

УДК 579.871.1.047

Быстрые фенотипические методы определения дифтерийного токсина у клинических штаммов коринебактерий

К.Х. Энглер¹, Д. Норн², Р.С. Козлов³, И. Сельга⁴, Т.Г. Глушкевич⁵, М. Там²,
Р.С. Джорж¹, А. Эфстратиоу¹

¹Центральная служба общественного здравоохранения (PHLS), Центральная лаборатория общественного здравоохранения (СРНЛ), Лондон, Великобритания; ²Программа соответствующих технологий в здравоохранении (PATH), Сиэтл, США; ³НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия; ⁴Национальный центр общественного здравоохранения, Министерство благосостояния, Рига, Латвия; ⁵Украинский центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора, Киев, Украина

Разработаны 2 быстрых фенотипических метода определения дифтерийного токсина: *иммуноферментный анализ* (ИФА) и тест с *иммунохроматографическими полосками* (ICS). В обоих методах используются лошадиные поликлональные антитоксические антитела в качестве фиксирующих антител. Детектирующие антитела представлены моноклональными антителами, специфичными фрагменту А молекулы дифтерийного токсина, мечеными щелочной фосфатазой для использования в ИФА, и коллоидным золотом – для ICS теста. Оба теста дают окончательный результат в течение 3 ч. Токсигенность может быть определена у штаммов, инокулированных на различных питательных средах. Чувствительность ИФА (по дифтерийному токсину) составляет 0,1 нг/мл, ICS теста – 0,5 нг/мл.

При сравнении определения дифтерийного токсина с помощью ИФА, теста Элека и ПЦР у

245 штаммов коринебактерий (87 токсигенных и 158 нетоксигенных) результаты ИФА тесно коррелировали с данными теста Элека. Для сравнения ICS теста с тестом Элека исследованы 488 штаммов *Corynebacterium* spp. Результаты, полученные в ICS тесте, тесно коррелировали с данными теста Элека (243 токсигенных и 245 нетоксигенных штаммов). Проведена также оценка ICS теста для прямого определения токсигенности при исследовании 112 мазков, взятых из зева пациентов с подозрением на дифтерию и бессимптомных носителей. Результаты показали 98% сопоставимость (110/112) тестов с классическими культуральными методами при чувствительности 95 и специфичности 99%.

Ключевые слова: дифтерия, дифтерийный токсин, коринебактерии, лабораторная диагностика.

Rapid Phenotypic Methods for the Detection of Diphtheria Toxin Amongst Clinical Isolates of Corynebacteria

K.H. Engler¹, D. Norn², R.S. Kozlov³, I. Selga⁴, T.G. Glushkevich⁵, M. Tam²,
R.C. George¹, A. Efstratiou¹

¹PHLS Central Public Health Laboratory, London, UK; ²Programme for Appropriate Technology in Health (PATH), Seattle, USA; ³Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia; ⁴National Environmental Health Centre, Ministry of Welfare, Riga, Latvia; ⁵Ukrainian Centre of National Sanitary and Epidemiological Surveillance, Kiev, Ukraine

Two rapid, phenotypic methods were developed for the detection of diphtheria toxin amongst clinical

isolates of corynebacteria, an *enzyme immunoassay* (EIA) and an *immunochromatographic strip*

Контактный адрес:

Kathrin H. Engler

WHO Collaborating Centre for Diphtheria and Streptococcal Infections, Division of Respiratory and Systemic Infection,

PHLS Central Public Health Laboratory

61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK

Факс: +44 20 8205 6528

Эл. почта: KEngler@PHLS.nhs.uk

(ICS) test. Both assays use equine polyclonal anti-toxin as the capture antibody. The detecting antibody is a monoclonal antibody, specific for fragment A of the diphtheria toxin molecule, labelled with alkaline phosphatase for use in the EIA and colloidal gold for the ICS. The assays are rapid, sensitive and specific: a final result is available within 3h of colony selection and toxigenicity can be detected from isolates grown on a diverse range of culture media, including selective agars. The limits of detection of the EIA are 0,1 ng/ml and of the ICS test 0,5 ng/ml diphtheria toxin.

