

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Борисова О.Ю.^{1,4}, Кадочникова В.В.², Чагина И.А.¹, Гадуа Н.Т.¹, Пименова А.С.¹, Орлова О.Е.³, Миронов А.Ю.^{1,5}, Подопригора И.В.⁴

АПРОБАЦИЯ ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ДИФТЕРИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

²ООО «НПФ ДНК-Технология», 117587, Москва, Россия;

³ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница № 67 им. Л.А. Воробихова ДЗМ», 123423, Москва, Россия;

⁴ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», 117198, Москва, Россия;

⁵Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682, Москва, Россия

Апробирован набор реагентов «C. diphtheriae Tox⁺» (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия) для генодиагностики дифтерии. Использованы 15 типовых штаммов, в том числе токсигенный C. diphtheriae № 665, а также 285 штаммов и клинических образцов (мазки отделяемого из носо-, ротоглотки, кожных покровов), присланных в Референс-центр по мониторингу за корью, краснухой, эпидемическим паротитом, коклюшем и дифтерией ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. Культивирование проводили по МУК 4.2.3065-13. Для выделения ДНК использован «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора), «ПРОБА-НК», «ПРОБА-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), «ПРОБА-МЧ-РАПИД», «ПРОБА-ОПТИМА» (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия). В качестве сравнительной тест-системы использована «АмплиСенс® Corynebacterium diphtheriae / tox-genes-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Амплификацию проводили на ДТпрайм, ДТлайт, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»). Аналитическая чувствительность апробируемого набора после проведения амплификации составила 5 копий ДНК (10³ ГЭ/мл). Диагностическая чувствительность составила 100% (92,9-100), диагностическая специфичность – 100% (97,6-100). В ходе сравнительных исследований с набором реагентов «АмплиСенс® Corynebacterium diphtheriae/tox-genes-FL» совпадение результатов составило 100% с 95% доверительным интервалом 88,43-100%. Показано отсутствие перекрёстной реактивности в образцах биоматериала, содержащих другие микроорганизмы, выделенные из носо-, ротоглотки и с кожных покровов.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*; ПЦР-ПВ; набор реагентов; дифтерийная инфекция; биологический материал.

Для цитирования: Борисова О.Ю., Кадочникова В.В., Чагина И.А., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Орлова О.Е., Миронов А.Ю., Подопригора И.В. Апробация ПЦР-тест-системы в режиме реального времени для генодиагностики дифтерийной инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (5): 305-312. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-5-305-312>

Для корреспонденции: Миронов Андрей Юрьевич, д-р мед. наук, проф., рук. отдела микробиологии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского; e-mail: andy.60@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 07.04.2023

Принята к печати 14.04.2023

Опубликовано 15.05.2023

Borisova O.Yu.^{1,4}, Kadochnikova V.V.², Chagina I.A.¹, Gadua N.T.¹, Pimenova A.S.¹, Orlova O.E.³, Mironov A.Yu.^{1,5}, Podoprigrora I.V.⁴

DEVELOPMENT OF A PCR REAL-TIME FOR DIAGNOSTIC OF DIPHTHERIA INFECTION

¹G. N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia;

²LLC «DNA-technology», 117587, Moscow, Russia;

³GBUZ of Moscow «City Clinical hospital № 67 named L.A. Vorobokhova DZM»123423, Moscow, Russia;

⁴Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 117198, Moscow, Russia;

⁵Federal scientific and clinical center for specialized types of medical care and medical technologies of the FMBA of Russia, 115682, Moscow, Russia

The results of testing the of reagent kit «C. diphtheriae Tox⁺» (DNA-Technologiya TS, Russia) for diagnostics of diphtheria are presented. 15 typical strains were used, including toxigenic C. diphtheriae № 665, 300 strains and clinical samples (nasal, oropharyngeal and skin swabs) sent to Reference Center for monitoring measles, rubella, mumps, whooping cough and diphtheria G. N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology. Cultivation was carried out according to MUK 4.2.3065-13. For DNA extraction – Ribo-prep (CRIE, Russia), Proba-NK, Proba-GS (DNA-Technologiya, Russia), Proba-MH-Rapid, Proba-Optima (DNA-Technologiya TS, Russia) were used. The comparative reagent kit was AmpliSens Corynebacterium diphtheriae/tox-genes-FL (CRIE, Russia). The analytical sensitivity of the reagent kit after amplification was 5 copies of DNA (10³ GE/ml). Diagnostic sensitivity was 100% (92,9-100), diagnostic specificity was 100% (97,6-100). In comparative studies with the reagent kit AmpliSens Corynebacterium diphtheriae/tox-genes-FL, the results were 100% consistent with a 95% confidence interval of 88,43-100%. The absence of cross-reactivity was show in biomaterial samples containing other microorganisms isolated from the naso-, oropharynx and skin.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*; PCR-real time; reagent kit; diphtheria infection; biological material.

