessment schemes for diphtheria antibody testing [19]. Measurement of serum antibody titers provides critical information for assessing an individual's immune status and susceptibility to diphtheria. For this purpose, the established WHO criteria are used [27] (Table 1).

Табела 1. Нивои антитоксина и имунитет на дифтерију **Table 1.** Antitoxin levels and immunity to diphtheria

Ниво антитоксина <i>Antitoxin level</i>	Тумачење <i>Interpretation</i>
< 0,01 IU/mL	Особа је осетљива <i>The patient is sensitive</i>
0,01 IU/mL	Најнижи ниво циркулишућег антитоксина који даје одређени степен заштите <i>The lowest level of circulating antitoxin providing some degree of protection</i>
0,01–0,09 IU/mL	Ниво циркулишућег антитоксина који даје одређени степен заштите <i>The level of circulating antitoxin providing some degree of protection</i>
0,1 IU/mL	Заштитни ниво циркулишућег антитоксина <i>Protective level of circulating antitoxin</i>
≥ 0,1 IU/mL	Ниво циркулишућег антитоксина који пружа дуготрајну заштиту <i>The level of circulating antitoxin providing long-term protection</i>

Смернице за тумачење односе се на нивое антитела одређене функционалним тестом.

Interpretation guidelines refer to antibody levels determined by functional assays.

Карактеристике ELISA тестова

Characteristics of ELISA tests

ELISA и EIA су имунобиохемијске технике за одређи-

ELISA and EIA are immunobiochemical techniques for

вање концентрације антитела у серуму. ELISA је развијена као *in-house* тест, али се могу користити и неки доступни комерцијални комплети. Док TNT одређује само функционална антитела (антитела која неутралишу токсин дифтерије), ELISA детектује укупне нивое антитела. Овом врстом тестова се могу разликовати и посебно одређивати IgM или IgG антитела.

Предности у извођењу ELISA тестова су што нису скупи, брзи су, лаки за употребу, прилагодљиви за аутоматизацију и користе малу количину узорка серума, јер се узорци разблажују пре тестирања. Потенцијални недостаци су лошија корелација са *in vitro* TNT [19], посебно код серума са ниским титром антитела, ограничена тачност и прецизност зависна од опсега концентрације антитела и варијабилна осетљивост и специфичност међу различитим ELISA методама. Зависност корелације ELISA и *in vitro* TNT (изражене као Пирсонов коефицијент) од титра антитела показана је у студијама поређења серолошких метода, где је коефицијент корелације износио око $R=0,81$, али је за серуме са титром антитела испод $0,1 \text{ IU/ml}$ био знатно нижи, око $R=0,5$ [28]. Употреба различитих протокола, реагенса или комерцијалних комплета утиче на карактеристике перформанси ове методе [19]. За опсег концентрација антитела $0,1-1,0 \text{ IU/ml}$ прецизност методе је мала (коефицијент варијације је око 10%). Ова непрецизност се значајно повећава када су нивои антитела изван овог опсега [28]. Дијагностичка тачност ELISA тестова, било да се ради о *in house* или комерцијалним комплетима, у поређењу са *in vitro* TNT, је ограничена. Ово је посебно изражено код тестова који раде са граничним титром од $0,1 \text{ IU/ml}$, где није могуће разликовати серуме који пружају слабу заштиту (двосмислени, енг. *equivocal*) од оних који не пружају никакву заштиту (негативни серуми). Осетљивост и специфичност се веома разликују између различитих ELISA китова или *in-house* метода, а многи аутори су пријавили појаву лажно позитивних као и лажно негативних резултата [28, 29]. Тестови ELISA су показали 2–20 пута веће вредности антитела у узорцима са нивоима антитела нижим од $0,1 \text{ IU/ml}$ мерено *in vitro* TNT [28]. Чини се да је узрок томе осетљивост ELISA система способног да открије ниске нивое специфичног IgG који није у стању да неутралише токсин дифтерије у TNT тесту. ELISA би се могла користити у сврхе скрининга, али узорке са нивоима антитела испод $0,1 \text{ IU/ml}$ би идеално требало поново одредити помоћу *in vitro* TNT да би се утврдило да ли је вероватно да ће узорак пружити слабу или никакву заштиту. Добра пракса је постављање интервала граничних вредности у узорцима, идеално између $0,1-0,15 \text{ IU/ml}$, за које се поставља протокол поновно одређивања помоћу *in vitro* TNT [1].

measuring the concentration of antibodies in serum. The ELISA was developed as an *in-house* test, but some commercially available kits can also be used. While the TNT only detects functional antibodies (diphtheria toxin neutralizing antibodies), the ELISA test measures total antibody levels. With this type of tests, IgM or IgG antibodies can be distinguished and specifically measured.

The advantages of ELISA tests are that they are inexpensive, fast, easy to use, adaptable for automation and require a small amount of serum sample, since the samples are diluted prior to testing. Potential disadvantages include poor correlation with *in vitro* TNT [19], especially in sera with low antibody titer levels, limited accuracy and precision depending on the antibody concentration range, and variable sensitivity and specificity among different ELISA methods. The dependence of the correlation of ELISA and *in vitro* TNT (expressed as Pearson's coefficient) on the antibody titer has been shown in studies comparing serological methods, where the correlation coefficient was about $R=0.81$, but for sera with an antibody titer level below 0.1 IU/ml , it was significantly lower, around $R=0.5$ [28]. The use of different protocols, reagents or commercial kits affects the performance characteristics of this method [19]. For the range of antibody concentrations of $0.1-1.0 \text{ IU/ml}$, the method precision is low (coefficient of variation is about 10%). This imprecision is significantly increased when antibody levels are beyond this range [28]. The diagnostic accuracy of ELISA tests, whether *in-house* ones or commercial kits is limited in comparison to *in vitro* TNT. This is especially marked in case of tests that use a cut-off titer value of 0.1 IU/ml , where serum providing some degree of protection i.e., *equivocal* serum cannot be distinguished from that providing no protection (negative serum). Sensitivity and specificity vary widely between different ELISA kits or *in-house* testing methods, and many authors have reported high possibility of false-positive as well as false-negative test results [28, 29]. ELISA tests have shown 2–20 times higher antibody values in samples with antibody levels lower than 0.1 IU/ml measured by *in vitro* TNT [28]. This appears to be due to the sensitivity of the ELISA system capable of detecting low levels of specific IgG that is unable to neutralize diphtheria toxin in the TNT test. ELISA could be used for screening purposes, but samples with antibody levels below 0.1 IU/ml should ideally be re-assayed by *in vitro* TNT to determine whether the sample is likely to provide some degree or no protection. It is a good practice to set a cut-off interval in samples, ideally between $0.1-0.15 \text{ IU/ml}$, for which a re-determination protocol using *in vitro* TNT is established [1].

