

Compte rendu du sixième Congrès international du Groupe de Travail Européen sur la Diphtérie à Bruxelles, Belgique

S. Lai, A. Efstratiou représentant le Groupe de Travail Européen sur la Diphtérie.

Centre collaborateur de l'O.M.S. pour la diphtérie et les infections à streptocoques, Laboratoire de recherche sur les infections respiratoires et générales, Laboratoire Général de Santé Publique du PHLS, Londres, Royaume-Uni.

Parallèlement à la résurgence de la diphtérie observée en Europe de l'est au cours de ces dix dernières années, on a pu constater l'apparition d'infections causées par des souches de *Corynebacterium diphtheriae* non toxigènes, et par des souches de *C. diphtheriae* non toxigènes mais porteuses du gène de la toxine. Ces souches pouvant être à l'origine d'infections symptomatiques de degrés de gravité variables, il convient d'évaluer leur importance clinique et épidémiologique. La présence persistante de souches toxigènes et non toxigènes de *C. diphtheriae*, associée à la variabilité de génotypes et de biotypes, implique la mise en œuvre de nouvelles mesures de vaccination des populations. L'injection de rappel du vaccin reste la méthode de protection la plus efficace de la population adulte, groupe de population actuellement le plus exposé. La mise en place d'un bon système de surveillance, d'une prophylaxie antibiotique efficace et de programmes de vaccination actualisés, doit aller de pair avec la poursuite des études sérologiques qui permettent de surveiller le statut immunitaire de la population.

Les communications du sixième Congrès international du Groupe de Travail Européen sur la Diphtérie (*European Laboratory Working Group on Diphtheria* - ELWGD) ont donné un aperçu des aspects microbiologiques et épidémiologiques de la diphtérie dans les nouveaux états indépendants de l'ex-Union soviétique. Elles ont aussi permis de procéder à une analyse internationale récente des avancées réalisées dans les domaines épidémiologiques, cliniques et microbiologiques associés à cette maladie.

Surveillance microbiologique de la diphtérie

Deux programmes communautaires de la Direction Générale Recherche et Développement Technologique (*Directorate General Research & Technological Development* - DGRTD) du quatrième programme cadre, ont été associés aux activités paneuropéennes du Groupe de Travail Européen sur la Diphtérie (1). Les programmes BioMed 2 BMH4-CT98.3793 et INCO-Copernicus IC15CT.98.0302 ont en effet tous deux pour objectif la surveillance microbiologique de la diphtérie, respectivement en Europe et en Europe de l'Est. Dans le cadre de ces programmes et du ELWGD, des Centres Nationaux de Référence (CNR) sur la diphtérie ont été établis en Arménie, en Autriche, en Biélorussie, au Brésil, en France, en Géorgie, en Grèce, en Italie, au Kazakhstan, en Lettonie et en Turquie. Ces mesures ont contribué à réorienter et à concentrer les moyens engagés en vue d'une standardisation et d'une meilleure intégration des méthodologies appliquées pour le diagnostic biologique de la diphtérie et pour le typage épidémiologique de l'agent pathogène, le bacille *C. diphtheriae*. Elles ont également abouti à la coordination de programmes internationaux d'assurance qualité (*External Quality Assessment* ou EQA), destinés à contrôler et à évaluer ces activités et à permettre l'élaboration de la première base de données internationale de génotypes de *C. diphtheriae*. Les ateliers d'information créés et le récent lancement d'un site Internet à l'adresse suivante : <http://www.phls.co.uk/international/diphtheria/diphtheria.htm>, ont sensibilisé encore davantage la communauté scientifique à cette pathologie. De plus, la mise en place de bases de données au Royaume-Uni, à Londres, destinées à la surveillance microbiologique de la diphtérie dans les pays d'Europe occidentale et à Smolensk, en Russie pour la surveillance microbiologique de la diphtérie dans les pays d'Europe orientale, a permis de centraliser les données, contribuant ainsi à une surveillance permanente de la maladie. Les études visant à développer des techniques de tests de toxicité et d'examen de la séquence génomique de cet agent pathogène représentent des perspectives de recherche prometteuses par rapport à notre compréhension de sa pathogénie. Ces recherches devraient donc entraîner la mise au point de nouveaux outils diagnostiques, thérapeutiques et prophylactiques, et devraient enfin nous permettre de mieux comprendre l'interaction hôte/agent pathogène dans le domaine de la santé publique.

Report on the Sixth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Brussels, Belgium

S. Lai, A. Efstratiou on behalf of the European Laboratory Working Group on Diphtheria.

WHO Collaborating Centre for Diphtheria and Streptococcal Infections, Respiratory and Systemic Infection Laboratory, PHLS Central Public Health Laboratory, London, United Kingdom.

In addition to the Eastern European resurgence of diphtheria during the last decade, there has also been an emergence of infections caused by non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and non-toxigenic, toxin gene bearing *C. diphtheriae*. Given that these strains may manifest as symptomatic infections of differing degrees of severity, their clinical and epidemiological significance need to be assessed. The persistence of toxigenic and non-toxigenic *C. diphtheriae* in circulation, together with genotypic and biotype variability means that innovative measures to vaccinate populations are pertinent. The most effective method of protecting the currently most vulnerable population group (adults) is to implement a booster dose of vaccine amongst the adult populations. Furthermore, in combination with an efficient surveillance system, effective antibiotic prophylaxis and an up-to-date vaccination programme, serological studies needs to be maintained to monitor the immunity status of the population.

