

Agata Stepuch

REIDENTIFICATION AND DETERMINATION OF DRUG SUSCEPTIBILITY OF *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* AND *CORYNEBACTERIUM ULCERANS* STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES IN 2023 IN POLAND

REIDENTYFIKACJA ORAZ OKREŚLENIE LEKOWRAŻLIWOŚCI SZCZEPÓW *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* I *CORYNEBACTERIUM ULCERANS* WYIZOLOWANYCH Z PRÓBEK MATERIAŁU KLINICZNEGO W 2023 ROKU W POLSCE

National Institute of Public Health NIH – National Research Institute
Department of Bacteriology and Biocontamination Control
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych

ABSTRACT

BACKGROUND. Despite the fact that the last cases of fully-symptomatic diphtheria were recorded in Poland in 1996 and 2000, infections caused by non-toxin-producing strains of *Corynebacterium* still occur. According to the epidemiological reports from ECDC in the second half of 2022, there was an increase in the number of diphtheria cases in European Union countries. As a result, the current issue becomes the appropriate preparation of microbiological laboratories for the diagnosis of *Corynebacterium* microorganisms.

OBJECTIVE. Reidentification of diphtheria bacilli isolated from clinical samples and to assess the drug susceptibility of *C. diphtheriae* strains isolated in Poland.

MATERIAL AND METHODS. The subject of the research were 18 strains isolated from clinical samples in Poland in 2023. Microbiological and genetic methods were used for the reidentification of the strains. Drug susceptibility was assessed using the disk diffusion method, following the new EUCAST recommendations effective from 2023.

RESULTS. It was confirmed that all examined strains belonged to the genus *Corynebacterium*. It was demonstrated that *C. diphtheriae* strains proved to be susceptible to increased exposure to benzylpenicillin and cefotaxime. Results obtained using ciprofloxacin allowed categorizing the strains into the intermediate susceptibility category WZE, except for one strain which was resistant to this antibiotic. All tested bacterial strains were susceptible to erythromycin. The *C. ulcerans* strain exhibited a similar antibiotic resistance profile to penicillin, cefotaxime, and ciprofloxacin, with additional detection of resistance to clindamycin. The toxigenicity of the tested strains was excluded.

CONCLUSIONS. Based on epidemiological data regarding the emergence of new cases of infections caused by *Corynebacterium* strains, it is advisable to prepare theoretically and practically laboratories for diagnostics to detect potentially toxigenic diphtheria bacilli. Effective methods for the microbiological diagnosis of diphtheria bacilli are available. It is recommended to monitor the susceptibility to antimicrobial agents in all *C. diphtheriae* isolates

Keywords: antibiotic susceptibility, microbiological diagnostic, diphtheria, *Corynebacterium diphtheriae*

STRESZCZENIE

WPROWADZENIE. Pomimo faktu, że ostatnie przypadki pełnoobjawowej błonicy zanotowano w Polsce w 1996 oraz w 2000 roku, zdarzają się jednak nadal zakażenia wywołane przez szczepy *Corynebacterium* niewytwarzające toksyny błonicy. Jak wynika z raportów epidemiologicznych ECDC w drugiej połowie

2022 roku obserwowany był wzrost liczby przypadków błonicy w krajach Unii Europejskiej. Z tego powodu, aktualnym problemem staje się odpowiednie przygotowanie laboratoriów mikrobiologicznych do diagnostyki drobnoustrojów z rodzaju *Corynebacterium*.

CEL. Reidentyfikacja maczugowców błonicy izolowanych z próbek materiału klinicznego oraz ocena lekowrażliwości szczepów *C. diphtheriae* izolowanych w Polsce w 2023 roku.

MATERIAŁ I METODY. Przedmiotem badań było 18 szczepów wyizolowanych z próbek materiału klinicznego w 2023 roku w Polsce. Do reidentyfikacji szczepów wykorzystano metody mikrobiologiczne i genetyczne. Dokonano oceny lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krażkową, zgodnie z nowymi zaleceniami EUCAST obowiązującymi od 2023 roku.

WYNIKI. Potwierdzono przynależność wszystkich badanych szczepów do rodzaju *Corynebacterium*. Wykazano, że szczepy *C. diphtheriae* okazały się wrażliwe przy zwiększonej ekspozycji na benzylopenicylinę i cefotaksym. Wyniki uzyskane przy użyciu ciprofloksacyny pozwoliły zakwalifikować szczepy do kategorii wrażliwości WZE, poza jednym szczepem, który był oporny na ten antybiotyk. Wszystkie badane szczepy bakteryjne były wrażliwe na erytromycynę. Szczep *C. ulcerans* charakteryzował się podobnym profilem antybiotykkooporności w stosunku do penicyliny, cefotaksymu oraz ciprofloksacyny, dodatkowo wykryto jego oporność na klindamycynę. Wykonany test PCR w kierunku detekcji genu toksyny błonicy oraz test fenotypowy Eleka pozwoliły wykluczyć toksynotwórczość badanych szczepów.

WNIOSKI. Na podstawie danych epidemiologicznych o pojawianiu się nowych przypadków zakażeń szczepami z rodzaju *Corynebacterium*, zasadne jest przygotowanie teoretyczne i praktyczne laboratoriów do podjęcia diagnostyki w celu wykrycia potencjalnie toksynotwórczych maczugowców błonicy. Dostępne są skuteczne metody diagnostyki mikrobiologicznej maczugowców błonicy. Wskazane jest monitorowanie wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe na wszystkich izolatach *C. diphtheriae*.

Słowa kluczowe: wrażliwość na antybiotyki, diagnostyka mikrobiologiczna, błonica, *Corynebacterium diphtheriae*

INTRODUCTION

Diphtheria is an infectious disease caused by toxin-producing strains of *Corynebacterium diphtheriae* bacteria, and less commonly by other closely related species such as *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*, which can also produce diphtheria toxin. Production of the protein exotoxin is dependent on bacterial infection by the β bacteriophage, as only lysogenic strains are capable of toxin production (1,2).

The disease was already described in the 5th century BC by Hippocrates, and its name is owed to the French physician Pierre Bretonneau, who in 1826 named the disease *diphthérite* from the Greek word *diphthera* ("skin") due to the occurrence of false membranes in the throats of infected individuals (3). The reservoir of *C. diphtheriae* is humans, and transmission occurs through droplets or direct contact with skin lesions and objects used by the infected patient (4,5). *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis* are transmitted to humans through contact with infected animals or consumption of unpasteurized milk of dairy products (2). Symptoms most commonly affect the respiratory system or skin, less frequently the ear, conjunctiva, vulva, and vagina. In the classic form of respiratory diphtheria, false membranes form in the throat and/or on the tonsils, neck lymph nodes are enlarged, and damage

WSTĘP

Błonica (diphtheria) jest chorobą zakaźną, wywoływaną przez toksynotwórcze szczepy maczugowca błonicy *Corynebacterium diphtheriae* oraz rzadziej przez inne, blisko spokrewnione gatunki *Corynebacterium ulcerans* i *Corynebacterium pseudotuberculosis*, które również mogą wytwarzać toksynę błoniczą. Produkcja białkowej egzotoksyny uzależniona jest od zakażenia bakterii bakteriofagiem β , gdyż tylko lizogemizowane szczepy są zdolne do wytwarzania toksyny (1,2).