Toxin detection using the EIA was compared to the Elek test and PCR detection of fragment A of the diphtheria toxin (*tox*) gene, using 245 isolates of corynebacteria. The results for the EIA were in complete concordance with the Elek test: 87 toxigenic and 158 non-toxigenic isolates. Ten of the phenotypically non-toxigenic strains were found to contain fragment A of the *tox* gene but did not

express the toxin protein. These isolates were found to be non-toxicogenic in the *Vero* cell tissue culture cytotoxicity assay and were therefore, non-toxicogenic for diagnostic purposes. The use of the ICS test, in comparison with the Elek test, for detection of toxigenicity was evaluated in field trials in countries of the former USSR, using 488 isolates of various *Corynebacterium* spp. The results for the ICS test were in complete concordance with the Elek test (243 toxigenic and 245 non-toxigenic isolates). The ICS test was also evaluated for direct detection of toxigenicity from throat swabs. One hundred and twelve throat swabs from suspected diphtheria cases and carriers were examined by conventional culture and direct ICS. The results showed 98% concordance (110/112) and the sensitivity and specificity of the ICS was 95 and 99%, respectively.

Key words: diphtheria, diphtheria toxin, *Corynebacterium* spp., laboratory diagnostics.

Введение

Дифтерия является острой инфекцией верхних отделов дыхательных путей, вызываемой токсин-продуцирующими штаммами *Corynebacterium diphtheriae*. Значительно реже аналогичное по клинической симптоматике заболевание могут вызывать токсигенные штаммы *Corynebacterium ulcerans*.

Внедрение в практику здравоохранения массовой иммунизации в 40–50-е годы привело к значительному снижению заболеваемости и практически полной элиминации дифтерии в Великобритании и многих других странах. Однако недавняя эпидемия дифтерии в России и других странах свидетельствует о том, что эпидемическая заболеваемость может появиться там, где снижается охват профилактическими прививками [1].

В Западной Европе дифтерия встречается редко, однако наблюдается спорадическая заболеваемость. Причем большинство случаев инфекции связано с пребыванием в эндемичных районах: в Индии, Юго-Восточной Азии, Южной Америки и в некоторых странах, образовавшихся из республик СССР [2, 3].

Дифтерийный токсин. Способность к продукции *дифтерийного токсина* (ДТ) – основной фактор вирулентности *C. diphtheriae* – возбудителя дифтерии.

ДТ состоит из одиночной полипептидной цепи с молекулярной массой 58350 Да, которая, в свою очередь, состоит из 3 структурно-функциональных доменов.

Содержащий аминокислотную группу компонент (фрагмент А) с молекулярной массой 21 кДа содержит домен, катализирующий с использованием НАД рибозилирование АДФ эукариотического фактора элонгации 2, который инактивирует синтез белка в клетках человека. Карбокситерминальный компонент токсина – фрагмент Б (39 кДа) – содержит эукариотический рецепторосвязывающий и гидрофобный домены, отвечающие за транспорт каталитического домена через эндосомальную мембрану в цитозоль [4, 5].

Только 3 представителя рода *Corynebacterium* являются потенциально токсигенными: *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*. Способность этих видов к выработке ДТ зависит от действия двух факторов:

- 1) лизогении β -фагом или другими коринефагами, которые содержат структурный ген (*tox*-ген) молекулы токсина;
- 2) низкой внеклеточной концентрации железа [4, 5].

Именно с действием ДТ связаны большинство симптомов дифтерии и летальность от этой инфекции.

Несмотря на то что дифтерия является редким заболеванием в Великобритании и других странах Западной Европы, в последнее время значительно увеличилась частота выделения нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* [2, 6, 7]. В большинстве случаев они выделяются у пациентов с фарингитом. Однако имеются сообщения о случаях эндокардита

и поражения других органов и систем в Европе [8, 9] и Австралии [10]. Вследствие этого надежные, специфичные и точные методы определения дифтерийного токсина необходимы для дифференциации спорадических токсигенных штаммов от циркулирующих нетоксигенных штаммов.

Методы определения дифтерийного токсина.

Идеальный тест для определения токсигенности должен быть простым, быстрым, надежным и чувствительным, хорошо коррелировать с биологической активностью ДТ.

В последнее время исследовался ряд генотипических, фенотипических и биологических методов определения ДТ [11].