For citation: Borisova O.Yu., Kadochnikova V.V., Chagina I.A., Gadua N.T., Pimenova A.S., Orlova O.E., Mironov A.Yu., Podoprigrora I.V. Development of a PCR real-time for diagnostic of diphtheria infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (5): 305-312 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-5-305-312>

For correspondence: *Mironov A. Yu.*, Dr. Sci. Med., Professor, Head of the Department for Microbiology; e-mail: andy.60@mail.ru

Information about authors:

Borisova O. Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>;
Kadochnikova V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4920-7566>;
Chagina I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2867-9548>;
Gadua N.T., <https://orcid.org/0000-0001-6247-6176>;
Pimenova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-6914-3531>;
Orlova O.E., <https://orcid.org/0000-0001-7210-11161>;
Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Podoprigora I.V., <https://orcid.org/0000-0003-4099-2967>.

Conflict of interests. *The authors declare no conflict of interest.*

Acknowledgment. *The work was performed within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор.*

Received 07.04.2023

Accepted 14.04.2023

Published 15.05.2023

Введение. В последние годы в Российской Федерации эпидемиологическая ситуация в отношении дифтерийной инфекции остается стабильно благополучной. В 2019 году зарегистрировано 5 случаев заболевания и 2 случая бактерионосительства, в 2020 г. – 1 случай заболевания, в 2021 г. – 4 случая заболевания дифтерией и 2 случая бактерионосительства. В 2022 году случаев заболевания или бактерионосительства токсигенных коринебактерий не зарегистрировано [1, 2].

По информации ВОЗ, в мире неблагоприятное по данной инфекции сохраняется [19]. С начала 2022 года и по состоянию на 21 декабря 2022 года по данным Европейского центра профилактики и контроля заболеваний (ECDC) только в странах Европейского региона ВОЗ зарегистрировано 318 случаев дифтерии, в том числе в Австрии (61), Бельгии (25), Франции (14), Германии (116), Италии (2), Нидерландах (5), Норвегии (7), Испании (1), Швейцарии (25), Великобритании (62). В большинстве случаев наблюдались кожные (69,5%) и респираторные (14,5%) формы заболевания, в 8,8% случаев заболевание протекало бессимптомно. Все случаи вызваны токсигенными *C. diphtheriae*. Большинство зарегистрированных случаев заболевания выявлены у лиц мужского пола в возрасте от 8 лет до 49 лет, прибывших из Афганистана, Алжира, Камеруна, Пакистана, Сирии [2]. Сохраняются риски завоза дифтерии, в том числе на территорию Российской Федерации.

Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции на территории России осуществляется бактериологическим методом, порядок проведения которого регламентирован действующими нормативными¹ и методическими² документами. Основной задачей является идентификация возбудителя дифтерии в максимально сжатые сроки (3-5 дней от начала исследования) с помощью минимального набора диагностических тестов [19]. Учитывая широкое применение молекулярно-генетических методов и современную оснащённость лабораторий, несомненно актуальным

является совершенствование лабораторной диагностики дифтерии в направлении разработки и внедрения генодиагностики, что позволяет поднять уровень клинической лабораторной диагностики при этой инфекции. Разработан проект нового нормативного документа по лабораторной диагностике дифтерийной инфекции, в которую интегрирована ПЦР-диагностика для использования с диагностической целью параллельно с бактериологической диагностикой, а также с профилактической целью и по эпидемиологическим показаниям.

Цель работы – апробация разработанного «Набора реагентов для выявления ДНК *Corynebacterium diphtheriae* с дифференциацией токсигенных и нетоксигенных штаммов методом ПЦР в режиме реального времени (*C. diphtheriae* Tox⁺)» для генодиагностики дифтерийной инфекции.

Материал и методы. Для апробации методики генодиагностики использованы 15 типовых коллекционных штаммов микроорганизмов – токсигенный *Corynebacterium diphtheriae* биовара *gravis* № 665, *Corynebacterium xerosis* № 1911, *Bordetella pertussis* № 143, *Bordetella parapertussis* № 386, *Bordetella bronchiseptica* № 9, *Staphylococcus aureus* Wood-46, *S. aureus* Cowan-1, *Streptococcus pyogenes* Dick («ГКПМ-ОБОЛЕНСК») ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора; токсигенный *C. diphtheriae* PW 8, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* «Соколов» (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ); *Corynebacterium minutissimum* ATCC 23348, *Corynebacterium jeikeium* ATCC 43734, *B. holmesii* ATCC 51541, *Candida albicans* ATCC 10231, *S. aureus* ATCC 25923 (American Type Culture Collection).

Использованы 285 штаммов и 510 мазков отделяемого из носо-, ротоглотки, с кожных покровов, присланных в Референс-центр по мониторингу за корью, краснухой, эпидемическим паротитом, коклюшем и дифтерией ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора из бактериологических лабораторий медицинских организаций, Федеральных бюджетных учреждений здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии» (ФБУЗ ЦГиЭ) в субъектах РФ в соответствии с Приказом Роспотребнадзора от 01.12.2017 г. № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекци-

¹СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Раздел XXXVIII «Профилактика дифтерии».