Presentations at the Sixth International Meeting of the *European Laboratory Working Group on Diphtheria* (ELWGD), provided an overview on the microbiology and epidemiology of diphtheria in the Newly Independent States of the former Soviet Union (NIS) and an international updated review of progress in epidemiological, clinical and microbiological aspects.

Microbiological Surveillance of diphtheria

Two European Commission (EC) Fourth Framework Directorate General Research and Technological Development (DGRTD) programmes have contributed to the pan-European activities of the ELWGD (1); BioMed 2 BMH4-CT98.3793 and INCO-Copernicus IC15CT.98.0302. The objectives of both programmes are the microbiological surveillance of diphtheria, in Europe and Eastern Europe respectively. Within the remit of these programmes and the ELWGD, National Diphtheria Reference Centres have been established in Armenia, Austria, Belarus, Brazil, France, Georgia, Greece, Italy, Kazakhstan, Latvia and Turkey. This has facilitated concerted and networked efforts towards the standardisation and integration of methodologies for the laboratory diagnosis of diphtheria and epidemiological typing of the causative organism, *C. diphtheriae*. These initiatives have also led to the co-ordination of international External Quality Assessment (EQA) schemes to monitor and assess these activities and construction of the first international genotype database for *C. diphtheriae*. Awareness has been enhanced through training workshops and the recently launched website <http://www.phls.co.uk/international/diphtheria/diphtheria.htm>. Moreover, the establishment of the microbiological surveillance databases on diphtheria in London (UK) for reports in the Western European countries and in Smolensk (Russia) for Eastern European countries has provided a centralisation of data for continued monitoring of this disease. Further research to develop techniques in toxigenicity testing, and exploration into the genome sequence of this causative organism are providing sources of inspiration for other lines of enquiry regarding our understanding of its pathogenesis. This should lead to further development of novel diagnostics, therapeutics and prophylactics and ultimately, advance our understanding of the host-pathogen interaction to public health.

Epidemiology and microbiology of diphtheria in the NIS

Genotypic and phenotypic characteristics of diphtheria are not as homogeneous as was once thought. The predominant strain within the European Region has shifted from *C. diphtheriae* biotype *mitis* Toulouse-1 ribotype during the 1940-1970s to biotype *gravis* of "Sankt Petersburg" and "Rossiya" ribotypes (pers. comm. P. A. D. Grimont) in the more recent epidemic of the 1990s. Clinical manifestations of diphtheria caused by *C. diphtheriae* var *mitis* have been frequently presented with croup amongst

Epidémiologie et microbiologie de la diphtérie dans les États nouvellement indépendants de l'ex Union soviétique

Les caractéristiques génotypiques et phénotypiques de la diphtérie ne sont pas aussi homogènes qu'on pouvait le croire. En effet, si dans les années 1940 à 1970, la souche prédominante en Europe était la souche *C. diphtheriae* variété *mitis*, ribotype Toulouse-1 ; la souche de *C. diphtheriae* identifiée lors des épidémies plus récentes des années 1990 était la variété *gravis* de ribotypes « Sankt Petersburg » et « Rossiya » (PAD Grimont, comm. pers.). La diphtérie causée par la souche de *C. diphtheriae* variété *mitis*, a souvent pris la forme clinique d'une diphtérie laryngée (croup) chez les enfants russes non vaccinés, tandis que des données épidémiologiques démontraient que des groupes de population différents qui avaient été vaccinés, présentaient des degrés de gravité variables de la maladie, notamment la population adulte, les sans-abri et les toxicomanes.

La maîtrise de l'épidémie de diphtérie dans la plupart des pays baltes et des États indépendants de l'ex-Union soviétique, montre les progrès réalisés depuis la mise en œuvre d'une stratégie plus efficace de prévention et de contrôle de la santé publique (2, 3). La diphtérie reste toutefois un problème majeur au Kirghizistan, en Lettonie, au Tadjikistan et en Ukraine. Malgré l'amélioration de la situation observée en 1998 au Kirghizistan, au Tadjikistan et en Ukraine, le taux d'incidence de la diphtérie dans les nouveaux États indépendants de l'ex-Union soviétique reste supérieur au taux fixé par l'OMS, qui est de moins de 1 cas pour 100 000 habitants (<http://cisid.who.dk/dip/DipRO2.asp>).

Cette situation est encore aggravée par une surveillance microbiologique insuffisante de la *C. diphtheriae* dans certaines régions des États de l'ex-Union soviétique. De plus, les organismes de financement, tels que l'UNICEF (Fonds des Nations Unies pour l'Enfance), l'IFRC (Fédération Internationale des sociétés de la Croix-Rouge et du Croissant-Rouge), l'OMS (Organisme mondial de la santé) ainsi que d'autres organismes donateurs (1) de kits de laboratoire OMS/PHLS pour le dépistage de la diphtérie, se sont désengagés. Certains pays ont connu, à cause de cette situation, une pénurie de réactifs utilisés pour les diagnostics microbiologiques et ne pouvaient plus compter que sur le seul diagnostic clinique des cas de diphtérie.

Emergence de souches de *C. diphtheriae* non toxigènes

L'apparition de souches de *C. diphtheriae* non toxigènes en Angleterre et au Pays de Galles, a été associée à des cas répétés et parfois sévères de pharyngite (4). On a rapporté l'existence de cas sporadiques d'endocardite induits par une souche de *C. diphtheriae* non toxigène de biotype *gravis*, entre 1990 et 1991, en Nouvelle-Galles du Sud, ainsi qu'un nombre de cas plus réduit à Victoria en Australie (5, 6).