Choroba była opisywana już w V w p.n.e. przez Hipokratesa, a jej nazwę zawdzięczamy francuskiemu lekarzowi Pierre Bretonneau, który w 1826 roku nazwał chorobę *diphthérite* od greckiego słowa *diphthera* („skóra”) ze względu na występowanie w gardłach zakażonych osób błony rzekomej (3). Rezerwuarem *C. diphtheriae* jest człowiek, a do transmisji dochodzi na drodze kropelkowej lub przez bezpośredni kontakt ze zmianami skórnymi i przedmiotami używanymi przez chorego (4,5). Do zakażenia *C. ulcerans* oraz *C. pseudotuberculosis* dochodzi przez kontakt z zakażonymi zwierzętami lub spożycie niepasteryzowanego mleka lub produktów mlecznych (2). Objawy chorobowe najczęściej dotyczą układu oddechowego lub skóry, rzadziej ucha, spojówek, sromu i pochwy. W klasycznej postaci błonicy oddechowej w gardle i/lub na

to the heart muscle and peripheral nerves occurs. The most common cause of death is airway obstruction, myocarditis, and neurological complications (4,6). In the cutaneous form of diphtheria, lesions may resemble lichen, eczema, or ulcers covered with gray exudate. Skin changes usually occur on exposed limbs, especially the legs. The cutaneous form is rarely the cause of toxic complications but plays an important epidemiological role as a reservoir of bacteria and a source of infection (2,6). Non-toxigenic strains of *C. diphtheriae* can cause mild throat inflammation, but also invasive disease in the form of bacteremia, endocarditis, and myocarditis (1).

Analysis of clinical, laboratory, and epidemiological criteria allows for the classification of diphtheria cases for the purposes of epidemiological surveillance. Every person meeting the clinical criteria for respiratory diphtheria meets the criteria for a possible case. As a probable case, each person meeting the clinical and epidemiological criteria is defined. A confirmed case is considered to be any person meeting the clinical and laboratory criteria (7). Laboratory diagnosis of diphtheria involves isolating *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, or *C. pseudotuberculosis* from clinical material and determining the toxigenicity of the bacterial strain. The toxigenicity of the strain must be confirmed phenotypically by the Elek test (4,5). According to the regulation of the Minister of Health dated June 24, 2020, regarding the reporting of test results for biological agents pathogenic to humans, the prerequisite for reporting the test result to the State Sanitary Inspection is the isolation of diphtheria toxin-producing corynebacteria from clinical material.

The aim of the study was to re-identify diphtheria corynebacteria isolated from clinical material samples and retrospectively assess the drug susceptibility of *C. diphtheriae* strains isolated in Poland in 2023.

MATERIAL AND METHODS

Samples for analysis: The subject of the study were 18 strains isolated from clinical material samples in Poland in 2023, sent for re-identification as *C. diphtheriae* – 17 strains, and *C. ulcerans* – 1 strain. The bacterial strains of *C. diphtheriae* sent to the National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene were isolated from blood, wound swabs, and skin.

Reidentification of the strains under investigation: The reidentification of strains was carried out using microbiological and genetic methods, in accordance with the recommendations of the WHO and ECDC. Bacterial strains were identified using Gram staining, assessment of colony morphology on Columbia agar with 5% sheep blood, Tinsdale agar,

migdałkach tworzą się błony rzekome, węzły chłonne szyi są powiększone oraz dochodzi do uszkodzenia mięśnia sercowego i nerwów obwodowych. Najczęstszą przyczyną śmierci jest niedrożność dróg oddechowych, zapalenie mięśnia sercowego i powikłania neurologiczne (4,6). W postaci skórnej błonicy zmiany mogą mieć charakter podobny do liszajca, wyprysku lub owrzodzenia pokrytego szarym nalotem. Zmiany skórne zwykle występują na odsłoniętych kończynach, zwłaszcza nogach. Postać skórna jest rzadko przyczyną powikłań toksycznych, jednak odgrywa ważną rolę epidemiologiczną jako rezerwuuar bakterii oraz źródło zakażenia (2,6). Nietoksynotwórcze szczepy *C. diphtheriae* mogą być przyczyną łagodnego zapalenia gardła, ale również choroby inwazyjnej pod postacią bakteriemii, zapalenia wsierdzia i zapalenia mięśnia sercowego (1).

Analiza kryteriów klinicznych, laboratoryjnych oraz epidemiologicznych pozwala na klasyfikację przypadku błonicy na potrzeby nadzoru epidemiologicznego. Każda osoba spełniająca kryteria kliniczne błonicy dróg oddechowych spełnia kryteria przypadku możliwego. Jako przypadek prawdopodobny, przyjmuje się każdą osobę spełniającą kryteria kliniczne i epidemiologiczne. Za przypadek potwierdzony uznaje się każdą osobę spełniającą kryteria kliniczne i laboratoryjne (7). Laboratoryjne rozpoznanie błonicy polega na wyizolowaniu z materiału klinicznego *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* lub *C. pseudotuberculosis* i oznaczenie toksynotwórczości szczepu bakteryjnego. Toksynotwórczość szczepu musi być potwierdzona fenotypowo testem Eleka (4,5). Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 24 czerwca 2020 r. w sprawie zgłaszania wyników badań w kierunku biologicznych czynników chorobotwórczych u ludzi, przesłanką do zgłoszenia wyniku badania do inspekcji sanitarnej jest izolacja z materiału klinicznego maczugowców wytwarzających toksynę błoniczą.

Celem pracy była reidentyfikacja maczugowców błonicy izolowanych z próbek materiału klinicznego oraz retrospektywna ocena lekowrażliwości szczepów *C. diphtheriae* izolowanych w Polsce w 2023 roku.

MATERIAŁY I METODY

Próbki do badań. Przedmiotem badań było 18 szczepów wyizolowanych z próbek materiału klinicznego pobranych w 2023 roku w Polsce, przysłanych do reidentyfikacji jako *C. diphtheriae* – 17 szczepów oraz *C. ulcerans* – 1 szczep. Szczepy bakteryjne *C. diphtheriae* przysłane do NIZP PZH – PIB w celu reidentyfikacji izolowane były z krwi, z wymazów z rany oraz ze skóry.

Reidentyfikacja szczepów badanych. Do reidentyfikacji szczepów wykorzystano, zgodnie z zalece-

and biochemical identification using Api Coryne tests (bioMérieux). Bacterial DNA was isolated using a column-based method (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche). PCR was performed using two primer pairs: DT1-DT2 and WHO1-WHO2. The toxigenicity of the strains was assessed by performing the Elek test.

Antibiogram of the tested strains: The susceptibility of the 18 strains was assessed using the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar supplemented with 5% defibrinated horse blood and 20 mg/L β -NAD (MH-F agar). Cultures were incubated in the presence of 5% CO₂ at 35°C for 18±2 hours. A quality control strain, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, from the ATCC collection was used for validation. According to EUCAST recommendations and the National Reference Center for Antimicrobial Susceptibility (KORLD), the sizes of growth inhibition zones around antibiotic disks were measured for the tested strains: benzylpenicillin (P – 1 unit), amoxicillin (AML – 10 mcg), cefotaxime (CTX – 5 mcg), meropenem (MEM – 10 mcg), ciprofloxacin (CIP – 5 mcg), erythromycin (E – 15 mcg), clindamycin (DA – 2 mcg), tetracycline (T – 30 mcg), linezolid (LZD – 10 mcg), rifampicin (RD – 5 mcg), and trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT – 25 mcg).

RESULTS

As a result of the conducted reidentification, the affiliation of all tested strains to the genus *Corynebacterium* was confirmed.