²МУ 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

онных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации». Для оценки аналитической специфичности использована ДНК свежeweыделенных микроорганизмов – 40 штаммов *C. diphtheriae gravis* Tox⁺, 20 штаммов *C. diphtheriae mitis* Tox⁺, 77 штаммов *C. diphtheriae mitis* Tox⁻, 75 штаммов *C. diphtheriae gravis* Tox⁻, 8 штаммов *C. ulcerans* Tox⁻, штаммы *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium afermentans subsp. lipophilum*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium aurimucosum*, *Corynebacterium coyleae*, *Corynebacterium durum*, *Corynebacterium flavescens*, *Corynebacterium imitans*, *Corynebacterium massiliense*, *Corynebacterium mucifaciens*, *Corynebacterium paurometabolum*, *Corynebacterium propinquum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium simulans*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Corynebacterium ureicelerivorans*, *C. xerosis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *S. caprae*, *S. hominis*, *B. pertussis*, *B. paraptussis*, *B. bronchiseptica*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria subflava*, *Rothia dentocariosa*, *Rothia mucilaginosa*, *Actinomyces oral*, *Bacillus cereus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Burkholderia spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp.*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter spp.*, *Enterococcus spp.* (рабочая коллекция лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекции ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора).

Штаммы *C. diphtheriae* выращивали на кровяном теллуриновом агаре (КТА) на основе 2% агара (ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 7% крови крупного рогатого скота (ООО «ЛейТран», Москва) и 0,02% теллурида калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с инкубацией при температуре +(37±1) °С в течение 24-48 часов. Идентификацию микроорганизмов по токсигенным и биохимическим свойствам проводили согласно МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» с помощью набора реагентов для биохимической идентификации «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Н. Новгород). Для проверки аналитической специфичности использована ДНК штаммов различных микроорганизмов с концентрацией матриц не ниже 10⁹ ГЭ/мл. Оценка аналитической чувствительности проведена с помощью линейки серийных десятикратных разведений (10¹-10⁹) типового контрольного токсигенного штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, концентрацию исходной взвеси измеряли по стандартному образцу мутности 10 единиц (ОСО 42-28-86 П), с последующим высевом на КТА и инкубированием 48 ч при 37 °С. Контаминацию мазков из носо-, ротоглотки, с кожных покровов проводили путём нанесения на них приготовленной бактериальной суспензии.

Для выделения ДНК использовали наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот – «РИБО-

преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора), «ПРОБА-НК», «ПРОБА-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), «ПРОБА-МЧ-РАПИД», «ПРОБА-ОПТИМА» (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия) в соответствии с инструкциями производителей. В качестве анализируемой тест-системы использован «Набор реагентов для выявления ДНК *Corynebacterium diphtheriae* с дифференциацией токсигенных и нетоксигенных штаммов методом ПЦР в режиме реального времени (*C. diphtheriae* Tox⁺)» (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия). В качестве сравнительной тест-системы – «АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae* / *tox-genes-FL*. – качественное определение генов, кодирующих токсины *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans* (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Постановка ПЦР-РВ проводилась с использованием трёх амплификаторов – ДТпрайм, ДТлайт, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»), руководствуясь инструкцией производителя.

Апробация набора реагентов проведена согласно ГОСТ^{3,4,5}.

Результаты. Апробируемый набор реагентов предназначен для выявления ДНК и дифференциации токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* в биологическом материале человека (отделяемое со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, отделяемое с поражённых участков кожи, чистые культуры бактерий) методом ПЦР-РВ. Интерпретация результатов производится следующим образом: в образцах биологического материала, содержащих ДНК *C. diphtheriae*, регистрируются положительные результаты амплификации специфического продукта (фрагмент ДНК *C. diphtheriae*); в образцах биологического материала, содержащих ДНК токсигенных *C. diphtheriae*, – положительные результаты амплификации специфических продуктов (фрагменты ДНК *C. diphtheriae* и гена токсина – *C. diphtheriae tox*⁺); в образцах биологического материала, не содержащих ДНК *C. diphtheriae*, при проведении амплификации – отрицательные результаты амплификации и положительный результат амплификации внутреннего контроля.

Для оценки аналитической чувствительности апробируемого набора готовили три линейки серийных десятикратных разведений контрольного штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665: 10⁹-10¹ м.к. в 1 мл. Из 100 мкл каждого разведения суспензий выделяли ДНК с помощью двух наборов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) и «ПРОБА-НК» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Параллельно с этим, для определения общего количества жизнеспособных микроорганизмов в 1 мл бактериальной

³ГОСТ Р 53022.3-2008 «Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов».

⁴ГОСТ Р ЕН 13612-2010 «Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики *in vitro*».

⁵ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний».

взвеси, из каждого разведения производили высеив по 100 мкл на кровяной теллуритовый агар и инкубировали при 37 °С. Через 48 часов подсчитывали число выросших колоний (КОЕ/мл) (табл. 1).

После проведения амплификации аналитическая чувствительность апробируемого набора составила 5 копий ДНК на амплификационную пробирку, что соответствует 10³ ГЭ/мл.