Молекулярные методы на основе *полимеразной цепной реакции* (ПЦР) для определения гена токсина обладают определенными преимуществами перед фенотипическими тестами. Они дают более быстрый и легко интерпретируемый ответ. Их использование становится все более распространенным вследствие большей доступности оборудования для ПЦР. Однако основной недостаток методов на основе ПЦР состоит в том, что они не дают информацию о способности микроорганизма к экспрессии биологически активного ДТ.

Описаны нетоксигенные, но в то же время *токсигенносущие* штаммы (НТТВ), обладающие частью полного гена ДТ, однако не способные к экспрессии биологически активной формы токсина [11, 12, 13]. Вследствие этого использование только ПЦР не дает окончательного результата при определении токсигенности. Поэтому ПЦР рекомендуется применять только как дополнительный к фенотипическим тестам метод [14, 15].

Тест иммунопреципитации Элека – наиболее часто используемый микробиологическими лабораториями всего мира фенотипический метод определения токсигенности. Проблема неправильной интерпретации неспецифических линий преципитации, особенно там, где тест Элека не выполняется рутинно, привела к снижению числа лабораторий, использующих его в своей работе, особенно в эндемичных регионах.

Описаны различные фенотипические методы определения ДТ [11, 16–20], которые, однако, или не нашли широкого применения, или не имели существенных преимуществ по сравнению с тестом Элека для микробиологической диагностики дифтерии.

Иммуноферментный анализ (ИФА) и тесты с *иммунохроматографическими полосками (ICS)* широко использовались для выявления микробных антигенов и маркеров. Учитывая сказанное, мы разработали, стандартизировали и провели исследова-

ния амплифицированного ИФА и ICS теста для определения ДТ.

Материал и методы исследования

Штаммы. Бактериальные штаммы представлены клиническими изолятами, поступившими в Референтный отдел по стрептококкам и дифтерии ВОЗ/PHLS (SDRU) Центральной лаборатории общественного здравоохранения (СРНЛ, Лондон, Великобритания) в 1988–2000 г. При определении токсигенности использовали контрольные штаммы NCTC 10648 (токсигенная *C. diphtheriae* биотипа *gravis*), NCTC 3984 (слаботоксигенная *C. diphtheriae* биотипа *gravis*) и NCTC 10356 (нетоксигенная *C. diphtheriae* биотипа *belfanti*).

ИФА для определения дифтерийного токсина.

Приготовление микротитровальных планшетов и конъюгата с моноклональными антителами. Очищенные лошадиные поликлональные антитоксические антитела класса G (2 мкг/мл; Pasteur Merieux, Лион, Франция) использовали для адсорбции в лунках микротитровальных планшетов Nunc Maxisorp (Nunc A/S, Роскилд, Дания).

Моноклональные антитела, специфичные для фрагмента А молекулы ДТ, были приготовлены в соответствии с ранее описанной методикой [16]. Очищенные моноклональные антитела класса G конъюгировали со щелочной фосфатазой и использовали в итоговой концентрации 2 мкг/мл. Для снижения неспецифического связывания была проведена оптимизация конъюгационного буфера (на основе Tris с альбумином бычьей сыворотки и неорганическими солями).

Иммуноферментный метод. Колонии коринебактерий с кровавого колумбийского агара суспендировали в 0,5 мл бульона Элека для получения плотности бактериальной взвеси, соответствующей 1 по стандарту мутности МакФарланда (1×10^8 КОЕ/мл), после чего инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C в аэробных условиях.

Бактериальные клетки удаляли путем фильтрации через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Добавляли 200 мкл супернатанта отфильтрованной жидкости в лунки микротитровального планшета, а затем 50 мкл меченных щелочной фосфатазой (10 мкг/мл) моноклональных антитоксических антител. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C в аэробных условиях, после чего их промывали.

Для определения активности щелочной фосфатазы использовали реагент AmpliQ (DAKO Ltd, Эли, Великобритания) в соответствии с рекомендациями производителя. После 30-минутной инкубации при температуре 37°C реакцию останавливали добавле-

нием 100 мкл 1М фосфорной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 490 нм.