Un phénomène comparable d'émergence de souches de *C. diphtheriae* non toxigènes a également été observé dans la deuxième moitié des années 1990 en Biélorussie, en République de Géorgie, en Moldavie et à Saint-Petersbourg. Les recherches conduites à l'Institut Pasteur de Saint-Petersbourg ont révélé que ces souches étaient principalement de biotype *mitis* (62 %) et qu'elles étaient, d'après la méthode du ribotypage, différentes d'un point de vue génotypique. Au Royaume-Uni, il apparaît que le biotype *gravis* est le plus fréquent dans les cas d'orientation de malades vers des Services SDRU (*Streptococcus and Diphtheria Reference Unit*) du PHLS (7, 8).

La caractérisation phénotypique et génotypique de souches non toxigènes de *C. diphtheriae*, porteuses du gène *tox*, a été décrite pour la première fois par Groman *et coll.* en 1983 (9). Ces souches de *C. diphtheriae* non toxigènes mais porteuses du gène *tox* représentent actuellement 20 à 30 % des souches non toxigènes de *C. diphtheriae* de biotype *mitis* présentes dans la Fédération de Russie. Elles se caractérisent par un biotype et un ribotype indifférenciables, ainsi que par d'autres propriétés biologiques (10). Cinquante huit pour cent des souches biélorusses rencontrées en 1996-1997 étaient, d'un point de vue phénotypique, non toxigènes, bien que plus de la moitié de ces mêmes souches possèdent le gène de la toxine diphtérique. Vingt souches sur les 105 (19 %) ont été isolées de patients atteints de pharyngite, sept souches sur 76 ayant été isolées de contacts rapprochés (9,2 %).

L'émergence de ces souches non toxigènes et de souches non toxigènes porteuses du gène *tox*, soulève plusieurs questions : existe-t-il, comme l'ont supposé Clarridge *et coll.* (11) une pression de sélection à l'encontre des souches toxigènes de *C. diphtheriae*, quel est le pouvoir pathogène des souches de *C. diphtheriae* non toxigènes et des souches de *C. diphtheriae* non toxigènes porteuses du gène *tox*, et enfin quelle est l'incidence au niveau mondial des infections entraînées par ces organismes pathogènes ? ➤

non-vaccinés en Russie, whilst epidemiological data demonstrated that different immunised groups showed different severity levels of the disease; in particular, the adult population, the homeless, and the drug abusers.

The control of the diphtheria epidemic in most of the Baltic States and NIS countries is indicative of progress since the introduction of the improved public health strategy of prevention and control (2, 3). Diphtheria remains a major concern in Kyrgyzstan, Latvia, Tajikistan and Ukraine. Despite the improved situation observed in 1998 within Kyrgyzstan, Tajikistan and Ukraine, the diphtheria incidence rate is still higher than the WHO target for NIS countries, which is less than 1 case per 100 000 population (<http://cisid.who.dk/dip/DipRO2.asp>).

The situation is exasperated by incomplete microbiological surveillance of *C. diphtheriae* in some parts of the NIS. Funding provided by the United Nations Children's Fund (UNICEF), International Federation of Red Cross and Red Crescent Societies (IFRC), the WHO and other donors (1) for WHO/PHLS Diphtheria Laboratory Kits has ceased. This has resulted with some countries experiencing inadequate supplies of reagents for microbiological diagnosis, and forced to rely solely upon clinical diagnosis of diphtheria cases.

Emergence of non-toxicogenic *C. diphtheriae*

Non-toxicogenic *C. diphtheriae* in England and Wales has been emerging as a pathogen associated with recurrent and sometimes severe pharyngitis (4). Sporadic cases of endocarditis caused by non-toxicogenic *C. diphtheriae* biotype *gravis* have been reported between 1990-1991 in New South Wales and a smaller cluster in Victoria, Australia (5, 6).

In the latter half of the 1990s, a similar trend towards non-toxicogenic *C. diphtheriae* was also reported from Belarus, the Republic of Georgia, Moldova, and St. Petersburg. Studies at the St. Petersburg Pasteur Institute showed their strains to be predominantly biotype *mitis* (62%) and genotypically diverse on the basis of ribotyping. Meanwhile, among the UK referrals to the PHLS Streptococcus and Diphtheria Reference Unit (SDRU) the predominant biotype is *gravis* (7, 8).

The phenotypic and genotypic characterisation of non-toxicogenic strains of *C. diphtheriae* carrying the *tox*-gene was first described by Groman *et al.* in 1983 (9). These non-toxicogenic *tox*-bearing *C. diphtheriae* (NTTB) strains currently represent 20-30% of the non-toxicogenic *C. diphtheriae* biotype *mitis* from the Russian Federation showing an indistinguishable biotype, ribotype and other biological properties (10). Amongst the Belarusian strains circulating during 1996-1997, 58% were phenotypically non-toxicogenic, though more than half of these strains possessed the diphtheria toxin gene. Twenty of 105 (19.0%) strains were isolated from patients with pharyngitis and seven of 76 were isolated from close contacts (9.2%).

The emergence of non-toxicogenic and NTTB strains poses several questions; is there selection against toxicogenic strains of *C. diphtheriae* as postulated by Clarridge *et al.* (11), what is the pathogenicity of these non-toxicogenic *C. diphtheriae* and NTTB strains, and what is the incidence of infections caused by these organisms globally?