Проведена оценка диагностических характеристик апробируемых наборов с установлением показателей диагностической чувствительности и специфичности. Диагностическая чувствительность (ДЧ) рассчитывалась по формуле:

$$ДЧ = \frac{ИП}{ИП + ЛО} \times 100\%,$$

где: ИП – истинно положительные результаты и ЛО – ложноотрицательные результаты в случае отрицательного результата, полученные на испытуемом наборе реагентов и в сравнительном методе.

Диагностическая специфичность (ДС) рассчитывалась по формуле:

$$ДС = \frac{ИО}{ИО + ЛП} \times 100\%,$$

где: ИО – истинно отрицательные результаты и ЛП – ложноположительные результаты в случае положительного результата, на испытуемом наборе реагентов и в сравнительном методе, 95% доверительный интервал для чувствительности и специфичности рассчитывали на основании распределения χ^2 [3].

Таблица 1

Разведения и учёт КОЕ/мл токсигенного штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665

Разведение условное	Количество м. к. в 1 мл взвеси бактериальной культуры	Число колониеобразующих единиц в 1 мл взвеси бактериальной культуры (КОЕ/мл)
Исходная	10 ⁹	Сплошной рост
-1	10 ⁸	Сплошной рост
-2	10 ⁷	Сплошной рост
-3	10 ⁶	Густой рост
-4	10 ⁵	Множественный рост
-5	10 ⁴	4,5×10 ²
-6	10 ³	3,1×10 ¹
-7	10 ²	2
-8	10 ¹	Рост отсутствует

Эффективность набора при исследовании штаммов определяли путём оценки количества идентично воспроизведённых результатов исследования по сравнению с набором реагентов для идентификации «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Н. Новгород) (табл. 2).

С учётом статистической неопределённости согласно Методическим рекомендациям по порядку проведения и экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий ФГБУ ВНИИ-ИМТ Росздравнадзора 2013 г. определяли долю истинных результатов ($P_{ист}$) с доверительной вероятностью 90% по формуле:

$$P_{ист} = 0,1^{1/N},$$

где: N – количество проведённых исследований.

При оценке диагностических характеристик (диагностической чувствительности и диагностической специфичности) использовано количество правильно определённых штаммов *C. diphtheriae*, выявляемых с использованием испытуемого набора реагентов «*C. diphtheriae* Тох⁺». Диагностические характеристики рассчитаны для каждого штамма *C. diphtheriae* (токсигенного или нетоксигенного) по отдельности по следующим формулам: истинно положительными (ИП) результатами считалось обнаружение в биологическом материале ДНК *C. diphtheriae* нетоксигенных штаммов (*tox*⁻) апробируемым набором реагентов при наличии в образце нетоксигенного штамма *C. diphtheriae*, подтверждённого биохимической тест-системой; ложноположительными (ЛП) результатами считалось обнаружение в биологическом материале ДНК *C. diphtheriae* нетоксигенных штаммов (*tox*⁻) апробируемым набором реагентов и отсутствие в образце нетоксигенного штамма *C. diphtheriae*, подтверждённого биохимической тест-системой; истинно отрицательными (ИО) результатами считалось получение отрицательного результата (не обнаружена ДНК *C. diphtheriae*) апробируемым набором реагентов и отсутствие в образце нетоксигенного штамма *C. diphtheriae*, подтверждённого биохимической тест-системой; ложно отрицательным (ЛО) результатом считалось получение отрицательного результата (не обнаружена ДНК *C. diphtheriae*) апробируемым набором реагентов при наличии в образце нетоксигенного штамма *C. diphtheriae*, подтверждённого биохимиче-

Таблица 2

Детекция ДНК *C. diphtheriae* с помощью набора реагентов «*C. diphtheriae* Тох⁺» и штаммов *C. diphtheriae* с помощью набора реагентов «ДС-ДИФ-КОРИНЕ»

Биоматериал	Всего образцов	Набор реагентов « <i>C. diphtheriae</i> Тох ⁺ »	Набор реагентов ДС-ДИФ-КОРИНЕ	
			<i>C. diphtheriae</i> НТШ	<i>C. diphtheriae</i> ТШ
Штаммы	212	Обнаружено ДНК <i>C. diphtheriae</i> НТШ (<i>tox</i> ⁻)	152	0
		Обнаружено ДНК <i>C. diphtheriae</i> ТШ (<i>tox</i> ⁺)	0	60
Мазки из носо- и ротоглотки, контаминированные микроорганизмами	260	Обнаружено ДНК <i>C. diphtheriae</i> НТШ (<i>tox</i> ⁻)	152	0
		Обнаружено ДНК <i>C. diphtheriae</i> ТШ (<i>tox</i> ⁺)	0	60
Мазки с поражённых участков кожи, контаминированные микроорганизмами	250	Не обнаружена ДНК <i>C. diphtheriae</i>	0	0
		Обнаружено ДНК <i>C. diphtheriae</i> НТШ (<i>tox</i> ⁻)	152	0
		Обнаружено ДНК <i>C. diphtheriae</i> ТШ (<i>tox</i> ⁺)	0	60
		Не обнаружена ДНК <i>C. diphtheriae</i>	0	0

Примечание. НТШ – нетоксигенные штаммы, ТШ – токсигенные штаммы.

