

# MASTAZYME™ DIPHTHERIA

Enzymimmunoassay zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von humanen IgG Antikörpern gegen Diphtherie-Toxin von *Corynebacteriae diphtheria* in Serum und Plasma

Enzyme immunoassay for the detection and quantification of human IgG antibodies against diphtheria toxin of *Corynebacterium diphtheriae* in serum and plasma

Test immunoenzymatique pour la détection et la quantification des anticorps IgG dirigés contre l'antigène de *Corynebacterium diphtheriae* dans le sérum et le plasma humain

## Gebrauchsinformation / Instructions for Use / Notice Technique



**Nur zur *in-vitro* Diagnostik / For *in vitro* diagnostic use only /  
Usage *in vitro* uniquement**



Deutsch:            Seiten 03–09



English:            Pages 10–16



Français:           Pages 17–24

MASTAZYME™ DIPHTHERIA IgG

REF 680351

12 x 8 Tests

**Lagerung / Storage / Conservation: 2–8 °C**



	<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
1.	Einleitung	4
2.	Testprinzip und Verwendungszweck	4
3.	Packungsinhalt	5
4.	Zusätzlich benötigte Materialien	6
5.	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	6
6.	Lagerung und Stabilität	7
7.	Probengewinnung und -handhabung	7
8.	Testdurchführung	7
9.	Auswertung und Interpretation	8
10.	Testcharakteristika	9
11.	Literatur	9

## 1. Einleitung

Die Diphtherie ist eine bakterielle Infektionskrankheit mit lokalisierten und generalisierten Symptomen und wird durch das *Corynebacterium diphtheriae* ausgelöst. Die systemische Intoxikation wird durch ein Diphtherie-Exotoxin, einen extrazellulären Metaboliten, verursacht. Ein Schutz gegen die Erkrankung ist durch die Entwicklung eines neutralisierenden Antikörpers gegen das Diphtherie-Toxin möglich.

Die Übertragung geschieht durch direkten Kontakt und durch Tröpfcheninfektion. Meistens befällt die Diphtherie den Rachen oder den Kehlkopf. Hierbei stellt der Krupp mit bellendem Husten und Atemnot eine ernsthafte Komplikation dar. Die Erkrankten werden isoliert und erhalten möglichst frühzeitig ein antitoxisches Serum zur passiven Immunisierung sowie Antibiotika und eine Intensivpflege.

Die Diphtherie bleibt sowohl bei Kindern als auch bei älteren Menschen eine schwere Krankheit mit sehr hohen Letalitätsraten. Dies wurde durch den kürzlichen Ausbruch der Krankheit in der früheren Sowjetunion belegt. Die WHO schätzt, dass 1995 in den Staaten der GUS ca. 60.000 Erkrankungen aufgetreten sind.

80 % der Bevölkerung in Deutschland glauben, ausreichend gegen Diphtherie geschützt zu sein. Es konnte aber gezeigt werden, dass Erwachsene nur zu 20–30 % einen effektiven Impfschutz besitzen. In den USA wurden z. B. 1921 von 200.000 Fällen, vor allem bei Kindern, berichtet. Von diesen verliefen 5–10 % tödlich. Nach Einführung der allgemeinen Impfpflicht (97 % der Schulkinder werden mit dem trivalenten DTP-Impfstoff erfasst) gingen die Fallzahlen kontinuierlich zurück, sodass zwischen 1990 und 1994 nur noch 15 Infektionen auftraten. Die meisten Fälle treten bei nicht oder unzureichend geimpften Personen auf.

1990 wurden der WHO 1.700 Diphtheriefälle gemeldet, 1994 war die Zahl auf 47.251 gestiegen und 1995 auf 50.464.

In Deutschland liegt die Durchimpfungsrate für Diphtherie bei ca. 70 %. Die Raten der vollständig geimpften Kinder nehmen im Zeitverlauf jedoch um 10–20 % ab und liegen für den Jahrgang 1992 nur noch bei 67 %.

Man geht davon aus, dass eine Auffrischungsimpfung einen Schutz von 10 Jahren gibt und dass der serologische Grenztiter bei 0,01 IU/mL liegt. Für die Bestimmung der Diphtherie-Antitoxin-Spiegel im Serum ist eine Reihe von Methoden verfügbar. Das klassische Verfahren, der Schick-Test, der allerdings keine Labormethode darstellt, ist eine verlässliche quantitative Methode zur Erfassung der antitoxischen Immunität.