Clinical and public health impact of infections caused by *C. diphtheriae*

Diphtheria affects both children and adults, which can manifest in different degrees of severity, from asymptomatic carriers to more severe and complicated forms of the disease. This in turn is dependent upon two main factors, the characteristics of the bacterium and the immune status of the host. Unfortunately, there are still extensive groups of people at risk of infection through close contact and poor hygiene and living conditions, namely, people in lower socio-economic groups; the homeless and alcohol users. In addition, groups who are predisposed to infection are usually children with chronic respiratory diseases and non-vaccinated groups (mainly due to mistaken grounds for contraindications to immunisation).

Diphtheria cases and carriers in Diyarbakir in the Southeast region of Turkey revealed that despite expanded vaccine coverage to 81% in 1998 for the primary immunisation series in Turkey, the number of diphtheria cases is still high (12). This has been the result of a number of contributing factors associated with urbanisation, poor socio-economic condition and regions with low immunisation coverage. ➤

► Impact clinique et impact sur la santé publique des infections causées par *C. diphtheriae*

Les enfants comme les adultes sont touchés par la diphtérie, qui peut présenter des degrés de gravité variables : il existe ainsi des porteurs asymptomatiques comme des formes plus graves et plus compliquées de la maladie. La forme que va prendre cette affection va dépendre de deux facteurs principaux : les caractéristiques de la bactérie et le statut immunitaire de l'hôte. Malheureusement, un grand nombre de personnes sont exposées à cette infection, soit à cause de contacts directs avec des malades, soit en raison de mauvaises conditions d'hygiène ou de vie. C'est le cas notamment des personnes appartenant aux classes sociales les moins favorisées, des sans-abri et des alcooliques. Parmi les groupes à risque pour la diphtérie, on trouve également les enfants atteints de troubles respiratoires chroniques et les groupes de population non vaccinés (essentiellement à cause de « fausses contre-indications » de vaccination).

Au vu du nombre de patients atteints de diphtérie ou de porteurs asymptomatiques recensés à Diyarbakir, dans le sud-est de la Turquie, il apparaît que malgré une large couverture vaccinale de 81 %, obtenue en 1998 lors de la campagne de vaccination initiale en Turquie, le nombre de cas de diphtérie reste élevé (12). Ces résultats peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs associés entre autres à l'urbanisation et à l'existence de mauvaises conditions socio-économiques et de régions où la couverture vaccinale est restée faible.

Aspects microbiologiques des infections causées par d'autres corynebacteria

Infection causée par *C. ulcerans*

Au Royaume-Uni, la recherche de sujets contacts dans les cas d'infections causées par le bacille *C. ulcerans* n'était pas indiquée avant 1999, dans la mesure où aucun cas de transmission de personne à personne n'avait été signalé. Cependant, l'isolement de plus en plus fréquent du bacille toxigène *C. ulcerans*, la gravité de l'infection, et son pouvoir infectant élevé ont entraîné d'importantes modifications des directives sanitaires au Royaume-Uni, en faveur de la recherche des sujets infectés par des souches toxigènes de *C. ulcerans*. Ces mesures ont été prises en vue d'une meilleure surveillance de la diphtérie (7).

Infection associée à d'autres corynebacteria

Le *National Microbiology Laboratory of Health Canada* ou NMLHC (Laboratoire National de Microbiologie Sanitaire du Canada) de Winnipeg au Canada, mène actuellement des recherches polyphasiques poussées visant à l'identification des espèces de *Corynebacterium*. Les résultats des études conventionnelles de caractérisation biochimique, des études de composition des acides gras cellulaires, ainsi que l'analyse de la séquence des ARNr 16S ont démontré que les espèces de *Corynebacterium* nouvellement décrites : *Corynebacterium imitans* (13) et *C. durum* (14) qui avaient été isolées d'hémocultures, étaient associées à des symptômes semblables à ceux de la diphtérie, parmi des isolats de patients canadiens et internationaux. Il apparaît donc, au vu de ces données, que les microbiologistes doivent prendre conscience du potentiel d'autres espèces de *Corynebacterium* à déclencher des symptômes virulents.

Diagnostic biologique de la diphtérie

En matière de diagnostic différentiel de la diphtérie, les laboratoires, dont les ressources sont parfois limitées, s'appuient souvent sur un nombre limité de tests fondamentaux.

Une méthode de dépistage efficace a été mise au point au *Brazilian Public Health Laboratory* (Laboratoire de Santé Publique du Brésil). L'algorithme proposé pour le diagnostic biologique de *C. diphtheriae* s'appuie sur l'élimination des autres corynebacteria, en incorporant le test de production de la porphyrine à un milieu de King B et en utilisant le double test au sucrose/à l'uréase afin d'évaluer l'activité du glucose, du maltose et de l'uréase. Le protocole associe également un test de production de toxine au moyen d'une méthode d'immunodiffusion radiale (15).

Avancées dans le domaine de l'évaluation de la toxigénicité

Récemment, un nouveau test immunochromatographique rapide permettant la détection de la toxine diphtérique à partir de cultures bactériennes et de spécimens cliniques a été élaboré par le *Public Health Laboratory Service* (PHLS) au Royaume-Uni, en collaboration avec le Programme américain PATH (*Program for Appropriate Technology in Health*) (16). Les résultats des études de terrain, qui avaient utilisé des souches provenant du Royaume-Uni, d'Ukraine et de Lettonie, concordent parfaitement avec les résultats des tests d'Elek conventionnels ou modifiés. L'exceptionnelle sensibilité de ce test (0,5 ng/ml), l'obtention

► Microbiological aspects of infections caused by other corynebacteria

Infection caused by *C. ulcerans*

In the UK, contact tracing of infections caused by *C. ulcerans* was not recommended prior to 1999, as there were no reports of person-to-person transmission. However, the increasing frequency of isolation of toxigenic *C. ulcerans*, the severity of infection, and its infectivity has led to subsequent changes in the UK guidelines to recommend contact tracing of infections caused by toxigenic strains of *C. ulcerans* towards the control of diphtheria (7).