ской тест-системой. Выявлено 60 истинно-положительных и 152 истинно-отрицательных результатов.

Диагностическая чувствительность и специфичность набора реагентов «*C. diphtheriae* Tox⁺» при исследовании токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, мазков отделяемого со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, кожных покровов, контаминированных токсигенными и нетоксигенными штаммами *C. diphtheriae*, представлена в табл. 3.

В рамках проведения апробации проведены сравнительные исследования образцов биоматериала, полученные с использованием испытуемого набора реагентов и набора реагентов для диагностики *in vitro* «АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae/tox-genes-FL*» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Для исследования использованы 10 мазков отделяемого из ротоглотки, контаминированных токсигенным штаммом *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, 10 мазков отделяемого из ротоглотки, контаминированных нетоксигенным штаммом *C. diphtheriae* биовара *gravis*, по 10 штаммов этих же микроорганизмов. Воспроизводимость оценивалась по проценту совпадений полученных результатов с 95% доверительным интервалом (табл. 4).

В ходе сравнительных исследований совпадение результатов составило 100% с 95% доверительным интервалом 88,43-100%.

Оценка воспроизводимости результатов, полученных с использованием апробируемого набора реагентов «*C. diphtheriae* Tox⁺», проведена с использованием различных наборов реагентов для выделения ДНК и разных амплификаторов. Для выделения ДНК из образцов применены четыре набора реагентов: «ПРОБА-НК», «ПРОБА-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), «ПРОБА-МЧ-РАПИД», «ПРОБА-ОПТИМА» (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия). В качестве испытуемых образцов использованы 5 мазков из ротоглотки, контаминированных токсигенным штаммом *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, 5 мазков из ротоглотки, контаминированных нетоксигенным штаммом *C. diphtheriae* биовара *gravis*, по 10 штаммов этих же микроорганизмов. Воспроизводимость оценивалась по проценту совпадений полученных результатов с 95% доверительным интервалом (табл. 5).

Результаты исследования образцов с использованием всех четырёх наборов реагентов для выделения ДНК показали воспроизводимость результатов – со-

Таблица 3

Диагностические характеристики набора реагентов «*C. diphtheriae* Tox⁺»

Биоматериал	Всего образцов	Результаты исследования набора реагентов « <i>C. diphtheriae</i> Tox ⁺ »	Результаты исследования набор реагентов «ДС-ДИФ-КОРИНЕ»		Эффективность
			<i>C. diphtheriae</i> НТШ	<i>C. diphtheriae</i> ТШ	
Штаммы	50	Обнаружено ДНК <i>C. diphtheriae</i> (<i>tox</i> ⁺)	25	0	100% (P _{ист} =91,2%)
		Обнаружено ДНК <i>C. diphtheriae</i> (<i>tox</i> ⁻)	0	25	100% (P _{ист} =91,2%)
Суммарная эффективность 100% (P _{ист} =95,5%)					
Биоматериал	<i>C. diphtheriae</i> НТШ (<i>tox</i> ⁻)		<i>C. diphtheriae</i> ТШ (<i>tox</i> ⁺)		
	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность	
Мазки отделяемого со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	100% (92,9-100)	100% (97,6-100)	100% (92,9-100)	100% (97,6-100)	
Мазки отделяемого с поражённых участков кожи	100% (92,9-100)	100% (97,6-100)	100% (92,9-100)	100% (97,6-100)	

Примечание. НТШ – нетоксигенные штаммы, ТШ – токсигенные штаммы.

Таблица 4

Исследование образцов биоматериала с использованием испытуемого набора реагентов и набора реагентов «АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae/tox-genes-FL*»

Вид образца	Количество	« <i>C. diphtheriae</i> Tox ⁺ »	«АмплиСенс® <i>Corynebacterium diphtheriae/tox-genes-FL</i> »	Вывод
Мазок отделяемого из ротоглотки + <i>C. diphtheriae</i> (Tox ⁺)	10	<i>C. diphtheriae</i> (<i>tox</i> ⁺)	<i>C. diphtheriae</i> (<i>tox</i> ⁺)	Совпадает
Мазок отделяемого из ротоглотки + <i>C. diphtheriae</i> (Tox ⁻)	10	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>	Совпадает
Штамм <i>C. diphtheriae</i> (Tox ⁺)	10	<i>C. diphtheriae</i> (<i>tox</i> ⁺)	<i>C. diphtheriae</i> (<i>tox</i> ⁺)	Совпадает
Штамм <i>C. diphtheriae</i> (Tox ⁻)	10	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>	Совпадает
Мазок из ротоглотки	10	Отрицательно	Отрицательно	Совпадает
Штамм <i>S. aureus</i>	10	Отрицательно	Отрицательно	Совпадает
Штамм <i>C. pseudodiphtheriticum</i>	10	Отрицательно	Отрицательно	Совпадает
Штамм <i>S. pneumoniae</i>	10	Отрицательно	Отрицательно	Совпадает
Количество совпадений результатов исследования			90 из 90	