Тест с иммунохроматографическими полосками. *Приготовление полосок для ICS теста.* Полоски для ICS теста были приготовлены Программой соответствующих технологий в здравоохранении (PATH, Сиэтл, США). Лошадиные поликлональные антитоксические антитела наносили на нитроцеллюлозную мембрану в качестве фиксирующих антител. Моноклональные антитела, специфичные для фрагмента А молекулы ДТ, меченные коллоидным золотом, использовали как детектирующие антитела.

Тест ICS. Для определения токсигенности чистых культур штаммы с кровавого колумбийского агара (или сред, содержащих теллурит) суспендировали в 0,5 мл бульона Элека с целью получения плотности бактериальной взвеси, соответствующей стандарту мутности 1 по МакФарланду (1×10^8 КОЕ/мл). После этого инкубировали их в течение 3 ч при температуре 37°C в аэробных условиях.

Для прямого определения токсигенности тампоны с мазками из зева эмульгировали в 0,5 мл бульона Элека и инкубировали в течение 16 ч при температуре 37°C в аэробных условиях. При тестировании ICS вносили в каждую пробирку и оставляли при комнатной температуре на 10 мин, после чего считывали результаты.

Тест иммунопреципитации Элека. Все штаммы были протестированы на наличие ДТ с использованием ранее описанного модифицированного теста Элека [21].

Определение гена дифтерийного токсина с помощью ПЦР. Фрагмент А гена дифтерийного токсина (248 тпн) определяли в соответствии с ранее описанной методикой [12]. Для внутреннего контроля реакции использовали контрольный искусственный образец, содержащий внутреннюю делецию 58 тпн, что позволяло дифференцировать его от природного продукта по электрофоретической подвижности. Наличие ампликона размером 190 тпн при отрицательной реакции позволяло избежать ложноотрицательных реакций.

Определение цитотоксичности в культуре тканей. Метод определения цитотоксичности в культуре клеток *Vero* для определения ДТ проведен в соответствии с ранее описанной методикой [11]. Цитотоксический эффект определяли путем визуального обследования с использованием инвертированного микроскопа.

Результаты исследования

Чувствительность ИФА и теста ICS. Очищенный ДТ [Calbiochem-Novobiochem (UK) Ltd, Нот-

тингем, Великобритания] использовали для определения чувствительности ИФА и теста ICS. Пороги чувствительности составили соответственно 0,1 и 0,5 нг/мл.

Влияние питательной среды на определение токсигенности. Агаровые среды для выращивания микроорганизмов. Штаммы инокулировали на различных средах до исследования в тесте ICS, включая теллуритовый агар Хойла (Oxoid, Басингсток, Великобритания), агары Тинсдаля (Beckton Dickinson, Оксфорд, Великобритания), Леффлера (Oxoid, Басингсток, Великобритания), коринебак-агар (НПО «Питательные среды», Оболенск, РФ) и среду Пизу (приготовленную в лаборатории в соответствии с приказом Минздрава России № 570).

Положительная реакция в тесте ICS наблюдалась у всех исследованных токсигенных штаммов независимо от использованной среды, на которой они выращивались до инокуляции в бульоне Элека.

Жидкие среды для определения продукции ДТ. Оценивали рост и токсинообразование в тесте ICS в бульонах Элека и ГРМ (НПО «Питательные среды», Оболенск, РФ).

Положительная реакция наблюдалась у всех исследованных токсигенных штаммов независимо от использованного бульона.

Оценка ИФА. ИФА оценивали с использованием 245 штаммов коринебактерий, переданных в SDRU в 1988–1998 гг., в сравнении с тестом иммунопреципитации Элека [21] и ПЦР на определение фрагмента А гена ДТ [12].

Виды и биотипы исследованных штаммов представлены в табл. 1. Они включали как потенциально токсигенные виды (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*), так и другие *Corynebacterium* spp.

При использовании оптической плотности 0,05 в качестве пороговой при определении токсигенности в ИФА были установлены 87 токсигенных и 158 нетоксигенных штаммов. Изоляты *C. ulcerans* оказались слабыми продуцентами токсина (самые низкие показатели уровней абсорбции). Это подтверждает данные о том, что *C. ulcerans* часто дают очень слабые линии преципитации в тесте Элека.

Результаты, полученные в ИФА, в 100% случаев коррелировали с данными модифицированного теста Элека (табл. 1). Однако они были получены в течение 3 ч от момента отбора колоний (в сравнении с таковыми через 24 ч для модифицированного и через 48 ч для классического теста Элека).