Characteristics of the tested strains are presented in Table I, which includes data regarding the biotype of the strains, gender and age of patients, and the clinical material from which the microorganism was isolated. The majority of patients were male (67%) in the age range of 30-40 years (28%). The dominant biotype of *C. diphtheriae* was *gravis* (65%). Clinical materials from which corynebacteria were most frequently isolated were blood (44%) and skin swabs (ulcers, wounds 44%).

The molecular tests performed (PCR reaction) aimed at detecting the diphtheria toxin gene and the Elek phenotypic test allowed for the exclusion of toxigenicity in all tested strains. In the case of the *C. ulcerans* strain, a positive PCR reaction was obtained for the entire tox gene (a product of the reaction with a size of 909 bp), which allows classifying this strain as non-toxigenic toxin-gene bearing (NTTB) strains. Figure 1 shows the electrophoregram of PCR amplicons for the *C. ulcerans* strain.

All tested strains were susceptible with increased exposure (I) to benzylpenicillin, cefotaxime, and ciprofloxacin. Membership in the (I) sensitivity

niami WHO oraz ECDC, metody mikrobiologiczne oraz genetyczne. Szczepy bakteryjne identyfikowano za pomocą barwienia metodą Grama, oceny morfologii kolonii na podłożu Columbia agar z 5% krwią baranią, podłożu Tinsdale'a oraz oznaczenia biochemicznego z wykorzystaniem testów Api Coryne (bioMérieux). Do izolacji bakteryjnego DNA użyto metody kolumnowej (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche). Reakcję PCR wykonano z zastosowaniem dwóch par starterów: DT1-DT2 oraz WHO1-WHO2. Toksynotwórczość szczepów badanych oceniono wykonując test Eleka.

Antybiogram szczepów badanych. Ocenę lekowrażliwości 18 szczepów badanych przeprowadzono metodą dyfuzyjno-krążkową, na podłożu Mueller-Hinton agar z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi końskiej i 20 mg/L β -NAD (podłoże MH-F). Hodowlę prowadzono w obecności 5% CO₂ w temperaturze 35°C przez 18±2 godz. Do kontroli jakości oznaczenia stosowano szczep wzorcowy z kolekcji ATCC – *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Zgodnie z zaleceniami EUCAST oraz Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) zmierzono wielkości stref zahamowania wzrostu szczepów badanych wobec krążków z antybiotykami: benzylpenicylina (P – 1 jednostka), amoksycylina (AML – 10 mcg), cefotaksym (CTX – 5 mcg), meropenem (MEM – 10 mcg), ciprofloksacyna (CIP – 5 mcg), erytromycyna (E – 15 mcg), klindamycyna (DA – 2 mcg), tetracyklina (T – 30 mcg), linezolid (LZD – 10 mcg), rifampicyna (RD – 5 mcg), trimetoprim-sulfametoksazol (SXT – 25 mcg).

WYNIKI

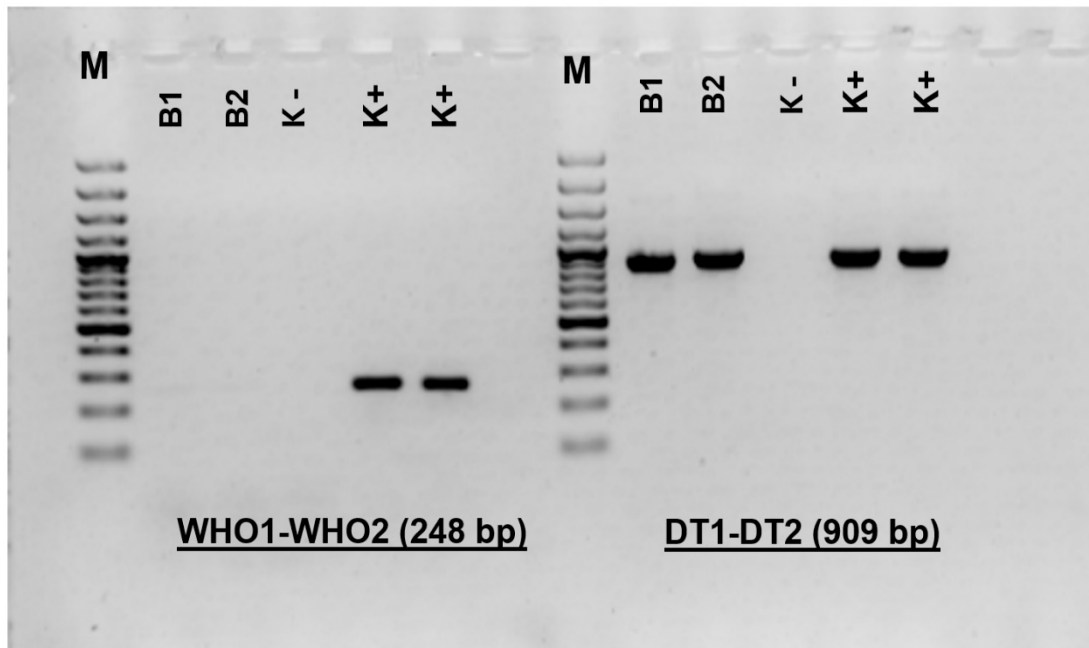
W wyniku przeprowadzonej reidentyfikacji potwierdzono przynależność wszystkich badanych szczepów do rodzaju *Corynebacterium*.

Charakterystykę badanych szczepów przedstawia Tabela I, w której zamieszczono dane dotyczące biotypu szczepów, płci i wieku pacjentów oraz materiału klinicznego, z którego wyizolowano drobnoustroj. Większość pacjentów stanowili mężczyźni (67%) w wieku 30-40 lat (28%). Dominującym biotypem *C. diphtheriae* był *gravis* (65%). Materiały kliniczne, z których najczęściej izolowano maczugowce to krew (44%) oraz wymazy ze skóry (owrzodzenia, rany 44%).

Wykonane badania molekularne (reakcja PCR) w kierunku detekcji genu toksyny błoniczej oraz test fenotypowy Eleka pozwoliły wykluczyć toksynotwórczość wszystkich badanych szczepów. W przypadku badania szczepu *C. ulcerans* uzyskano dodatnią reakcję PCR dla całego genu tox (obecny produkt reakcji o wielkości 909 pz), co pozwala zakwalifikować

Tabela I. Podstawowe dane dotyczące analizowanych szczepów
Table I. Basic data relating to the analyzed strains

Strain ID	Biotype	Patient's Age	Source	Sex
1_23_2201041920	<i>gravis</i>	55	skin – ulceratio	Male
2_23_2201045250	<i>gravis</i>	20	blood	Male
3_23_2301000710	<i>gravis</i>	33	blood	Male
4_23_2301002820	<i>gravis</i>	21	blood	Female
5_23_2301009520	<i>gravis</i>	45	skin – ulceratio	Male
6_23_2301010550	<i>mitis</i>	64	blood	Male
7_23_2301019250	<i>mitis</i>	78	eye	Male
8_23_2301020610	<i>mitis</i>	42	blood	Male
9_23_2301023390	<i>gravis</i>	35	ear	Male
10_23_2301028110	<i>gravis</i>	45	blood	Male
11_23_2301027870	<i>gravis</i>	37	wound	Female
12_23_2301028830	<i>gravis</i>	39	blood	Male
13_23_2301032120	<i>mitis</i>	32	wound	Male
14_23_2301034050	<i>gravis</i>	58	wound	Male
15_23_2301036650	<i>mitis</i>	68	skin – ulceratio	Female
16_23_2301040570	<i>C. ulcerans</i>	67	wound	Female
17_23_2301041830	<i>gravis</i>	54	fistula – unk	Male
18_23_2301042580	<i>mitis</i>	15	blood	Female