Мултиплексни тест на бази перли или мулти-плексни имунотест (*Bead-based multiplex assay or multiplex immunoassay*)

Употребом мултиплекс тестова (*multiplex immunoassay*, MIA) могу се истовремено детектовати и квантификовати антитела на више различитих антигена у једном узорку серума. Стога су ови тестови брзи, економични, репродуцибилни и користе знатно мању количину серума од тестова који независно мере различите анализе. Погодни су за серолошки надзор и студије серопреваленте. Применом *Luminex* флуоресцентних микросфера као носача за антигене развијен је тест за одређивање серумских антитела против пет различитих антигена (тзв. пентаплекс тест): три антигена *B. pertussis* (токсин пертусиса, филаментозни хемаглутинин и пертактин), токсина дифтерије и тетануса [30]. У овом тесту антигени су двостепеном карбодиимидном реакцијом ковалентно везани за карбоксилване микросфере. За дифтерију, дифтеријски токсин даје бољи учинак од токсина [31].

Иновације у дијагностици дифтерије: молекуларне методе које потврђују присуство токсигених *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*

Током 90-их година 20. века развој дијагностичких тестова за идентификацију *C. diphtheriae* и тестова токсичности је у експанзији. Починје примена конвенционалног PCR за откривање гена *tox* који кодира токсин дифтерије. Посебна пажња се придаје биолошки активном делу токсина (фрагмент А) [32]. Дизајнирани су прајмери за различите регионе *tox* гена, а доступни су и протоколи за PCR детекцију токсина директно из клиничког материјала [33].

Метода PCR у реалном времену (RT-PCR) има две значајне предности у односу на конвенционални PCR: детекција је осетљивија и знатно бржа. Када се ДНК екстрахује из одговарајућих узорака или изолата и заврше реакционе смеше, резултати PCR-а су доступни у року од 60 до 90 минута, без даље потребе за гел електрофорезом и корацима UV детекције. Код ове методе нема потребе за токсичним бојењем етидијум бромидом. Први PCR у реалном времену за детекцију токсина објављен је 2002. године [34].

Даљи развој метода вођен је изолацијом токсигених сојева *C. ulcerans* код пацијената са болешћу налик дифтерији. Секвенционирање и поређење *tox* гена из *C. diphtheriae* и *C. ulcerans* открива разлике између токсигених секвенци ове две врсте [35]. Показано је да услед ових разлика *Mothershed tox real-time* PCR

Bead-based multiplex assay or multiplex immunoassay

By using multiplex assays (*multiplex immunoassay*, MIA), antibodies to several different antigens can be simultaneously detected and quantified in one serum sample. Therefore, these tests are fast, cost-effective, reproducible and use significantly less amount of serum than tests that measure different analytes independently. They are suitable for serological surveillance and seroprevalence studies. Using *Luminex* fluorescent microspheres as antigen carriers, a test was developed to determine serum antibodies against five different antigens (the so-called pentaplex test): three antigens of *B. pertussis* (pertussis toxin, filamentous hemagglutinin and pertactin), diphtheria and tetanus toxins [30]. In this test, antigens are covalently coupled to carboxylated microspheres by a two-step carbodiimide reaction. For diphtheria, diphtheria toxin is more effective than toxin [31].

Innovations in the diagnosis of diphtheria: molecular methods confirming the presence of toxigenic *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*

During the 1990s, the development of diagnostic tests for the detection of *C. diphtheriae* and toxicity tests was expanding. Conventional PCR tests for detection of the *tox* gene, which encodes the diphtheria toxin, started to be used. Special attention was paid to the biologically active part of the toxin (fragment A) [32]. Primers for different regions of the *tox* gene have been designed, and protocols for PCR toxin detection directly from clinical sample material are available [33].

The real-time PCR (RT-PCR) method has two significant advantages over conventional PCR: detection is more sensitive and significantly faster. Once DNA is extracted from the appropriate samples or isolates and the reaction mixtures are completed, PCR results are available within 60 to 90 minutes, without the need for further gel electrophoresis and UV detection steps. With this method, there is no need for toxic ethidium bromide staining. The first real-time PCR for toxin detection was published in 2002 [34].

Further development of the methods was directed by the isolation of toxigenic strains of *C. ulcerans* in patients with diphtheria-like disease. Sequencing and comparison of *tox* genes from *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* reveal differences between the toxigenic sequences of these two species [35]. It has been shown that due to these differences, the *Mothershed tox real-time* PCR method is not reliable enough to detect toxins from some strains of *C. ulcerans*. In order to overcome this weakness, the *tox* gene regions

метода није довољно поуздана у детекцији токсина из неких сојева *C. ulcerans*. Како би се превазишао овај недостатак, идентификовани су региони *tox* гена који су конзервирани на нивоу секвенце код обе врсте, те су дизајнирани PCR прајмери као и хибридационе пробе из тих региона.

Развијен је и валидиран и мултиплекс *real-time* PCR за коринебактерије [36]. Овај тест идентификује *C. diphtheriae* и *C. ulcerans/C. pseudotuberculosis* који садрже и који не садрже *tox* детекцијом циљних гена: гена који кодира β -подјединицу РНК полимеразе (*rpoB*) специфичну за *C. diphtheriae*, другог *rpoB* таргета за *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* и трећег таргета за идентификацију фрагмента А токсина из било које од ове три врсте. Овај метод такође укључује интерну контролу процеса.