Таблица 5

Исследование образцов ДНК, выделенных с помощью разных наборов реагентов для выделения

Вид образца	Количество	Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот				Вывод
		ПРОБА-НК	ПРОБА-ГС	ПРОБА-МЧ-РАПИД	ПРОБА-ОПТИМА	
Мазок отделяемого из ротоглотки + <i>C. diphtheriae</i> (Tox ⁺)	5	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	Совпадает
Мазок отделяемого из ротоглотки + <i>C. diphtheriae</i> (Tox ⁻)	5	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>	Совпадает
Штамм <i>C. diphtheriae</i> (Tox ⁺)	10	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	Совпадает
Штамм <i>C. diphtheriae</i> (Tox ⁻)	10	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>	Совпадает

Таблица 6

Апробация набора реагентов с использованием разных амплификаторов

Вид образца	Количество	Амплификатор			Вывод
		ДТпрайм	ДТлайт	ДТ-96	
Мазок отделяемого из ротоглотки + <i>C. diphtheriae</i> (Tox ⁺)	5	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	Совпадает
Мазок отделяемого из ротоглотки + <i>C. diphtheriae</i> (Tox ⁻)	5	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>	Совпадает
Штамм <i>C. diphtheriae</i> (Tox ⁺)	5	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	<i>C. diphtheriae</i> (tox ⁺)	Совпадает
Штамм <i>C. diphtheriae</i> (Tox ⁻)	5	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>	<i>C. diphtheriae</i>	Совпадает
Количество совпадений результатов исследования	20 из 20				

впадение составило 100% с 95% доверительным интервалом 83,16-100%.

В качестве используемых амплификаторов применены амплификаторы – ДТпрайм, ДТлайт, ДТ-96. Для исследования готовили по 10 мазков отделяемого из ротоглотки, контаминированных токсигенным штаммом *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665 и нетоксигенным штаммом *C. diphtheriae* биовара *gravis*, по 10 бактериальных культур этих же штаммов. Каждый образец исследован в трёх повторях. Воспроизводимость оценена по проценту совпадений полученных результатов с 95% доверительным интервалом (табл. 6).

В результате проведённого исследования 20 образцов (по 3 повтора каждого образца, итого 60 образцов) с использованием токсигенного и нетоксигенного штаммов *C. diphtheriae* биовара *gravis* и различных амплификаторов (ДТпрайм, ДТлайт, ДТ-96) получена воспроизводимость результатов – совпадение составило 100% с 95% доверительным интервалом 88,43-100%.

Оценка аналитической специфичности проведена в два этапа. На первом этапе в качестве матрицы использована ДНК свежесделанных штаммов микроорганизмов различных видов с концентрацией не ниже 10⁹ ГЭ/мл – *C. accolens*, *C. afermentans subsp. lipophilum*, *C. amycolatens*, *C. aurimucosum*, *C. coyleae*, *C. durum*, *C. flavescens*, *C. imitans*, *C. massilienses*, *C. mucifaciens*, *C. paurometabolum*, *C. propinquum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. simulans*, *C. striatum*, *C. tuberculostearicum*, *C. ulcerans tox*, *C. ureicelerivorans*, *C. xerosis*, *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. epidermidis*, *S. mitis*, *S. parasanguinis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. aureus*, *S. caprae*,

S. hominis, *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *N. meningitidis*, *N. mucosa*, *N. subflava*, *R. dentocariosa*, *R. mucilaginosus*, *Actinomyces oral*, *B. cereus*, *B. bifidum*, *H. influenzae*, *Streptococcus sanguinis*, *Escherichia coli*, *Burkholderia* spp., *K. pneumoniae*, *Proteus* spp., *M. morganii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp. Выделение ДНК проведено с использованием комплекта «ПРОБА-НК». Показано отсутствие перекрёстной реактивности с микроорганизмами, которые могут контаминировать образцы биоматериала. На втором этапе оценка аналитической специфичности проведена с использованием 15 образцов биоматериала (мазки отделяемого со слизистой оболочки носоглотки), не содержащих *C. diphtheriae*. Образцы биоматериала разделены на две равные аликвоты. В 15 аликвот добавлены культуры микроорганизмов (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *N. meningitidis*, *N. mucosa*, *E. coli*, *Burkholderia* spp., *K. pneumoniae*, *Proteus* spp., *M. morganii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp.) в объёме, не превышающем 10% от исходного объёма аликвоты. В 15 аликвот, используемых в качестве контроля, добавлен физиологический раствор в объёме 10% от исходного объёма аликвоты. Выделение ДНК проведено с использованием комплекта ПРОБА-НК. Продемонстрировано отсутствие перекрёстной реактивности в образцах исследованного биоматериала, содержащих другие виды микроорганизмов.