Тест ИФА также продемонстрировал большую чувствительность, чем тест Элека, а интерпретация результатов оказалась проще. Со штаммами, дававшими слабые линии преципитации в тесте Элека,

получена хорошо видимая цветная реакция в ИФА, что позволяло легко их дифференцировать от нетоксигенных штаммов при визуальной интерпретации.

С 10 (4,1%) из 245 штаммов получены отрицательные результаты в ИФА и тесте Элека, однако положительный – на наличие *tox*-гена в ПЦР. У этих штаммов также был отрицательный результат при определении цитотоксичности в тесте с культурой клеток *Vero*, в связи с чем они были оценены как нетоксигенные.

Оценка теста ICS. Результаты использования теста ICS для определения токсигенности чистых культур и мазков из зева пациентов с подозрением на дифтерию и бессимптомных носителей оценивали в исследованиях на Украине и в Латвии.

Всего 488 потенциально токсигенных штаммов коринебактерий исследованы в тестах Элека и ICS: 486 штаммов *C. diphtheriae* (301 биотипа *gravis*, 183 биотипа *mitis* и 2 биотипа *belfanti*) и 2 – *C. ulcerans*.

Выявлена 100% корреляция между результатами теста Элека и ICS (243 токсигенных и 245 нетоксигенных штаммов). Далее в ICS тесте исследованы 76 нетоксигенных, *tox*-геннесущих (НТТВ) штаммов (электротрицательных, ПЦР-положительных).

Для 68 (89,5%) из 76 штаммов результат ICS теста совпадал с тестом Элека (нетоксигенные штаммы). Оставшиеся 8 изолятов дали положительный результат в ICS тесте и были повторно исследованы на наличие токсигенности в тестах ICS, Элека и ПЦР лабораторией, выделившей штамм, и в лаборатории PHLS. Все штаммы оказались токсигенными при исследовании тремя указанными методами.

Для оценки прямого определения ДТ с помощью теста ICS в сравнении с классическими культуральными методами исследованы 112 мазков из зева. Результаты тестирования приведены в табл. 2. Чувствительность теста ICS составила 95% (интервал согласия – 0,74–1), специфичность – 99% (интервал согласия – 0,74–1).

Обсуждение результатов исследования

Определение токсигенности – наиболее важное исследование при лабораторной диагностике дифтерии. Оно должно проводиться немедленно после выделения всех подозрительных колоний.

Применяющиеся в настоящее время фенотипические методы определения токсигенности с технической точки зрения сложные и часто недостаточно

Таблица 1. Сравнение определения токсигенности с помощью ИФА, модифицированного теста Элека и ПЦР на определение фрагмента А гена дифтерийного токсина

Биотип (число штаммов)	Токсигенность	Количество протестированных штаммов		
		ИФА (3 ч*)	Модифицированный тест Элека (24 ч*)	ПЦР на фрагмент А <i>tox</i> -гена (6 ч*)
<i>C. diphtheriae</i> биотипа <i>gravis</i> (115)	+	34	34	38
<i>C. diphtheriae</i> биотипа <i>mitis</i> (54)	+	29	29	35
	–	25	25	19
<i>C. diphtheriae</i> биотипа <i>belfanti</i> (12)	+	0	0	0
	–	12	12	12
<i>C. diphtheriae</i> биотипа <i>intermedius</i> (5)	+	5	5	5
	–	0	0	0
<i>C. ulcerans</i> (27)	+	18	18	18
	–	9	9	9
<i>C. pseudotuberculosis</i> (4)	+	1	1	1
	–	3	3	3
<i>C. argentoratense</i> (3)	–	3	3	3
<i>C. imitans</i> (3)	–	3	3	3
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (12)	–	12	12	12
<i>C. amycolatum</i> (4)	–	4	4	4
<i>C. striatum</i> (6)	–	6	6	6
В с е г о 245. В том числе штаммы:				
токсигенные	+	87	87	97
нетоксигенные	–	158	158	148

* Время до получения результата.

чувствительные [11, 20]. Более того, они занимают не менее 16–24 ч после выделения колоний до получения окончательного результата. Это обстоятельство не удовлетворяет ни клиницистов, ни эпидемиологов, ни специалистов в области общественного здравоохранения.