Други мултиплекс тестови су такође описани за идентификацију и молекуларну дискриминацију токсигених и нетоксигених *C. diphtheriae* и *C. ulcerans* користећи *tox*, *rpoB* и *dtxR* као генске мете [37]. Ови тестови могу брзо разликовати три потенцијално токсичне врсте у изолатима и клиничким узорцима, те представљају ефикасно дијагностичко средство за дифтерију [38].

Иако ретко, у неким случајевима *tox* ген није експримиран у изолатима, иако је присутан и могуће га је детектовати PCR методама. Ове нетоксигене бактерије које носе ген за токсин (енгл. *non-toxigenic toxin gene bearing, NTTBs*) такође дају позитиван резултат у PCR тестирању на присуство *tox* гена, али пошто не производе дифтеријски токсин, фенотипски тестови као што је Елек тест ће бити негативни. Како су за Елек тест потребни специјализовани реагенси и медијум, као и због дужине извођења теста, добра дијагностичка стратегија је употреба PCR теста за брзу тријажу која се може извести и директно из клиничког узорка. Негативним PCR тестом се токсичност може искључити. Тиме се штеде ресурси (реагенси потребни за извођење Елек теста) и време, а спречавају се непотребне контролне мере. Код позитивног PCR теста доказано је присуство *tox* гена и тај резултат иде у прилог дијагнози дифтерије. Међутим, како се само на основу PCR теста не може тврдити да ли се ради о заиста токсигеном или NTTB узорку, неопходно је потврдити производњу токсина Елек тестом.

Биолошки, клинички и епидемиолошки значај NTTB сојева још увек није у потпуности расветљен. Због тога пацијента треба сматрати вероватним случајем дифтерије ако је PCR резултат *tox* гена позитиван, али организам није изолован, није постављена хистопатолошка

that are conserved at the sequence level in both species have been identified, and PCR primers have been designed as well as hybridization probes from these regions.

The multiplex *real-time* PCR test for corynebacteria has been also developed and validated [36]. This test detects *C. diphtheriae* and *C. ulcerans/C. pseudotuberculosis* containing and not containing *tox* by detection of target genes: the gene encoding the β -subunit of RNA polymerase (*rpoB*) specific for *C. diphtheriae*, the second *rpoB* target for *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis* and the third target for the identification of toxin fragment A from any of these three species. This method also includes internal process control.

Other multiplex assays have also been described for the detection and molecular discrimination of toxigenic and non-toxigenic *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* using *tox*, *rpoB* and *dtxR* as gene targets [37]. These tests can rapidly distinguish three potentially toxic species in isolates and clinical samples, and represent an effective diagnostic tool for diphtheria [38].

Although rarely, in some cases the *tox* gene is not expressed from the isolates, although it is present and detectable by PCR methods. These non-toxigenic toxin gene bearing bacteria (NTTBs) also yield a positive result in PCR testing for the presence of the *tox* gene, but in phenotypic tests such as the Elek test they will be tested negative since they do not produce diphtheria toxin. Since the Elek test requires specialized reagents and media, as well as due to the test duration, a good diagnostic strategy is to use a rapid triage PCR test that can be performed directly from a clinical sample. A negative PCR test result can rule out toxicity. This saves resources (reagents needed to perform the Elek test) and time, thus avoiding unnecessary control measures. A positive PCR test result proves the presence of the *tox* gene, and supports the diagnosis of diphtheria. However, since it cannot be asserted based on the PCR test alone whether it is a truly toxigenic sample or NTTB one, it is necessary to confirm the toxin production using the Elek test.

The biological, clinical and epidemiological significance of NTTB strains has not yet been fully elucidated. Therefore, a patient should be considered a probable diphtheria case if the PCR result of the *tox* gene is positive, but with no organism isolated, no histopathological diagnosis, and no epidemiological link with a laboratory-confirmed case [1].

Molecular typing and gene sequencing

Molecular typing and subtyping methods have been ap-

дијагноза и не постоји епидемиолошка веза са лабораторијски потврђеним случајем [1].

Молекуларна типизација и секвенцирање гена

Методе молекуларне типизације и субтипизације се примењују у праћењу ширења епидемијских сојева. Овим методама се могу разликовати ендемски, епидемијски и увезени случајеви. Могуће је пратити да ли има дисеминације импортованих случајева или идентификовати могуће изворе инфекције [39]. На пример, код инфекција зоонотичком врстом *C. ulcerans* ове методе се примењују да се испита сумња на преношење са животиња, често кућних љубимаца, на људе. Молекуларна типизација се још увек изводи само у неколико одабраних лабораторија, али примена ових стандардизованих молекуларно епидемиолошких алата у праћењу клоналног ширења има велики утицај на јавно здравље, јер је извор корисних информација за мере контроле и сузбијања ширења инфекције. У последњој деценији 20. века дошло је до избијања масовне епидемије дифтерије у Руској Федерацији и земљама на територији бившег Совјетског Савеза, што је додатно указало на потребу и усмерило пажњу на примену савремених техника молекуларне биологије у дијагностици дифтерије. Постављена је стандардна метода гено-типизације за брзо праћење сојева – риботипизација.

Претходне методе молекуларне типизације примењене на *C. diphtheriae* укључивале су полиморфизме дужине рестрикционих фрагмената (*restriction fragment length polymorphisms* (RFLPs)) коришћењем ДНК и различитих проба, циљајући на ген токсина и инсерционе елементе. Касније су развијене и различите методе молекуларне подтипизације: гел електрофореза у пулсном пољу (PFGE), насумична амплификација полиморфне ДНК (*random amplification of polymorphic DNA* (RAPD)) и полиморфизми дужине амплифицираних фрагмената (*amplified fragment length polymorphisms*). Ове методе налазе примену у епидемиолошким истраживањима дифтерије [40]. Даљим развојем молекуларних технологија, методе молекуларног секвенционирања као што су *Multi-locus sequence typing* (MLST) и *Next-generation sequencing* (NGS) преузимају примат у епидемиолошкој типизацији патогена и потискују претходне методе [41].