M - GeneRuler 100 bp Plus Ladder, Thermo Scientific
K+: positive control, DNA *C. diphtheriae* NCTC 10648
K- : negative control
B1: test sample 2301040570, DNA from 1 colony
B2: test sample 2301040570, DNA from bacterial mass
DT1-DT2: the entire gene encoding diphtheria toxin - 909 bp
WHO1-WHO2: biologically active toxin subunit - fragment A - 248 bp

Fig.1. Electrophoregram of PCR amplifiers for the *Corynebacterium ulcerans* strain (strain no. 16_23_2301040570). Visible reaction product of 909 bp for the tested sample

Ryc.1. Elektroforegram amplifikatów PCR dla szczepu *Corynebacterium ulcerans* (szczep nr 16_23_2301040570). Widoczny produkt reakcji o wielkości 909 pz dla próbki badanej

category indicates a high likelihood of therapeutic success with increased exposure to these drugs. One *C. diphtheriae* strain was resistant to ciprofloxacin (7_23_2301019250). Strain No. 16_23_2301040570 – *C. ulcerans*, was also resistant to clindamycin, which may indicate the production of nucleotidyltransferases. The results of susceptibility testing by the disk diffusion method for selected antibiotics for *C. diphtheriae* strains are presented in Figure 2.

DISCUSSION

Despite the implementation of mass vaccination campaigns against diphtheria, epidemic outbreaks of this disease occur worldwide. Therefore, the adequate

ten szczep do szczepów opisywanych jako nietoksycznych niosących gen toksyny NTTB (non-toxicogenic toxin-gene bearing). Rycina 1 przedstawia elektroforegram amplifikatów PCR dla szczepu *C. ulcerans*.

Wszystkie badane szczepy były wrażliwe przy zwiększonej ekspozycji (WZE) na benzylopenicylinę, cefotaksym oraz ciprofloksacynę. Przynależność do kategorii wrażliwości WZE oznacza, że istnieje wysokie prawdopodobieństwo sukcesu terapeutycznego przy zwiększeniu ekspozycji na te leki. Jeden szczep *C. diphtheriae* był oporny na ciprofloksacynę (7_23_2301019250). Szczep nr 16_23_2301040570 – *C. ulcerans*, był oporny również na klindamycynę, co może wskazywać na wytwarzanie przez niego nukle-

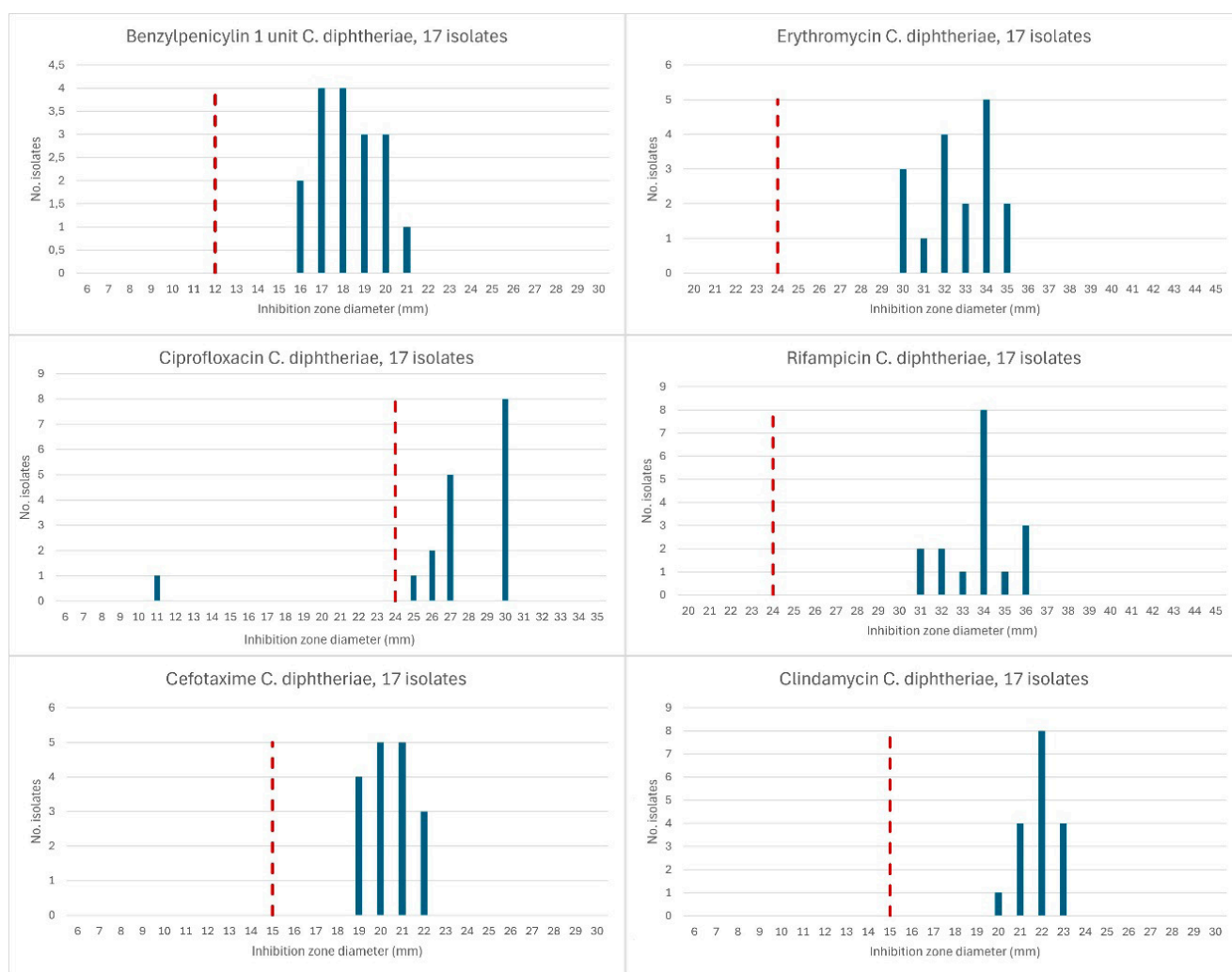


Fig.2. Results of the determination of the sensitivity of *Corynebacterium diphtheriae* strains to antibiotics: benzylopicillin [1 unit], erythromycin [15 mcg], ciprofloxacin [5 mcg], rifampicin [5 mcg], cefotaxime [5 mcg], clindamycin [2 mcg]. Identification method: diffusional-disk according to EUCAST. The red dashed line indicates breakpoint below which the microorganism is marked as resistant

Ryc.2. Wyniki oznaczenia wrażliwości szczepów *Corynebacterium diphtheriae* na antybiotyki: Benzylopenicylina [1 jednostka], Erytromycyna [15 mcg], Ciprofloksacyna [5 mcg], Rifampicyna [5 mcg], Cefotaksym [5 mcg], Klindamycyna [2 mcg]. Metoda oznaczenia: dyfuzyjno-krażkowa zgodnie z EUCAST. Czerwona przerywana linia wyznacza wartość graniczną strefy zahamowania wzrostu poniżej której drobnoustrój oznaczany jest jako oporny

preparation of microbiological laboratories for the diagnosis of *Corynebacterium* species remains an ongoing issue.