Непосредственное определение гена ДТ – наиболее быстрый метод оценки токсигенности с использованием чистых культур. Он занимает 4–5 ч с момента выделения колоний. Кроме того, в настоящее время разработан метод прямого определения гена ДТ из клинических образцов [22].

Несмотря на то что рядом исследователей показана тесная корреляция между генотипическими (ПЦР) и фенотипическими методами определения токсигенности [22, 23, 24, 25], некоторыми авторами описаны штаммы, обладавшие *tox*-геном, но не экспрессировавшие биологически и/или иммунологически активные формы токсина [11, 13].

Подобные штаммы встречались относительно редко в определенных регионах (на севере США и в Канаде) [11]. Однако на спаде эпидемии дифтерии в странах, образовавшихся из республик Советского Союза, подобные штаммы стали выделяться в большем количестве [15]. Из 564 чистых культур 68 (12%), включенных в исследование в странах, образовавшихся из республик Советского Союза, обладали *tox*-геном, но не экспрессировали биологически активную форму токсина. Именно поэтому в современных руководствах рекомендуется использование ПЦР только в сочетании с фенотипическим тестом [14, 15].

Несмотря на то что истинный отрицательный результат ПЦР может быть использован для быстрого исключения токсигенности, положительный результат реакции требует подтверждения фенотипическим тестом, что потенциально чревато задержкой получения окончательного результата.

ИФА и ICS тест – быстрые, чувствительные и простые методы определения ДТ с порогами чувствительности 0,1 и 0,5 нг/мл соответственно. Для

чистых культур результат может быть получен в течение 3 ч с момента отбора колоний. В связи с этим тесты могут быть использованы для получения окончательного результата определения токсигенности в течение рабочего дня.

Токсигенность может быть определена у штаммов, выросших на различных питательных средах, включая селективные агары, используемые для выделения и скрининга потенциально токсигенных коринебактерий. В их число входят среды, используемые в странах Западной Европы (теллуриновый агар Хойла, агар Тинсдаля), а также в странах, образовавшихся из республик Советского Союза (коринебакагар и среда Пизу).

Стандартизация плотности бактериальной взвеси и времени инкубации в бульоне Элека являются необходимыми условиями для определения токсигенности, особенно у слаботоксигенных штаммов. Мы определили, что плотность взвеси 1×10^8 КОЕ/мл (1 по стандарту МакФарланда) и одночасовая (для ИФА) или 3-часовая (для теста ICS) инкубация в бульоне Элека могут быть успешно использованы без наличия ложноотрицательных результатов.

Один из потенциальных недостатков ИФА – необходимость использования жидкого моноклонального конъюгата и реагента для амплификации, которые требуют хранения при температуре 4°C и имеют относительно малый срок хранения. Однако с адаптацией ИФА к формату ICS теста устраняются некоторые проблемы.

Так, ICS остаются стабильными при хранении при комнатной температуре минимум один год. По нашему мнению, разработку этих простых фенотипических методов можно считать значительным достижением в области микробиологической диагностики дифтерии. Они могут быть использованы для тестирования ДТ у клинических штаммов коринебактерий как в странах со sporadicческой заболеваемостью дифтерией, так и при исследовании большого количества штаммов в регионах с эпидемической заболеваемостью.

Таблица 2. Прямое определение токсигенности из клинических образцов (мазки из зева) с использованием теста ICS

Результат классического культурального исследования	Результаты прямого определения из мазков, взятых из зева, с помощью теста ICS	
	+	-
Положительные результаты культурального исследования на токсигенные коринебактерии	20	1
Отрицательные результаты культурального исследования на токсигенные коринебактерии	1	90
В с е г о ...	21	91

Благодарность. Данное исследование поддержано Европейской комиссией DG RTD программой ИНКО Коперникус IC15.СТ.98.0302. Выражаем признательность и благодарность **И.К. Мазуровой, Г.Я. Ценовой, Л.П. Титову, С.А. Габриелян и В.Е. Киму** (партнеров программы ИНКО Коперникус) за оценку теста ICS в своих лабораториях.