Multi-locus sequence typing (MLST) је погодна метода за епидемиолошке студије и надзор јер даје податке високе ефикасности и резолуције који доприносе разумевању преноса патогена током епидемије. Предности MLST у поређењу са риботипизацијом и PFGE су једноставност и упоредивост резултата. Ова метода се заснива

у примену у праћењу ширења епидемијских сојева. Са овим методама, ендемски, епидемијски и увезени случајеви могу се разликовати. Могуће је пратити дисеминацију увезених случајева или идентификовати могуће изворе инфекције [39]. На пример, у инфекцијама зоонотичком врстом *C. ulcerans*, ове методе се примењују да се испита сумња на преношење са животиња, често кућних љубимаца, на људе. Молекуларна типизација се још увек изводи само у неколико одабраних лабораторија, али примена ових стандардизованих молекуларно епидемиолошких алата у праћењу клоналног ширења има велики утицај на јавно здравље, јер је извор корисних информација за мере контроле и сузбијања ширења инфекције. У последњој деценији 20. века дошло је до избијања масовне епидемије дифтерије у Руској Федерацији и земљама на територији бившег Совјетског Савеза, што је додатно указало на потребу и усмерило пажњу на примену савремених техника молекуларне биологије у дијагностици дифтерије. Постављена је стандардна метода гено-типизације за брзо праћење сојева – риботипизација.

Претходне методе молекуларне типизације примењене на *C. diphtheriae* укључивале су полиморфизме дужине рестрикционих фрагмената (*restriction fragment length polymorphisms* (RFLPs)) коришћењем ДНК и различитих проба, циљајући на ген токсина и инсерционе елементе. Касније су развијене и различите методе молекуларне подтипизације: гел електрофореза у пулсном пољу (PFGE), насумична амплификација полиморфне ДНК (*random amplification of polymorphic DNA* (RAPD)) и полиморфизми дужине амплифицираних фрагмената (*amplified fragment length polymorphisms*). Ове методе налазе примену у епидемиолошким истраживањима дифтерије [40]. Даљим развојем молекуларних технологија, методе молекуларног секвенционирања као што су *Multi-locus sequence typing* (MLST) и *Next-generation sequencing* (NGS) преузимају примат у епидемиолошкој типизацији патогена и потискују претходне методе [41].

Multi-locus sequence typing (MLST) је погодна метода за епидемиолошке студије и надзор јер даје податке високе ефикасности и резолуције који доприносе разумевању преноса патогена током епидемије. Предности MLST у поређењу са риботипизацијом и PFGE су једноставност и упоредивост резултата. Ова метода се заснива

на анализи варијације нуклеотида (полиморфизам једног нуклеотида, енгл. *single nucleotide polymorphism* [SNP]) у оквиру седам или више *housekeeping* гена. MLST омогућава анализу типова секвенци и клонских комплекса организма и стога пружа информације о распрострањености одређеног клона у епидемији или на неком географском подручју. Даље информације о молекуларној епидемиологији дифтерије које се могу користити за предвиђање еволуционих односа између сојева и доношење закључка о глобалној сродности патогена се могу добити секвенцирањем целог генома (*whole-genome sequencing*, WGS).

Секвенцирање гена за идентификацију врста *Corynebacterium*

Велики број врста чини род *Corynebacterium* и до данас је више од 140 врста изоловано и идентификовано из различитих узорака: људских, животињских, из животне средине, земље или сира [1]. Услед велике хетерогености организама рода *Corynebacterium* и чињенице да га чине и вирулентни патогени и безбедни коменсали, одређивање тачних врста је кључно у постављању клиничке дијагнозе. Секвенцирање рибозомских гена (16S или 23S) је брза и поуздана метода за одређивање већине ових врста [42].

Међутим, неки представници *Corynebacterium spp.* се не могу идентификовати само овом методом, јер су разлике <0,8% идентитета од готово комплетне 16S rRNA генске секвенце. Ово обухвата: *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*; *C. afermentans*, *C. coyleae*, *C. mucifaciens* и *C. ureicelerivorans*; *C. aurimucosum*, *C. minutissimum* и *C. singulare*; *C. sundsvallense* и *C. thomssenii*; *C. propinquum* и *C. pseudodiphtheriticum* (<2%); *C. xerosis*, *C. freneyi* и *C. hansenii*; *C. macginleyi* и *C. accolens*. Битно је знати да је за међусобно разликовање ових врста потребна додатна метода, као што је секвенцирање гена *rpoB*. Нажалост, 16S rRNA гени коринебактерија показују врло мало полиморфизма; стога је неопходно секвенцирање комплетног 16S гена (око 1500 bp). Показано је да фрагмент *rpoB* величине 432–452 bp показује довољну дискриминаторну моћ да разликује *Corynebacterium spp.* Важно је имати у виду да секвенце *rpoB* нису доступне за све врсте у јавном домену на интернету [43].

Најсавременије технике, као што је NGS, могу да испитају генетички дрифт *Corynebacterium spp.* и објасне разноликост инсерције бактериофага и повезаних фактора вируленције. Истраживања за даље унапређење ових метода је усмерено ка идентификацији нових таргета. *In silico* је откривено неколико непристрасних

Gene sequencing for identification of the *Corynebacterium* species

The *Corynebacterium* genus comprises a large number of species and to date more than 140 species have been isolated and identified from different samples: human, animal, environmental, soil or cheese [1]. Due to the great heterogeneity of the organisms of the *Corynebacterium* genus, as well as due to the fact that it comprises both virulent pathogens and harmless commensals, the determination of the correct species is crucial in establishing a clinical diagnosis. Sequencing of ribosomal genes (16S or 23S) is a fast and reliable method for determining most of these species [42].

However, some specimen of *Corynebacterium spp.* cannot be identified by this method alone, as the differences are <0.8% identity of the almost complete 16S rRNA gene sequence. These include: *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis*; *C. afermentans*, *C. coyleae*, *C. mucifaciens* and *C. ureicelerivorans*; *C. aurimucosum*, *C. minutissimum* and *C. singulare*; *C. sundsvallense* and *C. thomssenii*; *C. propinquum* and *C. pseudodiphtheriticum* (<2%); *C. xerosis*, *C. freneyi* and *C. hansenii*; *C. macginleyi* and *C. accolens*. It is important to know that an additional method, such as the *rpoB* gene sequencing, is needed to distinguish between these species. Unfortunately, the 16S rRNA genes of corynebacteria show very little polymorphism; therefore, sequencing of the complete 16S gene (about 1500 bp) is necessary. It has been shown that the 432–452 bp *rpoB* fragment demonstrates sufficient discriminatory power to distinguish *Corynebacterium spp.* It is important to note that *rpoB* sequences are not available for all species in the public Internet domain [43].