In the 1990s, there was an epidemic of diphtheria in the countries of the former Soviet Union. In 2017, the largest epidemic of diphtheria in this century broke out among Rohingya refugees in the Kutupalong camp in Bangladesh. By June 2019, 8,640 cases and 45 deaths from diphtheria in this outbreak had been reported. From 2000 to 2018, epidemic outbreaks were reported in various countries, including Yemen, Venezuela, India, Haiti, and Indonesia (8). According to epidemiological reports from the National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene, the last cases of full-blown diphtheria in Poland were recorded in 1996 (9 cases) and in 2000 (1 case). However, infections caused by *Corynebacterium* strains that do not produce diphtheria toxin still occur.

In recent years, cases of diphtheria have also been reported in Europe, mainly among immigrants. According to the ECDC report from September 2022 to February 12, 2024, 443 cases of diphtheria, including five fatal cases, were reported in EU/EEA countries. The majority of reported cases were related to cutaneous diphtheria, with cases of respiratory diphtheria also reported. Due to the anticipated resistance of *C. diphtheriae* to commonly used oral and parenteral antibiotics, the ECDC recommends monitoring the susceptibility to antimicrobials in all *C. diphtheriae* isolates (9). Control measures for epidemic outbreaks included isolation, screening throat swabs, antibiotic treatment, and vaccination. In cases of diphtheria with respiratory symptoms, diphtheria antitoxin was administered (10). Figure 3 shows the number of cases of *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* in European Union countries from 2015 to 2023 (11). Antibiotic susceptibility testing of strains belonging to

otydylotransferaz. Wyniki badań oznaczenia lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krażkową szczepów *C. diphtheriae* dla wybranych antybiotyków przedstawia Rycina 2.

DYSKUSJA

Pomimo prowadzenia masowych szczepień ochronnych przeciwko błonicy, na całym świecie występują epidemiczne ogniska tej choroby. Z tego powodu, ciągle aktualnym problemem jest odpowiednie przygotowanie laboratoriów mikrobiologicznych do diagnostyki drobnoustrojów z rodzaju *Corynebacterium*.

W latach 90 XX wieku wystąpiła epidemia błonicy w krajach byłego Związku Radzieckiego. W roku 2017 w Bangladeszu w obozie Kutupalong wśród uchodźców Rohingya wybuchła największa w tym stuleciu epidemia błonicy. Do czerwca 2019 roku w ognisku zgłoszono 8640 przypadków i 45 zgonów spowodowanych błonicą. W latach 2000-2018 ogniska epidemiczne były stwierdzane w różnych krajach m. in.: w Jemenu, Wenezueli, Indiach, na Haiti oraz w Indonezji (8). Jak wynika z meldunków epidemiologicznych NIZP PZH – PIB ostatnie przypadki pełnoobjawowej błonicy zanotowano w Polsce w 1996 roku (9 zachorowań) oraz w 2000 roku (1 zachorowanie), zdarzają się jednak nadal zakażenia wywołane przez szczepy *Corynebacterium* niewytwarzające toksyny błonicy.

W ostatnich latach przypadki błonicy zanotowano również w Europie, głównie wśród imigrantów. Według raportu ECDC w okresie od września 2022 roku do 12 lutego 2024 r. w krajach EU/EEA odnotowano 443 przypadki błonicy, w tym pięć przypadków zakończonych zgonem. Większość zgłoszonych przypadków dotyczyła błonicy skórnej, zgłaszano również przypadki błonicy dróg oddechowych. Z uwagi na przewidywaną oporność *C. diphtheriae*

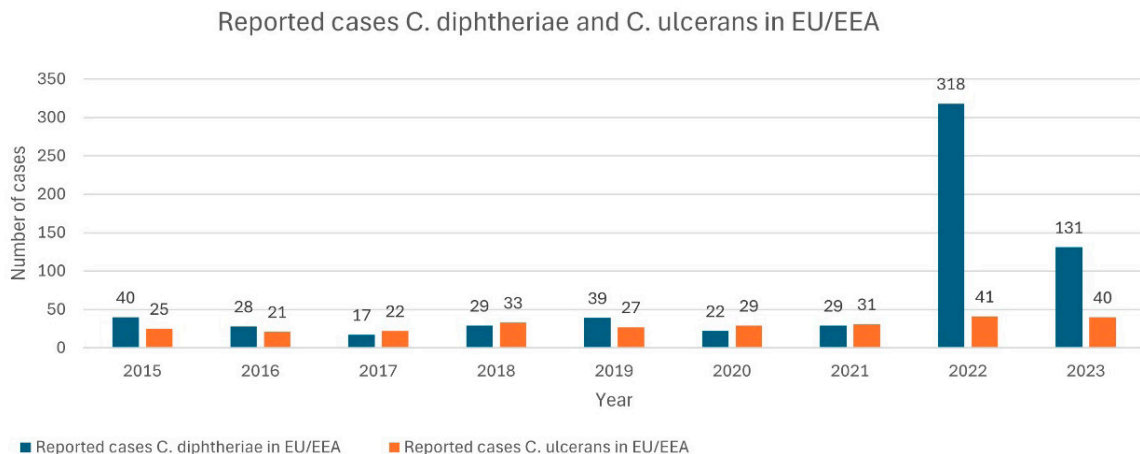


Fig.3. Number of cases of *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* reported to ECDC by countries of the European Union in 2015-2023
Ryc.3. Liczba raportowanych do ECDC przypadków *C. diphtheriae* i *C. ulcerans* przez kraje Unii Europejskiej w latach 2015-2023

the ST377 sequence type, originating from epidemic outbreaks in the European Union, showed resistance to macrolides, lincosamides, and β -lactam antibiotics (*bla*_{OXA-2} gene) (12-14).

The number of *C. diphtheriae* infections in Europe and worldwide is increasing, highlighting the importance of microbiological laboratories being prepared to diagnose these infections. According to WHO procedures, specimens for culture (swabs) should be taken from the nose and throat or from lesions on mucous membranes or skin. If possible, the material should be obtained from beneath the pseudomembrane (if present) or from the pseudomembrane itself. Ideally, clinical material should be collected before the patient receives antibiotic therapy. The collected material on a transport medium (such as Amies or Stuart) or in a sterile container in the case of pseudomembranes should be delivered to the laboratory (4).

Microbiological media used in the diagnosis of *C. diphtheriae* include, among others: Columbia agar with sheep blood and special media for *C. diphtheriae* diagnostics: tellurite agar (Hoyle's or Clauberg's medium), Tinsdale agar for detecting cysteinase, and Loeffler's medium. Tellurite-containing media are both selective and differential in isolating toxigenic corynebacteria (4). Columbia agar with sheep blood can be used in routine diagnostics. After a 24-hour incubation of diphtheria bacilli on blood agar, colonies are grayish, flat, smooth, matte with a clearing at the periphery. Depending on the biotype of *C. diphtheriae*, there may be a small β -hemolysis zone. It should be noted that in the case of *C. diphtheriae* biotype *gravis*, hemolysis does not occur. Figure 4 shows a colony of *C. diphtheriae* biotype *gravis* on blood agar.