Л и т е р а т у р а

- Galazka, A.M., S.E. Robertson, Oblapenko G.P. Resurgence of diphtheria. J Epidemiol 1995;11:95-105.
- Efstratiou A., George R.C. Microbiology and epidemiology of diphtheria. Rev Med Microbiol 1996;7:31-42.
- Public Health Laboratory Service. Diphtheria acquired during a cruise in the Baltic Sea. Commun Dis Rep CDR Weekly 1997;7:207.
- Pappenheimer A.M. The diphtheria bacillus and its toxin: a model system. J Hyg Camb 1984; 93:397-404.
- Pappenheimer A.M. The story of a toxic protein 1888-1992. Protein Sci 1993;2:292-8.
- Efstratiou A., George R.G., Begg N.T. Non-toxicogenic *C. diphtheriae* in England. Lancet 1993;341:1592-3.
- Funke G., Altwegg M., Frommelt L., von Graevenitz A. Emergence of related nontoxicogenic *C. diphtheriae* biotype *mitis* strains in Western Europe. Emerg Infect Dis 1999;5:477-80.
- Lortholary O., Buu-Hoe A., Gutman L., Acar J. *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis in France. Clin Infect Dis 1995;31:63-5.
- Zuber P.L.F., Gruner E., Altwegg M., von Graevenitz A. Invasive infection with non-toxicogenic *C. diphtheriae* among drug users. Lancet 1992;339:1359.
- Tiley S.M., Kokiuba K.R., Heron L.G., Munro R. Infective endocarditis due to non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*: report of seven cases and review. Clin Infect Dis 1993;16: 271-5.
- Efstratiou, A., Engler K.H., Dawes C.S., Sesardic D. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of diphtheria toxin amongst isolates of pathogenic corynebacteria. J Clin Microbiol 1998;36:3173-7.
- Pallen M.J. Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the polymerase chain reaction. J. Clin Pathol 1991;44:1025-6.
- Pallen M.J., Hay A.J, Puckey L.H., Efstratiou A. Polymerase chain reaction for screening clinical isolates of corynebacteria for the production of diphtheria toxin. J Clin Pathol 1994;47:353-6.
- Efstratiou A., George R.C. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. Comm Dis Pub Health 2000;2: 250-7.
- Efstratiou A., Engler K.H., Mazurova I.K., Glushkevich T., Vuopio-Varkila J., Popovic T. Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria. J Infect Dis 2000;181:S138-45.
- Hallas G., Harrison T.G., Samuel D., Colman G. Detection of diphtheria toxin in culture supernates of *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans* by immunoassay with monoclonal antibody. J Med Microbiol 1990;32:247-53.
- Jalgaonkar S.V., Saoji A.M. Coagglutination for rapid testing of toxin producing *Corynebacterium diphtheriae*. Indian J Med Res 1993;97:35-6.
- Nielsen P.B., Koch C., Friss H., Heron I., Prag J., Schmidt J. Double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxin-producing *Corynebacterium diphtheriae*. J Clin Microbiol 1987;25:1280-4.
- Pietrzak J., Muehlestein S., Gasser M. Sandwich-dot immunobinding assay (sandwich-DIA), a new immunological method for the detection of diphtheria toxin. Zbl Bakt 1990;274:61-9.
- Toma C., Sisvath L., Iwanaga M. Reversed passive latex agglutination assay for detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. J Clin Microbiol 1997;35:3147-9.
- Engler K.H., Glushkevich T., Mazurova I.K., George R.C., Efstratiou A. A modified Elek test for the detection of toxigenic corynebacteria. J Clin Microbiol 1997;35:495-8.
- Nakao H., Popovic T. Development of a direct PCR for detection of the diphtheria toxin gene. J Clin Microbiol 1997;7:1651-5.
- Aravena-Roman M., Bowman R., O'Neill G. Polymerase chain reaction for the detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. Pathol 1995;27:71-3.
- Hauser D., Popoff M.R., Kiredjian M., Boquet P., Bimet F. Polymerase chain reaction assay for diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains: correlation with ADP-ribosylation activity assay. J Clin Microbiol 1993;31:2720-3.
- Mikhailovich V.M., Melnikov V.G., Mazurova I.K., Wachsmuth I.K., Wenger J.D., Wharton M., Nakao H., Popovic T. Application of PCR for detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated during the Russian diphtheria epidemic, 1990 through 1994. J Clin Microbiol 1995;33:3061-3.