Infection associated with other corynebacteria

The National Microbiology Laboratory of Health Canada (NMLHC), Winnipeg, Canada undertakes detailed polyphasic studies for the identification of *Corynebacterium* species. Results from conventional biochemical characterisation, cellular fatty acid composition studies and 16S rRNA sequence analysis have revealed the association of the newly described *Corynebacterium* species; *Corynebacterium imitans* (13) and *C. durum* (14) isolated from blood culture with diphtheria-like symptoms among Canadian and international isolate referrals. Such findings suggest that microbiologists need to be aware of other *Corynebacterium* spp. that may induce virulent manifestations.

Laboratory diagnosis of diphtheria

A limited number of key tests for the differential diagnosis of diphtheria are often relied upon in laboratories, with limited resources.

At the Brazilian Public Health Laboratory, an efficient screening approach has been developed. The algorithm for the laboratory diagnosis of *C. diphtheriae* relies upon the elimination of other corynebacteria by incorporating the test for porphyrin production on King B Medium using the double sugar-urease test for glucose, maltose and urease activity in combination with a test for toxin production using a radial immunodiffusion method (15).

Developments in toxigenicity testing

Recently, a novel and rapid immunochromatographic strip (ICS) test for the detection of diphtheria toxin from bacterial cultures and clinical specimens was developed by the Public Health Laboratory Service (PHLS, UK) in collaboration with Program for Appropriate Technology in Health (PATH, USA) (16). Results from field studies using strains from the UK, Ukraine and Latvia showed complete congruence with conventional and modified Elek tests. The unparalleled sensitivity (0.5ng/ml) of the test, the availability of results within three hours (from the selection of colonies from the culture plate) and its correlation with other phenotypic tests emphasise the potential importance of the ICS test in the primary routine screening procedure for suspect colonies.

Advances in quantitative Polymerase Chain Reaction have led to the development of the TaqMan® PCR assay for rapid detection of diphtheria toxin. This assay was designed and evaluated by the Diphtheria Reference Laboratory at the Centres for Disease Control and Prevention, Atlanta and employs the direct sequence detection of the toxin gene in real-time quantitative PCR from clinical specimens (17). Preliminary investigations show benefits which include a sensitivity that is ten fold greater than the standard conventional PCR detection of the *tox* gene, obviates post-amplification handling, enables a high throughput (96 well plate format) and easy quantification of amplified products. Further evaluation will place the TaqMan® PCR format as an invaluable alternative tool to the standard PCR detection of the *tox* gene directly from clinical material. However, the initial capital cost will restrict its application to central reference laboratories.

Quality assessment of laboratory diagnosis of diphtheria

Annual distributions of the EQA schemes since 1996 have been instrumental towards maintaining awareness and laboratory capabilities within specialised areas of microbiology. The results have indicated the proficiency of laboratories in the diagnosis of diphtheria and toxigenicity testing (18). Moreover, it has highlighted the need for at least, yearly distributions of specimens for quality assurance within each laboratory.

des résultats en trois heures (sélection des colonies à partir de la mise en culture), ainsi que la concordance de ses résultats avec ceux d'autres tests phénotypiques, soulignent le remarquable potentiel de ce nouveau test immunochromatographique dans le cadre des procédures systématiques initiales de dépistage de colonies suspectes.

Les progrès réalisés dans le domaine de la technique de la PCR (amplification en chaîne par polymérase) quantitative ont conduit au développement du test de PCR TaqMan® qui permet une détection rapide de la toxine diphtérique. Ce test a été élaboré et évalué par le *Diphtheria Reference Laboratory* des *Centres for Disease Control and Prevention*, d'Atlanta aux États-Unis. Il consiste en une détection immédiate à partir de spécimens cliniques, de la séquence du gène de la toxine, au moyen de la technique de PCR quantitative en temps réel (17). Les études préliminaires semblent confirmer les avantages d'un tel test, avec notamment une sensibilité qui est dix fois supérieure à celle des techniques de PCR traditionnelles de détection du gène *tox*. Ce test rend de plus inutile toute manipulation post-amplification, permet un rendement élevé (plaque de 96 puits) ainsi qu'une quantification facile des produits amplifiés. Les évaluations menées ultérieurement confirmeront que le test PCR TaqMan® est la solution idéale de remplacement de la technique standard de détection PCR du gène *tox*, directement à partir de tissu clinique. Les investissements nécessaires à la mise au point de ce test risquent cependant de restreindre son utilisation aux laboratoires de référence de premier plan.

Évaluation de la qualité du diagnostic biologique de la diphtérie

L'application chaque année, depuis 1996, des programmes d'*External Quality Assessment* a contribué à ce que les laboratoires restent concentrés sur certains domaines spécialisés de la microbiologie et à ce qu'ils mobilisent leurs moyens vers cet objectif. Les résultats enregistrés ont démontré la compétence des laboratoires en matière de diagnostic de la diphtérie et d'évaluation de la toxicité (18). En outre, cette initiative a permis de mettre l'accent sur la nécessité de procéder, au moins une fois par an, à des distributions de spécimens dans chaque laboratoire à des fins d'assurance qualité.