Fig.4. Photo of a *Corynebacterium diphtheriae* biotype *gravis* culture on a blood medium (Columbia agar +5% sheep blood), a 48-hour culture. Source: Autor's photographic material

Ryc.4. Zdjęcie hodowli *Corynebacterium diphtheriae* biotyp *gravis* na podłożu krwawym (Columbia agar +5% sheep blood), hodowla 48 godzinna. Źródło: Materiał własny Autorki

na powszechnie stosowane antybiotyki doustne i pozajelitowe ECDC zaleca monitorowanie wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe na wszystkich izolatach *C. diphtheriae* (9). Jako środki kontroli ognisk epidemicznych stosowano izolację, badania przesiewowe wymazów z gardła, leczenie antybiotykami oraz szczepienia. W przypadku błonicy przebiegającej z objawami ze strony układu oddechowego podawano antytoksynę błoniczą (10). Rycina 3 pokazuje liczbę przypadków *C. diphtheriae* i *C. ulcerans* w krajach Unii Europejskiej w latach 2015-2023 (11). Badanie wrażliwości na antybiotyki szczepów należących do typu sekwencyjnego ST377, pochodzących z ognisk epidemicznych na terenie Unii Europejskiej, wykazało oporność na makrolidy, linkozamidy oraz antybiotyki β -laktamowe (gen *bla*_{OXA-2}) (12-14).

Liczba zakażeń *C. diphtheriae* w Europie i na świecie rośnie, dlatego laboratoria mikrobiologiczne muszą być przygotowane do diagnostyki tych zakażeń. Według procedur WHO, próbki do posiewu (wymazy) należy pobierać z nosa i gardła lub ze zmian na błonach śluzowych lub skórze. Jeśli to możliwe, materiał należy pozyskać spod błony rzekomej (jeśli występuje) lub z części samej błony rzekomej. Najlepiej, jeżeli materiał kliniczny zostanie pobrany przed podaniem pacjentowi antybiotykoterapii. Pobrany materiał na podłożu transportowym (Amies lub Stuart) lub w jałowym pojemniku w przypadku błon rzekomych, należy dostarczyć do laboratorium (4).

Podłoża mikrobiologiczne stosowane w diagnostyce *C. diphtheriae* to m. in.: Columbia agar z krwią baranią oraz specjalne podłoża do diagnostyki *C. diphtheriae*: agar tellurynowy (podłoże Hoyle'a lub Clauberga), Tinsdale agar do wykrywania cysteinazy, podłoże Loefflera. Podłoża zawierające telluryn są zarówno selektywne jak i różnicujące w izolacji toksynotwórczych maczugowców (4). Pożywka Columbia agar z krwią baranią może być wykorzystana w rutynowej diagnostyce. Po 24 godzinnej hodowli maczugowca błonicy na agarze z krwią kolonie są szarawe, płaskie, gładkie, matowe z przejaśnieniem na obwodzie. W zależności od biotypu *C. diphtheriae*, może występować niewielka strefa hemolizy β . Trzeba mieć na uwadze, że w przypadku *C. diphtheriae* biotyp *gravis* hemoliza nie występuje. Rycina 4 przedstawia zdjęcie kolonii *C. diphtheriae* biotyp *gravis* na podłożu krwawym. Agar Hoyle'a to podłoże selektywne do izolacji i różnicowania biotypów *C. diphtheriae*. Telluryn potasu działa jako środek selektywny i ma działanie hamujące wzrost większości bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz pozwala na wykrycie redukcji tellurynu, w wyniku czego powstają kolonie o szaro-czarnym wyglądzie, co jest charakterystyczne dla maczugowców (15). Na podłożu Clauberga z krwią baranią i tellurynem potasu widoczny jest różny wzrost kolonii *mitis*, *gravis* oraz

Hoyle's agar is a selective medium for isolating and differentiating *C. diphtheriae* biotypes. Potassium tellurite acts as a selective agent, inhibiting the growth of most Gram-positive and Gram-negative bacteria and allowing the detection of tellurite reduction, resulting in colonies with a gray-black appearance, characteristic of corynebacteria (15). Clauberg's agar with sheep blood and potassium tellurite shows different growth of *mitis*, *gravis*, and *intermedius* colonies (16). Tinsdale's medium is designed for isolating and differentiating corynebacteria from clinical specimens. Selectivity for *Corynebacterium* is provided by potassium tellurite present in the medium. Corynebacteria form black or gray colonies on this medium, and potentially toxigenic bacteria (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, and *C. pseudotuberculosis*) stain the medium beneath the colonies brown (a zone of brown discoloration of the medium beneath the colonies and in their surroundings). This is the result of the tellurite reacting with H₂S produced by the bacteria (from cysteine and thiosulfate). Incubation on Tinsdale's agar should be carried out for up to 48 hours. On Loeffler's medium, *Corynebacterium* bacteria grow faster than other bacteria and produce large amounts of volutin granules. Staining with Neisser's method confirms the presence of polyphosphate (volutin) granules in bacterial cells. Volutin granules stain dark blue, while the cytoplasm stains yellow (16,17). The optimal growth conditions for diphtheria bacilli are a temperature of 34-37°C and an oxygen-rich environment. Anaerobic fermentation of some carbohydrates and other biochemical reactions (including nitrate reduction, hemolysis on blood agar, catalase, urease) are used in the laboratory diagnosis of diphtheria to differentiate from non-pathogenic corynebacteria and to biotype diphtheria bacilli (*gravis*, *mitis*, *intermedius*, *belfanti*) (18). *C. diphtheriae* is Gram-positive rods with club-shaped ends (Fig. 5).

Based on colony morphology and biochemical characteristics, four biotypes of *C. diphtheriae* are distinguished: *gravis*, *mitis*, *intermedius*, and *belfanti*. The *belfanti* biotype is usually

intermedius (16). Podłoże Tinsdale'a jest przeznaczone do izolacji i różnicowania maczugowców z materiałów klinicznych. Wybiórczość dla *Corynebacterium* zapewnia obecny w podłożu telluryn potasowy. Maczugowce tworzą na tym podłożu kolonie czarne lub szare, a bakterie potencjalnie toksynotwórcze (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis*) zabarwiają podłoże pod koloniami na brązowo (strefa brązowego zabarwienia podłoża pod koloniami oraz w ich otoczeniu). Jest to wynik reakcji tellurynu z wytwarzanym przez bakterie H₂S (z cystyny i tiosiarczanu). Hodowlę na podłożu Tinsdale'a należy prowadzić do 48 godzin. Na podłożu Loefflera bakterie z rodzaju *Corynebacterium* wyrastają szybciej niż inne bakterie i wytwarzają duże ilości ziaren wolutyny. Barwienie metodą Neissera potwierdza obecność w komórkach bakterii polifosforanowych (wolutynowych) ziarnistości zapasowych. Ziarna wolutyny wybarwiają się na kolor granatowo-czarny, a cytoplazma na kolor żółty (16,17). Optymalne warunki wzrostu dla maczugowca błonicy to temperatura 34-37°C oraz środowisko tlenowe. Bezgazowa fermentacja niektórych węglowodanów oraz inne reakcje biochemiczne (m. in.: redukcja azotanów, hemoliza na agarze z krwią, katalaza, ureaza), są wykorzystywane