Обсуждение. Развитие методов генодиагностики дифтерии прошло значительный путь от ДНК-ДНК гибридизации до ПЦР-РВ и изотермической ампли-

фикации. В 1990-х годах за рубежом появились первые публикации, посвящённые вопросу о возможности использования методов генодиагностики для детекции токсигенных *C. diphtheriae*. В 1991 году впервые применён метод ПЦР с целью детекции гена *tox* у *C. diphtheriae* [4]. После этого ПЦР в классическом варианте стала широко использоваться для проведения аналогичных исследований как отечественными, так и зарубежными исследователями [5–11]. Все эти работы направлены на определение токсигенных свойств у *C. diphtheriae*, выделенных в чистой культуре, поэтому использование молекулярно-генетических методов на тот момент не позволило сократить время проведения исследования и обнаружить возбудителя дифтерии в клиническом образце. В конце 1990-х годов коллективом авторов МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского разработан способ ПЦР-диагностики дифтерии с электрофоретической детекцией продуктов амплификации, дающий возможность в клиническом материале в течение 5–6-ти часов выявить фрагмент гена *tox* размером 340 п.н. [12]. Разработанный метод ПЦР позволял осуществлять ускоренную лабораторную диагностику при обследовании больных с подозрением на дифтерию с целью своевременной постановки диагноза и проведения лечебных мероприятий, выявления контактных лиц и бактерионосителей в очагах инфекции, для идентификации нетоксигенных токснесущих (НТТН) штаммов *C. diphtheriae* и изучения их значимости в эпидемическом процессе дифтерийной инфекции. Одновременно в ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора предложен набор реагентов для выявления ДНК токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в клиническом материале «АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae* – EPh», позволяющий выявить фрагмент гена *tox* размером 360 п.н. Применение этого набора не позволяло дифференцировать ген *tox* у токсигенных штаммов *C. diphtheriae* от «молчащего» гена *tox* у НТТН-штаммов *C. diphtheriae*. С 2000-х годов развитие ПЦР-диагностики дифтерийной инфекции шло в направлении разработки ПЦР-РВ [13–15]. С помощью предложенных вариантов ПЦР детекция гена, кодирующего дифтерийный токсин, осуществлялась в чистой культуре коринебактерий. Только в двух работах предприняты попытки детекции гена *tox* с помощью ПЦР-РВ на ограниченном числе иммитантов и клинических образцов [16, 17]. Для ПЦР-диагностики дифтерии стали создавать мультиплексные варианты ПЦР, позволяющие детектировать не только ген *tox* у *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*, но и дифференцировать эти виды микроорганизмов между собой [18, 20, 21]. На данный момент разработано два варианта, один из которых дифференцирует токсигенные и нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae*, а другой дополнительно дифференцирует виды *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*. Ни одна из предложенных технологий, а также зарегистрированный набор реагентов «АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae/tox-genes-FL*» и апробируемая тест-система не позволяют дифференцировать токсигенные штаммы *C. diphtheriae* от

НТТН-штаммов *C. diphtheriae*, циркуляция которых в конце 1990-х и начале 2000-х годов достигала 30%. В связи с этим, в проекте нового нормативного документа по лабораторной диагностике дифтерийной инфекции обращено внимание на то, что при получении положительного ПЦР-результата необходимо будет проводить повторное взятие биологического материала и проведение бактериологического исследования с постановкой пробы на токсигенность, которая позволяет дифференцировать токсигенные и нетоксигенные токснесущие штаммы *C. diphtheriae*, а первичный материал (тампоны от больного) и положительный ДНК-образец направляются в Референс-центр по мониторингу за корью, краснухой, эпидемическим паротитом, коклюшем и дифтерией ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора (Москва, ул. Адмирала Макарова, 10) для верификации.

Заключение. Отечественный набор реагентов для генодиагностики дифтерии «*C. diphtheriae Tox⁺*» производства ООО «ДНК-Технология ТС» (Россия) позволяет детектировать ДНК *C. diphtheriae* в биоматериале и дифференцировать токсигенные и нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae*. Аналитическая чувствительность набора «*C. diphtheriae Tox⁺*» составляет 5 копий ДНК (10^3 ГЭ/мл); диагностическая чувствительность – 100% (92,9–100); диагностическая специфичность – 100% (97,6–100). У набора реагентов «*C. diphtheriae Tox⁺*» отсутствует перекрёстная реактивность в образцах биоматериала, содержащих другие виды микроорганизмов, выделенные из носоглотки и с кожных покровов. Набор реагентов «*C. diphtheriae Tox⁺*» не позволяет дифференцировать токсигенные штаммы *C. diphtheriae* от НТТН-штаммов *C. diphtheriae*.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 4, 6–10, 13–17, 20, 21
см. REFERENCES)