State-of-the-art techniques, such as NGS, can examine the genetic drift of *Corynebacterium spp.* and explain the diversity of bacteriophage insertion and associated virulence factors. Research for further improvement of these methods is aimed at identifying new targets. Several unbiased new targets having the potential to show adequate variation for a sequencing-based scheme have been detected *in silico*. Genomic data of the *C. diphtheriae* strains have shown that most of these targets are suitable for further evaluation, showing between 2 and 16 variants. Several genomes of *Corynebacterium spp.* are available for research and evaluation of new and potentially more discriminatory targets [44].

The advantages of typing methods based on sequencing are high reproducibility and discrimination, the increasing availability of mass application and the possibility of examining the mechanism, causes and dynamics of the move-

нових таргета, који имају потенцијал да покажу адекватну варијацију за шему засновану на секвенцирању. Геномски подаци сојева *C. diphtheriae* показали су да је већина ових таргета погодна за даљу евалуацију, показујући између 2 и 16 варијанти. Неколико генома *Corynebacterium spp.* је доступно за истраживање и процену нових и потенцијално дискриминативнијих таргета [44].

Предности метода типизације заснованих на секвенцирању су висока репродукцибилност и дискриминативност, све већа доступност масовне примене и могућност испитивања механизма, узрока и динамике кретања епидемијских клонова. Стога ове методе постају водеће у истраживању еволутивних односа у епидемиолошке сврхе.

Секвенцирање целог генома

Варијације бактеријских генома у оквиру једне врсте могу настати услед тачкастих мутација, хомологне рекомбинације и разлика у садржају генома. У тачкасте мутације спадају SNP, које су најчешћи и најједноставнији тип мутације, и појединачне инсерције или делеције нуклеотида [45]. Овај извор варијабилности ДНК значајно доприноси еволуцији и ширењу бактерија.

SNP је варијација једног нуклеотида (аденин, цитозин, гванин или тимин) у генетској секвенци. Појединачно или у малом броју SNP доводе до малих, чак и не приметних промена у геному. Међутим, акумулација ових промена је највећи узрок диверзитета међу геномима. Како више кодона кодира једну аминокиселину (дегенерација кода), мутације често могу бити „тихе” тј. синонимне и не доводе до промене експресије гена. На супрот њима, несинонимне мутације могу довести до промене експресије, тј. промене кодираног протеина услед промене аминокиселине.

SNP могу бити показатељ брзине еволуције организма која се одређује из односа броја несинонимних промена нуклеотида по несинонимном месту (dN) и броја синонимних промена по синонимном месту (dS). То омогућава примену SNP за детекцију ширења одређеног соја. Ова употреба је проширена на популациону генетику за процену генетичке варијације, идентификацију сродства или родитељства, мерење структуре популације и промене у величини популације током времена [1].

Захваљујући секвенцирању целог генома (WGS), проширивањем MLST концепта на цео геном, развије-

ment of epidemic clones. Therefore, these methods are becoming the leading ones in the research of evolutionary relationships for epidemiological purposes.

Whole genome sequencing

Variations in bacterial genomes within a species can arise from point mutations, homologous recombination, and differences in genome content. Point mutations include SNPs, which are the most common and simplest type of mutation, and single nucleotide insertions or deletions [45]. This source of DNA variability contributes significantly to the evolution and spread of bacteria.

A SNP is a variation of a single nucleotide (adenine, cytosine, guanine or thymine) in the genetic sequence. SNPs, individually or in small numbers, lead to small, even imperceptible alterations in the genome. However, the accumulation of these alterations is the main cause of diversity among genomes. As several codons encode one amino acid (code degeneracy), mutations can often be “silent” i.e., synonymous and without causing changes in gene expression. In contrast, non-synonymous mutations can lead to a change in expression i.e., changes in the encoded protein due to amino acid alterations.

SNPs can be an indicator of the rate of evolution of organisms, which is determined by the ratio of the number of non-synonymous nucleotide changes at non-synonymous site (dN) and the number of synonymous changes at synonymous site (dS). This enables the application of SNPs to detect the spread of a particular strain. This use has been extended to population genetics to assess genetic variation, identify kinship or parentage, measure population structure and changes in population size over time [1].

Thanks to whole genome sequencing (WGS), and by extending the MLST concept to the whole genome, a typing scheme known as core genome MLST (cgMLST) has been developed. This technique is used to examine the relatedness of isolates based on SNP phylogeny, and has been applied in several hospitals in epidemic research. As cgMLST provides additional, higher-resolution information on the genetic diversity of species, this method may become the gold standard for strain subtyping in epidemiological studies [1].

The set of all constant and variable genes i.e., all genes belonging to a species, constitutes the pangenome. In comparison to core or often variable accessory genome analysis, pangenome analysis shows better discrimination within strains. Several studies have emphasized the utility of WGS in understanding the evolution and pathogenicity

на је шема типизације познате као *core genome* MLST (cgMLST). Ова техника се користи за испитивање сродности изолата на основу SNP филогеније, те је нашла примену у неколико болница у истраживању епидемије. Како cgMLST пружа додатне информације веће резолуције о генетском диверзитету врста, ова метода може постати златни стандард за субтипизацију сојева у епидемиолошким истраживањима [1].

Скуп свих константних и варијабилних гена, дакле свих гена припадника врсте, чини пангеном. У односу на анализу језгра или често променљивог акцесоарног генома, анализа пангенома показује бољу дискриминацију унутар сојева. Неколико студија наглашава корисност WGS у разумевању еволуције и патогености различитих сојева *C. diphtheriae* [46].