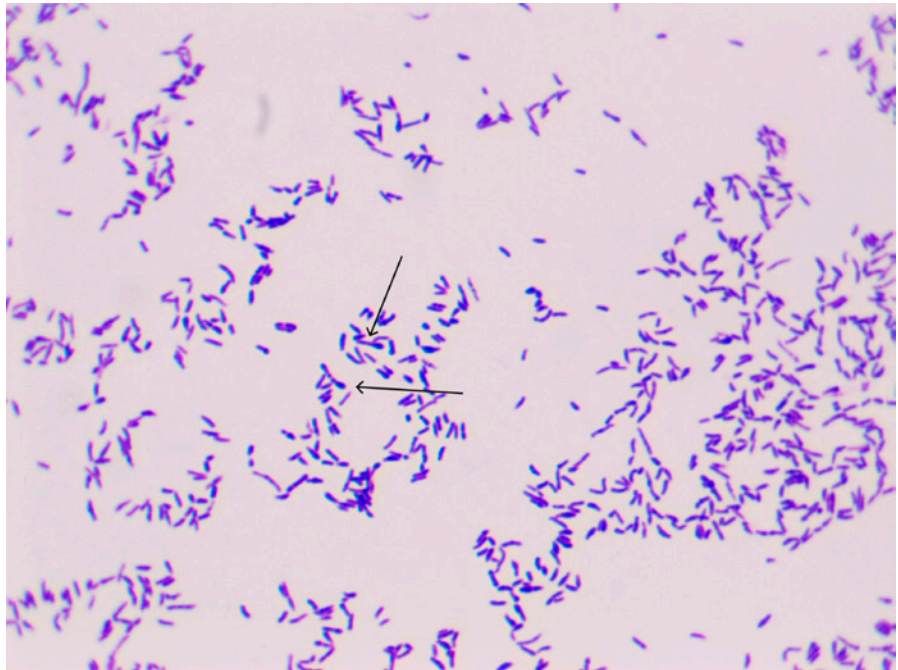


Fig.5. Microscopic preparation of the *Corynebacterium diphtheriae* strain, biotype *belfanti*, from the NCTC 10356 collection, Gram staining. The arrows point to the club-shaped form of bacterial cells. Source: Autor's photographic material, Delta Optical ProteOne light microscope, 1000x magnification, DLT-Cam PRO 5 MP USB 2.0 microscope camera

Ryc.5. Preparat mikroskopowy szczepu *Corynebacterium diphtheriae* biotyp *belfanti* z kolekcji NCTC 10356, barwienie metodą Grama. Strzałki wskazują na maczugowaty kształt komórek bakteryjnych. Źródło: Materiał własny Autorki, mikroskop świetlny Delta Optical ProteOne, powiększenie 1000x, kamera mikroskopowa DLT-Cam PRO 5 MP USB 2.0

described as toxigenic, although in the UK, the dominant toxigenic biotype is *mitis* (77% of toxigenic strains) (1,2). Catalase-positive bacterial colonies with morphology resembling corynebacteria are subjected to identification using biochemical tests such as Api Coryne (bioMérieux), the VITEK 2 microbial identification system (bioMérieux), or MALDI-TOF mass spectrometry. After confirming the identification of *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, or *C. pseudotuberculosis*, the toxigenicity of the tested strain should be excluded using molecular methods and the Elek test. Molecular diagnostic methods allow the detection of the tox gene's presence. By performing a PCR reaction using two primer pairs: DT1-DT2 and WHO1-WHO2, it is possible to detect a fragment of the tox gene encoding the biologically active fragment A of diphtheria toxin (WHO1-WHO2 primers) and the entire tox gene (DT1-DT2 primers) (19,20). The Elek immunoprecipitation test is performed to confirm the expression of the diphtheria toxin gene. It is based on the precipitation phenomenon that occurs in agar medium between the diffusing toxin produced by *C. diphtheriae* and the specific antitoxin (a filter paper disk soaked in diphtheria antitoxin). The appearance of precipitation lines confirms the bacterial strain's toxigenicity (21). Figure 6 illustrates the microbiological diagnostic scheme.

In 2023, the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) introduced new recommendations for interpreting antimicrobial susceptibility testing results for two bacterial species: *C. diphtheriae* and *C. ulcerans*. EUCAST recommends performing antimicrobial susceptibility testing using either the broth microdilution method according to ISO 20776-1 or the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar supplemented with 5% defibrinated horse blood and 20 mg/L β -NAD (MH-F medium) (22).

The studies conducted at the NIZP PZH – PIB showed sensitivity to penicillin with increased exposure (I) among the tested strains of *C. diphtheriae*. This is consistent with data presented in available literature. Studies on the susceptibility of *C. diphtheriae* to penicillin conducted in other countries suggest that elevated MIC values for penicillin are rare. All strains of *C. diphtheriae* tested in 2023 at the NIZP PZH – PIB were sensitive to erythromycin. Zou J. et al., examining the susceptibility of 45 strains of *C. diphtheriae* in 2020, showed resistance to erythromycin at a level of 2,2% (23). In similar studies conducted on 195 strains of *C. diphtheriae* by Bernard K. et al., a resistance rate to erythromycin of up to 16,4% was obtained (24).

Analyzing the susceptibility of *C. diphtheriae* to antibiotics over a longer period and with a larger sample size will allow for assessing the potential effectiveness of the current treatment for invasive diseases caused

w diagnostyce laboratoryjnej błonicy do różnicowania z maczugowcami niechorobotwórczymi oraz do biotypowania maczugowca błonicy (*biotyp gravis, mitis, intermedius, belfanti*) (18). *C. diphtheriae* to Gram dodatnie pałeczki z maczugowato rozszerzonymi końcami (Ryc. 5).

Na podstawie morfologii kolonii i cech biochemicznych wyróżnia się cztery biotypy *C. diphtheriae*: *gravis*, *mitis*, *intermedius* i *belfanti*. Zwykle jako toksynotwórczy jest opisywany biotyp *belfanti*, choć w Wielkiej Brytanii dominującym biotypem toksynotwórczym jest biotyp *mitis* (77% szczepów toksynotwórczych) (1,2). Katalazo-dodatnie kolonie bakteryjne o morfologii przypominającej maczugowce poddaje się identyfikacji za pomocą testów biochemicznych takich jak np.: Api Coryne (bioMérieux), systemu identyfikacji mikroorganizmów VITEK 2 (bioMérieux) lub metodą spektrometrii mas MALDI-TOF.

Po potwierdzeniu identyfikacji *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* lub *C. pseudotuberculosis* należy wykluczyć toksynotwórczość badanego szczepu metodami molekularnymi oraz testem Eleka. Metody diagnostyki molekularnej umożliwiają wykrycie obecności genu tox. Wykonując reakcję PCR z zastosowaniem dwóch par starterów: DT1-DT2 oraz WHO1-WHO2 mamy możliwość wykrycia fragmentu genu tox kodującego biologicznie aktywny fragment A toksyny błoniczej (startery WHO1-WHO2) oraz cały gen tox (startery DT1-DT2) (19,20). Test immunoprecypotacji Elek wykonuje się w celu potwierdzenia ekspresji genu toksyny błoniczej. Jest on oparty na zjawisku precypitacji, które zachodzi w podłożu agarowym pomiędzy dyfundującą toksyną wytwarzaną przez szczep *C. diphtheriae* a swoistą antytoksyną (krążek bibuły nasączony antytoksyną błoniczą). Wystąpienie linii precypitacyjnych jest potwierdzeniem toksynotwórczości szczepu bakteryjnego (21). Rycina 6 obrazuje schemat diagnostyki mikrobiologicznej.

W 2023 roku Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST) wprowadził nowe zalecenia interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości dla dwóch gatunków bakterii: *C. diphtheriae* oraz *C. ulcerans*. EUCAST rekomenduje oznaczanie lekowrażliwości metodą mikrorozcieńczeń w bulionie zgodnie z normą ISO 20776-1 lub metodą dyfuzyjno-krążkową, na podłożu Mueller-Hinton agar z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi końskiej i 20 mg/L β -NAD (podłoże MH-F) (22).