Caractérisation moléculaire de la diphtérie

Il reste encore beaucoup de choses à apprendre sur l'épidémiologie moléculaire changeante de cette maladie qui connaît un nouvel essor. La méthode du ribotypage a été utilisée avec succès pour la caractérisation en sous-types moléculaires, afin de permettre l'identification et la surveillance de l'évolution d'un groupe clonal.

Dans le cadre du ELWGD, le ribotypage, qui a été adopté comme technique de référence, va servir à constituer une base de données de génotype de *C. diphtheriae* (19). La classification des ribotypes de *C. diphtheriae* est en cours d'élaboration ; elle se fera en fonction de leur localisation géographique.

Aspects sérologiques de l'immunité contre la diphtérie

La persistance des épidémies dans les états baltes a été associée à de faibles taux de couverture vaccinale dans certaines régions, à l'absence d'immunité chez les adultes et à des productions d'anticorps variables lors de l'administration de doses différentes de vaccins. En Italie, une étude d'immunité de la population contre la diphtérie, a conclu que le taux de prévalence des femmes âgées de 45 à 49 ans (1086) et des hommes âgés de 50 à 54 ans (974) d'une population susceptible d'être infectée, se retrouvait dans l'écart existant entre la prévalence observée au sein d'une population non protégée et la prévalence observée au sein d'un groupe de population vieillissante. (20). Une tendance similaire a été observée auprès de la population adulte de plus de 50 ans en Grèce et en Israël. Bien qu'une généralisation de ce modèle à chaque pays ne soit pas possible, il apparaît que la large couverture vaccinale initiale obtenue en Israël, en Italie, en Finlande, en France, aux Pays-Bas, au Royaume-Uni et en Suède, ait offert aux enfants et aux jeunes adultes (approx. ≤ 21 ans) une protection satisfaisante contre la diphtérie (niveau d'antitoxine $\geq 0,1$ IU/ml) (21). Ainsi, la diminution notable des taux d'anticorps parmi les populations de plus de 21 ans dans ces pays va dans le sens de la recommandation de l'utilisation systématique, une fois tous les dix ans, d'une injection de rappel de vaccin antidiphtérique et antitétanique (Td). Cette position a encore été confortée par l'étude réalisée sous l'égide du programme de la DGXII *Réseau Européen Séro-Epidémiologique* (ESEN), financé par la Commission européenne (22, 23). La réponse immunitaire qui avait été observée chez un groupe d'adultes vaccinés avec une injection de rappel de vaccin Td révélait une augmentation significative (14 fois) des taux antitoxiniques, démontrant ainsi le bénéfice de ce schéma de vaccination (24). ►

Molecular characterisation of diphtheria

Much remains to be learned about the changing molecular epidemiology of this resurgent disease. Ribotyping has been successfully used for molecular subtyping in identification and monitoring of the evolution of a clonal group.

Within the remit of the the ELWGD, ribotyping has been adopted as the gold standard and forms the basis of a genotype database for *C. diphtheriae* (19). The nomenclature for *C. diphtheriae* ribotypes is currently being established, based on geographic location.

Serological aspects of diphtheria immunity

The continuing epidemics in the Baltic States were associated with low immunisation coverage rates in some areas, the lack of immunity among adults and variable antibody responses upon administering different doses of vaccine. In Italy, a population immunity study against diphtheria, concluded that the prevalence of 45-49 years female (1086) and 50-54 years males (974) among the susceptible population was indicative of the proportionate correlation between a non-protected population and increasing age group (20). A similar trend was identified among the adult population (>50 years) in Greece and Israel. Although it was not possible to generalise the situation in every country, the high primary vaccine coverage in Israel, Italy, Finland, France, Netherlands, UK and Sweden provided satisfactory protection (antitoxin level ≥ 0.1 IU/ml) among children and young adults (approx. 21 years) (21). Thus, the noticeable decreasing antibody levels among populations over the age of 21 years in these countries supports the recommendation of implementing a routine booster dose of diphtheria-tetanus (Td) vaccine every ten years. This was reinforced by the study undertaken within the remit of the DGXII European Commission funded programme, European Sero-Epidemiological Network (ESEN) (22, 23). Furthermore, the benefit of such a regime was evident when antibody responses among a group of adults immunised with a booster dose of Td vaccine showed a significant (14 fold) increase in antitoxin levels (24).

Developments and the future of diphtheria

Finally, the completion of the genome sequence of *C. diphtheriae* offers new strategies for studying the unique host-pathogen interactions, thus providing a novel tool for diagnosis of infection and intervention (25).

So far, the collaborative *C. diphtheriae* sequencing project between the Sanger Centre (<http://www.sanger.ac.uk>) with the PHLS Respiratory and Systemic Infection Laboratory (RSIL) as a leading collaborator is near completion. Preliminary in silico analysis of the genome has indicated an apparent capability for the production of fimbriae through the discovery of sortase-like proteins; representing important host attachment factors involved in diphtheria pathogenicity (26). ■

Partenaires de la DGRDT de la Commission européenne / European Commission DGRDT Partners

Arménie / *Armenia*: Silva Gabrielian
Biélorussie / *Belarus*: Leonid Titov
Finlande / *Finland*: Jaana Vuopio-Varkila
France: Patrick Grimont, Philippe Riegel
Grèce / *Greece*: John Douboyas
Italie / *Italy*: Christina von Hunolstein
Kazakhstan: Vasily Kim
Lettonie / *Latvia*: Ivonna Selga
Roumanie / *Romania*: Constantin Andronescu
Russie / *Russia*: Roman Kozlov, Izabella Mazurova;
Galina Tseneva
Ukraine: Tatiana Glushkevich

► Développements et avenir de la diphtérie.