Транскриптомика

Секвенционирање генома даје информацију о генотипу, али не и фенотипу организма, јер не разликује који гени су експримирани. Експресија гена подразумева њихову активацију под одређеним условима (у одговору на спољни стимуланс или у одређеном стадијуму развоја), што води генској транскрипцији. Стога је транскриптом скуп свих експримираних гена у ћелији у одређеном тренутку, а овај термин се углавном користи за комплетан сет свих рибонуклеинских киселина (транскрипата) у одређеној ћелији или организму. Транскриптомика даје нови квалитет информација и сазнања не само о присутним генима, већ и о њиховој функцији и регулацији. Методе које се могу применити укључују *microarray* и РНК секвенционирање. Овај приступ може дати увид у одбрамбени одговор домаћина на патогене и њихову пролиферацију [47].

РНК секвенционирање даје могућност испитивања профила експресије и карактеризације различито експримираних гена, јер омогућава анализу комплетног транскриптома. Код микроорганизама ова метода је погодна за испитивање механизма вируленције и патогености. У случају *C. diphtheriae* секвенца генома је добро позната, али анализа транскриптома даје нове информације. Поређењем транскриптома дивљег соја и мутанта са делецијом регулатора транскрипције DtxR расветљене су могуће нове улоге DtxR. Иако је од раније познато да DtxR учествује у инхибицији синтезе дифтеријског токсина и регулацији метаболизма гвожђа бактерија, уочено је да је код Δ dtxR мутанта око 15% генома другачије транскрибовано, што указује на друге могуће регулаторне функције DtxR [48].

of different *C. diphtheriae* strains [46].

Transcriptomics

Genome sequencing provides information about the genotype, but not about the phenotype of the organism, since it does not distinguish which genes are expressed. Gene expression implies their activation under certain conditions (in response to an external stimulus or at a certain stage of development), which leads to gene transcription. Therefore, the transcriptome is the set of all expressed genes in a cell at a given time, and this term is generally used for the complete set of all ribonucleic acids (transcripts) in a given cell or organism. Transcriptomics provides a new quality of information and knowledge not only about the genes present, but also about their function and regulation. The methods that can be applied include microarray and RNA sequencing. This approach can provide insights into the host's defense response to pathogens and their proliferation [47].

RNA sequencing provides the opportunity to examine the expression profile and characterization of differentially expressed genes, as it enables the analysis of the complete transcriptome. In the case of microorganisms, this method is suitable for examining the mechanisms of virulence and pathogenicity. In the case of *C. diphtheriae*, the genome sequence is well known, but transcriptome analysis provides new information. By comparing the transcriptomes of the wild strain and a mutant with a deletion of the transcriptional regulator DtxR, possible new roles for DtxR have been elucidated. Although it was previously known that DtxR participates in the inhibition of diphtheria toxin synthesis and the regulation of bacterial iron metabolism, it has been observed that about 15% of the genome is differently transcribed in the Δ dtxR mutant, suggesting other possible regulatory functions of DtxR [48].

Conclusion

In addition to the characteristics of the causative agents and the epidemiology of the disease, the paper provides an overview of laboratory methods, from traditional bacteriological techniques to the most modern methods such as genome sequencing. For the purposes of routine surveillance (active surveillance in the migrant population, which is to be established in our country), not all of the described laboratory techniques will be applied, however, the knowledge thereabout is necessary for epidemic preparedness and response planning in regard to a potential outbreak of diphtheria epidemic, especially if the patients are registered in several countries, which is one of the possible scenarios.

Закључак

Поред карактеристика узрочника и епидемиологије болести, у раду је дат преглед лабораторијских метода од традиционалних бактериолошких техника до најсавременијих метода као што је секвенцирање генома. За потребе рутинског надзора (активног надзора у мигрантској популацији који се настоји успоставити у нашој земљи) неће све описане лабораторијске технике бити примењене, али је њихово познавање неопходно ради планирања и спровођења одговора на евентуалну епидемијску појаву дифтерије, нарочито уколико се оболели буду регистровани у више земаља, што је један од могућих сценарија.

Случајеви дифтерије се континуирано детектују у земљама Блиског и Средњег Истока, као и у појединим земљама Афричког континента одакле у нашу земљу долази највећи број миграната и тражилаца азила. Начин њиховог путовања, боравак у неадекватним смештајима, блиски контакти које остварују са различитим особама у прихватним центрима и ван њих, повреде којима су изложени, уз низак обухват вакцинацијом, чине мигранте додатно и осетљивим и експонираним, односно можемо их сматрати групом у високом ризику од дифтерије у свим њеним облицима. Иако је ризик за домицилну популацију низак како због задовољавајућег обухвата вакцинацијом, тако и због ниског интензитета и учесталости контаката између домаћег становништва и миграната, ипак се тај ризик не може занемарити те чини додатни разлог за увођење надзора, повећање свести и позорности, као и знања на свим нивоима здравствене заштите.

Обавеза референтне установе за јавно здравље је да пратећи савремена медицинска достигнућа и актуелну епидемиолошку ситуацију, иницира разматрање важних питања и едукује друге учеснике у систему здравствене заштите у различитим областима, чему доприноси и овај прегледни чланак, када је у питању дифтерија.

Diphtheria cases are being continuously detected in the countries of the Near and Middle East, as well as in some countries of the African continent, from where the largest number of migrants and asylum seekers come to our country. The way they travel, their stay in inadequate accommodation, the close contacts they make with different people in the reception centers and outside them, the injuries they are exposed to, along with low vaccination coverage, make migrants additionally sensitive, susceptible and exposed i.e., they can be considered a group at high risk of diphtheria in all of its forms. Although the risk for the resident population is low due to satisfactory vaccination coverage, as well as due to the low intensity and frequency of contacts between the local population and migrants, this risk cannot be ignored and represents an additional reason for introducing surveillance systems, increasing awareness and attention, as well as expanding knowledge at all levels of health care.

The obligation of the reference public health institution is to follow modern medical achievements and the current epidemiological situation, initiate consideration of relevant issues and educate other participants in the health care system in various fields, which this review article contributes to, when it comes to diphtheria.