Przeprowadzone w NIZP PZH – PIB badania wykazały wrażliwość przy zwiększonej ekspozycji badanych szczepów *C. diphtheriae* na penicylinę (kategoria wrażliwości WZE). Jest to zgodne z danymi prezentowanymi w dostępnym piśmiennictwie. Badania wrażliwości *C. diphtheriae* na penicylinę przeprze-

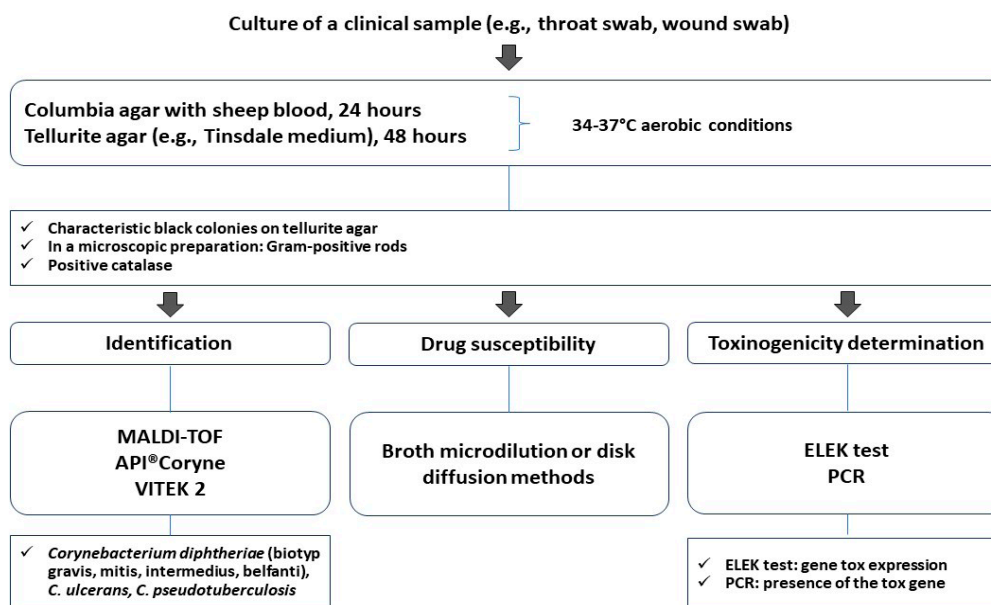


Fig.6. Scheme of microbiological diagnostics
Ryc.6. Schemat diagnostyki mikrobiologicznej

by this microorganism. Knowledge about microbial susceptibility to antibiotics will facilitate decision-making in the selection of antibiotics in post-exposure therapy and the elimination of carriage in the case of toxin-producing isolates. It's also important to note that vaccination (diphtheria toxoid) does not protect against infection with non-toxigenic strains. Due to possible recurrences of epidemic outbreaks, it is necessary to increase readiness for the diagnosis, prevention, and treatment of diphtheria.

REFERENCES

- Sharma NCh, Efstratiou A, Mokrousov I, Mutreja A, Das B, Ramamurthy T. Diphtheria. *Nat Rev Dis Primers* 2019 Dec 5;5(1):81.
- Public health control and management of diphtheria in England 2023 guidelines. Available from: <https://assets.publishing.service.gov.uk/media/654944a9bdb7ef000d4af91c/diphtheria-guidelines-version19-November2023.pdf>
- Breedlove B. A Deadly Kiss. *Emerg Infect Dis.* 2023 May; 9(5):1085–1086 doi: 10.3201/eid2905.AC2905
- WHO laboratory manual for the diagnosis of diphtheria and other related infections. Geneva: World Health Organization; 2021. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/352275/9789240038059-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). The Pink Book: Diphtheria. Atlanta: CDC. 2021. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/dip.html>
- Boroń-Kaczmarek A, Wiercińska-Drapało A. *Choroby zakaźne i pasożytnicze.* 2017; 415-416.
- Definicje przypadków chorób zakaźnych na potrzeby nadzoru epidemiologicznego. Available from: http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/inne/Def_PL2_6b.pdf
- Truelove SA, Keegan LT, Moss WJ. *Clinical and Epidemiological Aspects of Diphtheria:*

- A Systematic Review and Pooled Analysis. Clin Infect Dis. 2020 Jun 24;71(1):89-97.
9. ECDC Weekly threats reports (CDTR) Communicable disease threats reports. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/communicable-disease-threats-report-week-7-2024.pdf>
 10. Increase of reported diphtheria cases among migrants in Europe due to *Corynebacterium diphtheriae*. 2022, Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/increase-reported-diphtheria-cases-among-migrants-europe-due-corynebacterium>
 11. Surveillance Atlas of Infectious Diseases. Available from: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
 12. Badenschier F, Berger A, Dangel A. Outbreak of imported diphtheria with *Corynebacterium diphtheriae* among migrants arriving in Germany, 2022. Euro Surveill. 2022 Nov 17; 27(46):2200849.
 13. Jacquinet S, Martini H, Mangion JP. Outbreak of *Corynebacterium diphtheriae* among asylum seekers in Belgium in 2022: operational challenges and lessons learnt. Euro Surveill. 2023 Nov;28(44):2300130.
 14. O'Boyle S, Barton HE, D'Aeth JC. National public health response to an outbreak of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* among asylum seekers in England, 2022: a descriptive epidemiological study. Lancet Public Health. 2023 Oct;8(10):e766-e775.
 15. Hoyle LA, Leeds MB, 1941 A tellurite blood-agar medium for the rapid diagnosis of diphtheria. Lancet 237:175-176.
 16. Szewczyk E. Diagnostyka bakteriologiczna. 2020; Wydanie III:52-55.
 17. Mikołajczyk A, Stefaniuk E, Bosacka K, Hryniewicz W. Właściwości i zastosowanie podłoży bakteriologicznych. Post.Mikrobiol. 2016; 55(3):320-329.
 18. Kopačka B, Kruszewska A. Bakteriologiczna diagnostyka błonicy. PZH Zakład Bakteriologii, Wydawnictwa Metodyczne Państwowego Zakładu Higieny, 1974;3(50).
 19. Pallen MJ, Hay AJ, Puckey LH, Efstratiou A. Polymerase Chain Reaction for Screening Clinical Isolates of *Corynebacteria* for the Production of Diphtheria Toxin. J Clin Pathol. 1994; 47:353–356.
 20. Hauser D, Popoff MR, Kiredjian M, Boquet P, Bimet F. Polymerase Chain Reaction Assay for Diagnosis of Potentially Toxinogenic *Corynebacterium diphtheriae* Strains: Correlation with ADP-Ribosylation Activity Assay. J Clin Microbiol. 1993; 31:2720–2723.
 21. Kuklińska D, Chodorowska M. Nowelizacja laboratoryjnej diagnostyki błonicy. Med Dośw Mikrobiol. 2002; 54:35-43.
 22. Rekomendacje EUCAST. Available from: <https://korld.nil.gov.pl/rekomendacje/rekomendacje-eucast/>
 23. Zou J, Chorlton SD, Romney MG, Payne M, Lawson T, Wong A, et al. Phenotypic and genotypic correlates of penicillin susceptibility in nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae*, British Columbia, Canada, 2015-2018. Emerg Infect Dis 2020; 26:97–103.
 24. Bernard K, Pacheco AL. In vitro activity of 22 antimicrobial agents against *Corynebacterium* and *Microbacterium* species referred to the Canadian National Microbiology Laboratory. Clin Microbiol Newsl. 2015; 37:187–98.

Received: 31.03.2024

Accepted for publication: 24.05.2024

Otrzymano: 31.03.2023 r.

Zaakceptowano do publikacji: 24.05.2024 r.

Address for correspondence:

Adres do korespondencji:

Agata Stepuch

Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń

Biologicznych,

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH –

Państwowy Instytut Badawczy

email: agata.stepuch@gmail.com