Enfin, l'achèvement du séquençage du génome de la *C. diphtheriae* va ouvrir de nouvelles perspectives d'études des interactions particulières entre l'hôte et l'agent pathogène, offrant du même coup un nouvel outil de diagnostic et d'intervention pour lutter contre cette infection (25).

Ainsi, le projet de collaboration pour le séquençage du gène de *C. diphtheriae* qui associait le *Sanger Centre* (<http://www.sanger.ac.uk>) à son principal partenaire, le *Respiratory and Systemic Infection Laboratory* (RSIL) du PHLS, touche à sa fin. L'analyse préliminaire in silico du génome a indiqué, via la découverte de protéines semblables à la sortase, la capacité apparente à produire des fimbriae qui jouent un rôle important en permettant l'attachement du germe à l'hôte, un mécanisme impliqué dans la pathogénicité de la diphtérie (26). ■

Remerciements/ Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the contribution of all participants of the Sixth International ELWGD; the European Commission DGRTD, Dr Ludovica Serafini; Dr Colette Roue and the WHO Regional Office for Europe; by no means least, the partners from the two EC-funded diphtheria programmes, BioMed 2 BMH4.CT98. 3793 and INCO-Copernicus IC15.CT98.0302 as listed:

Les auteurs tiennent à remercier chaleureusement tous les participants au sixième Congrès international du Groupe de Travail Européen sur la Diphtérie, la Direction Générale de Recherche et Développement Technique de la Commission européenne, le Dr. Ludovica Serafini ; le Dr. Colette Roue et le Bureau Régional de l'OMS pour l'Europe ; ainsi bien entendu que les partenaires des deux programmes BioMed 2 BMH4.CT98. 3793 et INCO-Copernicus IC15.CT98.0302 sur la diphtérie financés par la Commission européenne, notamment :

Coordinateur du projet de la CE / EC Project Coordinator: Androulla Efstratiou,
Responsable scientifique du projet de la CE /
EC Project Scientist: Sandra Lai
Secrétaire du projet de la CE / EC Project Secretary:
Jocelyne Seyve

References

1. Efstratiou A, Roue C and Members of the European Laboratory Working Group on Diphtheria. The European Laboratory Working Group on Diphtheria: a global microbiologic network. *Journal of Infectious Diseases* 2000; **181**: Suppl. 1, S146-151.
2. Dittmann S, Wharton M, Vitek C, Ciotti M, Galazka A, Guichard S et al. Successful control of epidemic diphtheria in the states of the former Union of Soviet Socialist Republics: lessons learned. *Journal of Infectious Diseases* 2000; **181**: Suppl. 1, S10-22.
3. Kembabanga G, Askarova J, Ivanova R, Deshevoi S, Vitek C, McNabb SJN. Epidemic investigation of diphtheria, Republic of Kazakhstan, 1990-1996. *Journal of Infectious Diseases* 2000; **181**: Suppl. 1, S94-97.
4. Reacher M, Ramsay M, White J, De Zoysa A, Efstratiou A, Mann G et al. Nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*: an emerging pathogen in England and Wales? *Emerging Infectious Diseases* 2000; **6**: 1-6.
5. Wilson APR. The return of *Corynebacterium diphtheriae*: the rise of non-toxicogenic strains. *Journal of Hospital Infection* 1995; **30**: 306-312.
6. Tiley SM, Kociuba KR, Heron LG, Munro R. Infective endocarditis due to nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*: report of seven cases and review. *Clinical Infectious Diseases* 1993; **16**: 271-275.
7. Bonnet JM, Begg NT. Control of diphtheria: guidance for consultants in communicable disease control. *Communicable Disease and Public Health* 1999; **2**: 242-249.
8. Efstratiou A, George RC. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. *Communicable Disease and Public Health* 1999; **2**: 250-257.
9. Groman N, Cianciotto N, Bjorn M, Rabin M. Detection and expression of DNA homologous to the tox gene in nontoxicogenic isolates of *Corynebacterium diphtheriae*. *Infection and Immunity* 1983; **42**: 48-56.
10. Melnikov V, DeZoysa A, Mazurova I, Kombarova S, Borisova O, Engler KH et al. Molecular screening for the "identification" of non-toxicogenic tox bearing strains of *Corynebacterium diphtheriae* from the Russian Federation. Proceedings of the Sixth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Brussels, Belgium, June 2000, p60.
11. Clarridge JE, Popovic T, Inzana TJ. Diphtheria and other corynebacteria and coryneform infections. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Vol. 3. (Ed.) Hausler WJ, Sussman M, New York: Oxford University Press; 1998.
12. Levent B, Coplu N, Soy AT, Nar S, Esen B. Investigation of diphtheria case and carriers in the South-East region of Turkey. Proceedings of the Sixth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Brussels, Belgium, June 2000, p44.
13. Funke G, Efstratiou A, Kuklinska D, Hutson RA, De Zoysa A, Engler KH et al. *Corynebacterium imitans* sp. nov. isolated from patients with suspect diphtheria. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; **35**: 1978-1983.
14. Riegel P, Heller R, Prevost G, Jehl F, Monteil H. *Corynebacterium durum* sp. nov., from human clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1997; **47**: 1107-1111.
15. De Mattos Guaraldi AL, Duarte Formiga LC. Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. *Current Microbiology* 1998; **37**: 156-158.
16. Engler KH, Efstratiou A, Norn D, Kozlov RS, Selga I, Glushkevich TG, Tam M, Melnikov VG, Mazurova, IK, Kim VE, Tseneva GY, Titov LP and George RC. Immunochromatographic strip test for rapid detection of diphtheria toxin: description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of diphtheria. *Journal of Clinical Microbiology* (in press).
17. Mothershed E and Popovic T. Development of a TaqMan® PCR assay for rapid detection of diphtheria toxin gene. Proceedings of the Sixth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Brussels, Belgium, June 2000, p50.
18. Engler KH, Kozlov RS, Copping SJ. European Laboratory Working Group on Diphtheria and A. Efstratiou. International external quality assessment scheme for the laboratory diagnosis of diphtheria. *Journal of Medical Microbiology* 2001; **50**: 1006-1012.
19. De Zoysa A, Efstratiou A, George RC, Jahkola M, Vuopio-Varkila J, Deshevoi S et al. Molecular epidemiology of *Corynebacterium diphtheriae* from North-western Russia and surrounding countries studied by using ribotyping and pulse-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; **33**: 1080-1083.
20. Von Hunolstein C, Rota MC, Alfaroni G, Ricci ML, Salmasso S, and the Italian Serology Working Group. Diphtheria Antibody levels in the Italian Population. Proceedings of the Sixth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, Brussels, Belgium, June 2000, p. 66.
21. Skogen V, Jenum PA, Danilov E, Korolev VN, Halvorsen DS, Sjursen H. Immunity to diphtheria among children in Northern Norway and North-western Russia. *Vaccine* 2000; **19**: 197-203.
22. Andrews N, Pebody RG, Berbers G, Blondeau C, Crovari P, Davidkin I et al. The European Sero-Epidemiology Network: standardizing the enzyme immunoassay results for measles, mumps and rubella. *Epidemiology and Infection* 2000; **125**: 127-141.
23. Edmunds WJ, Pebody RG, Aggerback H, Baron S, Berbers G, Conyn-van Spaendonck MA et al. The sero-epidemiology of diphtheria in Western Europe. ESEN Project. European Sero-Epidemiology Network. *Epidemiology and Infection* 2000; **125**: 113-125.
24. Marlovits S, Stocker R, Efstratiou A, Broughton K, Kaider A, Vecsei V et al. Effect on diphtheria immunity of combined tetanus and diphtheria booster vaccination in adults. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2000; **19**: 506-513.
25. Cummings CA and Reiman, DA. Using DNA microarrays to study host-microbe interactions. *Emerging Infectious Diseases* 2000; **6**: 513-525.
26. Pallen MJ, Lam AC, Antonio M, Dunbar K. An embarrassment of sortases - a richness of substrates? *Trends in Microbiol* 2001; **9**: 97-101.