1. О заболеваемости дифтерией, мониторинге за возбудителем и состоянием антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России в 2021 году. Информационное письмо Роспотребнадзора от 08.12.2022 № 02/23785-2022-27.
2. Об эпидемиологии и мерах профилактики дифтерии на территории Российской Федерации. Информационное письмо Роспотребнадзора от 16.01.2023 г. № 02/455-2023-27.
5. Нарвская О.В., Мокроусов И.В. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики дифтерии и изучения возбудителя: пособие для врачей. СПб: НИИЭМ им. Пастера; 1995.
11. Ценёва Г.Я., Щедеркина Е.Е. Применение полимеразной цепной реакции в диагностике дифтерийной инфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*; 2000; 5: 72–4.
12. Комбарова С., Мельников В.Г., Борисова О.Ю., Платонова Т.В., Соков Б.Н., Смердов Г.Н. и др. Усовершенствование методики постановки полимеразной цепной реакции для выявления гена дифтерийного токсина. *Проблемы инфекционных болезней*. 2000; 1: 47–52.
18. Васильев Д.А., Мاستиленко А.В., Борисова О.Ю., Полетаева Т.Н., Макшанова Н.В. Разработка системы молекулярно-генетической идентификации *Corynebacterium ulcerans* на основе ПЦР в режиме реального времени. *Молекулярная диагностика*. 2014; 2(27): 487–8.
19. Харсеева Г.Г., Алутина Э.Л., Гасретова Т.Д., Дятлов И.А. Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты. М.: Практическая медицина; 2014. ISBN 978-5-98811-277-8.

REFERENCES

1. On the incidence of diphtheria, monitoring of the pathogen and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population in 2021. Information letter of Rospotrebnadzor dated 08.12.2022. № 02/23785-2022-27. (in Russian)
2. On the epidemiological situation and measures to prevent diphtheria in Russian Federation. Information letter of Rospotrebnadzor dated 16.01.2023. № 02/455-2023-27. (in Russian)
3. Statistical Methods for Rates and Proportions (2nd ed.) Section 5.6 (by Joseph L. Fleiss). Pub.: John Wiley & Sons, New York; 1981.
4. Pallen M.J. Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology*. 1991; 44(12): 1025-6.
5. Narvskaya O.V., Mokrousov I.V. The use of polymerase chain reaction for the diagnosis of diphtheria and the study of the pathogen: a manual for doctors. St. Petersburg: Institute mikrobiologii i epidemiologii imeni Pastera; 1995. (in Russian)
6. Aravena-Roman M., Bowman R., O'Neill G. Polymerase chain reaction for the detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Pathology*. 1995; 27(1): 71-3.
7. Efstratiou A., Engler K.H., Dawes C.S., Sesardic D. Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheria toxin among isolates of pathogenic corynebacterial. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36(11): 3173-7.
8. Mikhailovich V.M., Melnikov V.G., Mazurova I.K., Wachsmuth I.K., Wenger J.D., Wharton M. et al. Application of PCR for detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated during the Russian diphtheria epidemic, 1990 through 1994. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33(11): 3061-3.
9. Nakao H., Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35(7): 1651-5.
10. 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. *Journal of Clinical Pathology*; 1994; 47(4): 353-6.
11. Tseneva G.Ya., Shederkina E.E. Use of polymerase chain reaction in diagnosis of diphtheria infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2000; 5: 72-4. (in Russian)
12. Kombarova S.Yu., Mel'nikov V.G., Borisova O.Yu., Platonova T.V., Sokov B.N., Smerdov G.N. et al. Improvement of polymerase chain reaction procedure for detection of diphtheria toxin gene. *Problemy infektsionnykh bolezney*. 2000; 1: 47-52. (in Russian)
13. Cassidy P.K., Pawloski L.C., Tiwari T., Sanden G.N., Wilkins P.P. Analysis of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains revealing potential for false-negative real-time PCR results. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46(1): 331-3.
14. Schuëgger R., Lindermayer M., Kugler R., Heesemann J., Bursch U., Sing A. Detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by a novel real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46(8): 2822-3.
15. Sing A., Berger A., Schneider-Brachert W., Holzmann T., Reischl U. Rapid detection and molecular differentiation of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by LightCycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49(7): 2485-9.
16. Mancini F., Monaco M., Pataracchia M., von Hunolstein C., Pantosti A., Ciervo A. Identification and molecular discrimination of toxigenic and nontoxigenic diphtheria *Corynebacterium* strains by combined real-time polymerase chain reaction assays. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012; 73(2): 111-20.
17. Mothershed E.A., Cassidy P.K., Pierson K., Mayer L.W., Popovic T. Development of a real-time fluorescence PCR assay for rapid detection of the diphtheria toxin gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(12): 4713-9.
18. Vasil'ev D.A., Mastilenko A.V., Borisova O.Yu., Poletaeva T.N., Makshanova N.V. Development of the molecular genetic identification system *Corynebacterium ulcerans* based on real-time PCR. *Molekulyarnaya diagnostika*. 2014; 2(27): 487-8. (in Russian)
19. Kharseeva G.G., Alutina E.L., Gasretova T.D., Dyatlov I.A. Diphtheria: microbiological and immunological aspects. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2014. ISBN 978-5-98811-277-8. (in Russian)
20. Pimenta F.P., Hirata Jr., Rosa A.C., Milagres L.G., Mattos-Guaraldi A.L. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. *Journal of Medical Microbiology*. 2008; 57(11): 1438-9.
21. Torres Lde.F., Ribeiro D., Hirata Jr.R., Pacheco L.G., Souza M.C., dos Santos L.S. et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium spp.* with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013; 108(3): 272-9.