Литература / References

1. WHO laboratory manual for the diagnosis of diphtheria and other related infections. Geneva: World Health Organization; 2021. 117p. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [Cited: 2023 Aug 22]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/352275>
2. Djukić V, Šaponjić V, Radonjić N, Marković Z, Filipović Lj. [Knowledge, attitude and practice about immunizations of parents and pediatricians – Kraljevo, Raska, Vrnjacka Banja]. Znanje, stavovi i praksa roditelja i pedijatara u vezi sa imunizacijom – Kraljevo, Raška, Vrnjačka Banja. Zdravstvena zaštita. 2019; 48(1): 27–39. Serbian. <https://doi.org/10.5937/ZZ1901027D>

3. Clarke KEN, MacNeil A, Hadler S, Scott C, Tiwari TSP, Cherian T. Global Epidemiology of Diphtheria, 2000–2017. *Emerg Infect Dis*. 2019; 25(10): 1834–42. <https://doi.org/10.3201/eid2510.190271>
4. Bajoriniene A, Leitmeyer KC, Struelens MJ, Kokki MH; Alternate Observers to the ECDC National Microbiology Focal Points in Western Balkan Countries. Investing in public health microbiology laboratories in Western Balkan countries enhances health security from communicable disease threats in Europe. *Front. Public Health*. 2019; 7: 8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00008>
5. Bonmarin I, Guiso N, Le Flèche-Matéos A, Patey O, Patrick ADG, Levy-Bruhl D. Diphtheria: a zoonotic disease in France? *Vaccine*. 2009; 27(31): 4196–200. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.048>.
6. Wagner KS, White JM, Lucenko I, Mercer D, Crowcroft NS, Neal S, et al. Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000–2009. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18(2): 217–25. <https://doi.org/10.3201/eid1802.110987>.
7. Pavlovic Lj, Dacic S, Boričić K. A race of mercy – when philanthropy pushes limits. *Glasnik javnog zdravlja [Serbian Journal of Public Health]*. 2020; 97: 149–58. <https://doi.org/10.5937/serbjph2301149P>
8. Sharma NC, Efstratiou A, Mokrousov I, Mutreja A, Das B, Ramamurthy T. Diphtheria. *Nat Rev Dis Prim*. 2019; 5(1): 81. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0131-y>
9. Dazas M, Badell E, Carmi-Leroy A, Criscuolo A, Brisse S. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar Belfanti and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018; 68: 3826–31. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003069>
10. Barksdale L, Linder R, Sulea IT, Pollice M. Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol*. 1981; 13: 335–43. <https://doi.org/10.1128/jcm.13.2.335-343.1981>
11. Meinel DM, Margos G, Konrad R, Krebs S, Blum H, Sing A. Next generation sequencing analysis of nine *Corynebacterium ulcerans* isolates reveals zoonotic transmission and a novel putative diphtheria toxin-encoding pathogenicity island. *Genome Med*. 2014; 6(11): 113. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0113-3>
12. Hommez J, Devriese LA, Vaneechoutte M, Riegel P, Butaye P, Haesebrouck F. Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(4): 954–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.4.954-957.1999>
13. Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res*. 2006; 37: 201–18. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005056>
14. Domenis L, Spedicato R, Pepe E, Orusa R, Robetto S. Caseous lymphadenitis caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Alpine Chamois (*Rupicapra r. rupicapra*): a Review of 98 Cases. *J Comp Pathol*. 2018; 161: 11–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2018.04.003>
15. Wagner KS, White JM, Neal S, Crowcroft NS, Kuprevičiene N, Paberza R, et al. Screening for *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* in patients with upper respiratory tract infections 2007–2008: a multicentre European study. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(4): 519–25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03269.x>
16. Griffith J, Bozio CH, Poel AJ, Fitzpatrick K, DeBolt CA, Cassiday P, et al. Imported toxin-producing cutaneous diphtheria – Minnesota, Washington, and New Mexico 2015–2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2019; 68: 281–84. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6812a2>
17. Hogg RA, Wessels J, Hart J, Efstratiou A, De Zoysa A, Mann G, et al. Possible zoonotic transmission of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from companion animals in a human case of fatal diphtheria. *Vet Rec*. 2009; 165(23): 691–2. PMID: 19966333. <https://doi.org/10.1136/vr.165.23.691>
18. von Hunolstein C, Aggerbeck H, Andrews N, Berbers G, Fievet-Groyne F, Maple PAC, et al. European sero-epidemiology network: standardisation of the results of diphtheria antitoxin assays. *Vaccine*. 2000; 18(28): 3287–96. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(00\)00125-0](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00125-0)
19. von Hunolstein C, Ralli L, Pinto A, Stickings P, Efstratiou A, Czumbel I, et al. Relevance and Criticality in an External Quality Assessment for the determination of diphtheria antitoxin. *J Immunol Clin Res*. 2014; 2(2): 1022.