Erratum

Eurosurveillance 2001; 6(11/12)

Page 160, tableau 1, dernière colonne "Suivi par institut national", ligne "France", il fallait lire «Sans objet !» et note de bas de tableau, ligne 1 «[†] Suivi réalisé principalement par les départements de santé locaux».

Page 160, table 1, last column "Follow-up by national institute", line "France", should have read «Not applicable !» and table note, line 1 «[†] Follow-up primarily done by local health departments »

EUROSURVEILLANCE

Institut de Veille Sanitaire (InVS)
12, rue du Val d'Osne
94415 Saint-Maurice cedex France
Tel. 33 (0) 1 41 79 68 00
Fax. 33 (0) 1 55 12 53 35
ISSN: 1025 - 496X
eurosurveillance@invs.sante.fr

MANAGING EDITOR

• J. Drucker (InVS)

PROJECT LEADER

• A. Moren (InVS)

COORDINATORS/EDITORS

Eurosurveillance

• M. Vilayleck
InVS France
m.vilayleck@invs.sante.fr

Eurosurveillance Weekly

• E. Hoile
P.H.L.S - CDSC - U.K.
ehoile@phls.nhs.uk

ASSISTANT EDITORS

• A. Goldschmidt (InVS)

• F. Mihoub (InVS)

• F. Reid (PHLS - CDSC)

SCIENTIFIC EDITORS

• J.C. Desenclos

Institut de Veille Sanitaire - France

• N. Gill

P.H.L.S - Communicable Disease
Surveillance Centre - United Kingdom

• S. Salmasso

Istituto Superiore di Sanità - Italy

EDITORIAL BOARD

• P. Aavitsland

MSIS-rapport - Norway

• J. Catarino

Saúde em Números - Portugal

• K. Ekdahl

Smittskydd - Sweden

• H. Heine

PHLS - CDSC
England and Wales

• R. Hemmer

National Service of Infectious
Diseases, Centre Hospitalier
de Luxembourg - Luxembourg

• A. Karaitianou-Velonaki

Ministry of Health and Welfare - Greece

• W. Kiehle

Epidemiologisches Bulletin -
Germany

• K. Kutsar

Health Inspection Inspectorate -
Estonia

• N. Mac Donald

SCIEH Weekly Report - Scotland

• J. F. Martinez Navarro

Boletín Epidemiológico Semanal -
Spain

• P. Nuorti

Kansanterveys - Finland

• F. Rossillon

Bulletin Epidémiologique
Hebdomadaire - France

• S. Samuelsson

EPHNEWS - Denmark

• R. Strauss

Bundesministerium für Soziale
Sicherheit und Generationen - Austria

• L. Thornton

EPHnsight - Ireland

• F. Van Loock

Institut Scientifique de la Santé
Publique Louis Pasteur - Belgium

• H. van Vliet

Infectieziekten Bulletin - Netherlands