20. Stickings P, Rigsby P, Coombes L, von Hunolstein C, Ralli L, Pinto A, et al. Calibration and commutability assessment of the 1st International Standard for Diphtheria Antitoxin Human. *Biologicals*. 2013; 41(6): 384–92. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.08.001>
21. Dular U. Comparative studies of the in vivo toxin neutralization and the in vitro Vero cell assay methods for use in potency testing of diphtheria component in combined vaccines/toxoids. 1: Standardization of a modified Vero cell assay for toxin-antitoxin titration of immunized guinea-pig sera. *Biologicals*. 1993; 21: 53–9. <https://doi.org/10.1006/biol.1993.1046>
22. Gupta RK, Higham S, Gupta CK, Rost B, Siber GR. Suitability of the Vero cell method for titration of diphtheria antitoxin in the United States potency test for diphtheria toxoid. *Biologicals*. 1994; 22: 65–72. <https://doi.org/10.1006/biol.1994.1009>
23. Kristiansen M, Aggerbeck H, Heron I. Improved ELISA for determination of anti-diphtheria and/or anti-tetanus antitoxin antibodies in sera. *APMIS*. 1997; 105(11): 843–53. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1997.tb05093.x>
24. Aggerbeck H, Norgaard-Pedersen B, Heron I. Simultaneous quantitation of diphtheria and tetanus antibodies by double antigen, time-resolved fluorescence immunoassay. *J Immunol Methods*. 1996; 190(2): 171–83. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00270-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00270-7)
25. Bonin E, Tiru M, Hallander H, Bredberg-Rådén U. Evaluation of single- and dual antigen delayed fluorescence immunoassay in comparison to an ELISA and the in vivo toxin neutralisation test for detection of diphtheria toxin antibodies. *J Immunol Methods*. 1999; 230: 131–40. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(99\)00129-5](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(99)00129-5)
26. Hendriksen CF, van der Gun JW, Kreeftenberg JG. Combined estimation of tetanus and diphtheria antitoxin in human sera by the in vitro Toxin-Binding Inhibition (ToBI) test. *J Biol Stand*. 1989; 17(2): 191–200. [https://doi.org/10.1016/0092-1157\(89\)90009-7](https://doi.org/10.1016/0092-1157(89)90009-7)
27. World Health Organization. Diphtheria Vaccine: WHO Position Paper – August 2017. *Weekly epidemiological record*. 2017; 92(31): 417–36. [Cited: 2023 Aug 22]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9231>
28. Walory J, Grzesiowski P, Hryniewicz W. Comparison of four serological methods for the detection of diphtheria anti-toxin antibody. *J Immunol Methods*. 2000; 245:55–65. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(00\)00273-8](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(00)00273-8)
29. Skogen V, Jenum PA, Koroleva VN, Danilova E, Halvorsen DS, Maksimova N, et al. Detection of diphtheria antitoxin by four different methods. *Clin Microbiol Infect*. 1999; 5(10): 628–33. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1999.tb00420.x>
30. Caboré RN, Piérard D, Huygen K. A Belgian serosurveillance/seroprevalence study of diphtheria, tetanus and pertussis using a Luminex xMAP technology-based pentaplex. *Vaccines*. 2016; 4(2): 16. <https://doi.org/10.3390/vaccines4020016>
31. van Gageldonk PG, von Hunolstein C, van der Klis FRM, Berbers GAM. Improved specificity of a multiplex immunoassay for quantitation of anti-diphtheria toxin antibodies with the use of diphtheria toxoid. *Clin Vaccine Immunol*. 2011; 18(7): 1183–6. <https://doi.org/10.1128/CVI.05081-11>
32. Pallen MJ, Hay AJ, Puckey LH, Efstratiou A. Polymerase chain reaction for screening clinical isolates of corynebacteria for the production of diphtheria toxin. *J Clin Pathol*. 1994; 47(4): 353–6. <https://doi.org/10.1136/jcp.47.4.353>
33. Nakao H, Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(7): 1651–5. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.7.1651-1655.1997>
34. Mothershed EA, Cassidy PK, Pierson K, Mayer LW, Popovic T. Development of a real-time fluorescence PCR assay for rapid detection of the diphtheria toxin gene. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(12): 4713–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4713-4719.2002>
35. Sing A, Hogardt M, Bierschenk S, Heesemann J. Detection of differences in the nucleotide and amino acid sequences of diphtheria toxin from *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* causing extrapharyngeal infections. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(10): 4848–51. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4848-4851.2003>

36. De Zoysa A, Efstratiou A, Mann G, Harrison TG, Fry NK. Development, validation and implementation of a quadruplex real-time PCR assay for identification of potentially toxigenic corynebacteria. *J Med Microbiol.* 2016; 65(12): 1521–7. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000382>
37. Badell E, Guillot S, Tulliez M, Pascal M, Panunzi LG, Rose S, et al. Improved quadruplex real-time PCR assay for the diagnosis of diphtheria. *J Med Microbiol.* 2019; 68: 1455–65 <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001070>
38. Williams MM, Waller JL, Aneke JS, Weigand MR, Diaz MH, Bowden KE, et al. Detection and Characterization of Diphtheria Toxin Gene-Bearing Corynebacterium Species through a New Real-Time PCR Assay. *J Clin Microbiol.* 2020; 58(10): e00639–20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00639-20>
39. Mokrousov I, Vyazovaya A, Kolodkina V, Limeschenko E, Titov L, Narvskaya O. Novel macroarray-based method of Corynebacterium diphtheriae genotyping: evaluation in a field study in Belarus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28(6): 701–3. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0674-4>
40. De Zoysa A, Hawkey P, Charlett A, Efstratiou A. Comparison of four molecular typing methods for characterization of Corynebacterium diphtheriae and determination of transcontinental spread of C. diphtheriae based on BstEII rRNA gene profiles. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(11): 3626–35. <https://doi.org/10.1128/JCM.00300-08>
41. Maiden MCJ. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2006; 60: 561–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121325>
42. Grimont PAD, Grimont F, Efstratiou A, De Zoysa A, Mazurova I, Ruckly C, et al. International nomenclature for Corynebacterium diphtheriae ribotypes. *Res Microbiol.* 2004; 155(3): 162–6 <https://doi.org/10.1016/j.res-mic.2003.12.005>
43. Khamis A, Raoult D, La Scola B. Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of Corynebacterium. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(4): 1934–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1934-1936.2005>
44. Chorlton SD, Ritchie G, Lawson T, Romney MG, Lowe CF. Whole-genome sequencing of Corynebacterium diphtheriae isolates recovered from an inner-city population demonstrates the predominance of a single molecular strain. *J Clin Microbiol.* 2020; 58(2): e01651–19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01651-19>
45. Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24(4): 350–4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.016>
46. Sangal V, Hoskisson PA. Evolution, epidemiology and diversity of Corynebacterium diphtheriae: New perspectives on an old foe. *Infect Genet Evol.* 2016; 43: 364–70. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.024>
47. Lowe CF, Bernard KA, Romney MG. Cutaneous diphtheria in the urban poor population of Vancouver, British Columbia, Canada: a 10-year review. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(7): 2664–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.00362-11>
48. Wittchen M, Busche T, Gaspar AH, Lee JH, Ton-That H, Kalinowski J, et al. Transcriptome sequencing of the human pathogen Corynebacterium diphtheriae NCTC 13129 provides detailed insights into its transcriptional landscape and into DtxR-mediated transcriptional regulation. *BMC Genomics.* 2018; 19: 82. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4481-8>



Примљено / Received

31.7.2023.

Ревидирано / Revised

24.8.2023.

Прихваћено / Accepted

25.8.2023.

Кореспонденција / Correspondence

Љиљана Павловић - Ljiljana Pavlović
ljiljana_pavlovic@batut.org.rs