Bei den *in-vitro* Verfahren stand als Referenz der Toxin-Neutralisationstest im Vordergrund. Daneben werden passive Hämagglutinationsmethoden und Radioimmunoassays angeboten. In den letzten Jahren haben sich allerdings ELISA-Tests wegen ihrer hohen Empfindlichkeit, einfachen Durchführung sowie der Möglichkeit zur Automatisierung durchgesetzt.

## 2. Testprinzip und Verwendungszweck

Der MASTAZYME™ DIPHTHERIA dient dem Nachweis und der Quantifizierung von spezifischen IgG-Antikörpern gegen Diphtherie-Toxin von *Corynebacterium diphtheriae* in Serum oder Plasma. Die Verwendung des ELISAs für andere Körperflüssigkeiten kann auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden. MASTAZYME™ DIPHTHERIA ist nur zur *in-vitro* Diagnostik zu verwenden.

Das Testprinzip des ELISAs kann in 4 Schritten beschrieben werden.

### 2.1 Seruminkubation und 1. Waschschrift

Spezifische Antikörper bilden mit dem Antigen, das an die Festphase gebunden ist, einen stabilen Immunkomplex. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden unspezifisch gebundene Serumkomponenten durch Waschen entfernt.

### 2.2 Konjugatinkubation und 2. Waschschrift

Meerrettich-Peroxidase-markiertes Anti-human-IgG bindet an die entsprechenden Antikörper auf dem Festphasenantigen und bildet mit diesen einen stabilen Immunkomplex. Überschüssiges nicht gebundenes Konjugat wird nach der 30-minütigen Inkubation durch Waschen entfernt.

### 2.3 Substrat- und Stoppreaktion

Nach Zugabe des TMB-Substrats wird dieses durch das Enzymkonjugat umgesetzt. Es entsteht eine bläuliche Färbung, deren Intensität mit der Menge der gebundenen Konjugatmoleküle korreliert. Nach 20 Minuten Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 0,5 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt. Die pH-Verschiebung führt zum Farbumschlag von blau nach gelb.

### 2.4 Auswertung

Die Reaktionsansätze können nun mit einem ELISA-Plattenreader bei 450 nm (empfohlene Referenzwellenlänge bei bichromatischer Messung: 600–690 nm) gemessen werden. Die Extinktion (OD) korreliert mit der Konzentration der spezifischen Antikörper.

Das Ergebnis kann aus einer Eichkurve abgelesen oder durch geeignete Kurvenberechnung (4-Parameter-Anpassung, Spline-Approximation o.ä.) ermittelt werden.

## 3. Packungsinhalt

Der Testkit enthält genügend Reagenzien für 12 x 8 = 96 Bestimmungen. Die Streifen der Mikrotiterplatte sowie alle anderen Reagenzien sind bei 2–8 °C zu lagern. Das Verfallsdatum der einzelnen Komponenten ist auf den jeweiligen Etiketten vermerkt.

12	Streifen	mit je 8 einzeln abbrechbaren Wells, die mit gereinigtem Diphtherie-Toxin beschichtet sind
1 x	Rahmen	für Streifen der Mikrotiterplatte (MTP)
5 x 2 mL	Kalibratoren 1–5	humanes Serum mit IgG-Antikörpern gegen Diphtherie-Toxin, verdünnt mit PBS in folgenden Konzentrationen, stabilisiert mit 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromnitrodioxan als Konservierungsmittel, gebrauchsfertig

		IgG
Kalibrator 1	Konzentration (IU/mL)	0
Kalibrator 2		0,01
Kalibrator 3		0,1
Kalibrator 4		0,5
Kalibrator 5		1,0

Kalibratoren für IgG sind gegen WHO 00/496 kalibriert. Die Konzentrationen sind in IU/mL angegeben

1 x 60 mL	Serumdiluent	PBS/BSA Puffer Natriumazid (NaN <sub>3</sub> < 0,1 %) als Konservierungsmittel
1 x 12 mL	Enzymkonjugat	Meerrettich-Peroxidase markiertes Anti-human-IgG (Ziege), gebrauchsfertig
1 x 12 mL	TMB-Substrat	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin, gebrauchsfertig
1 x 12 mL	Stopplösung	0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Schwefelsäure), gebrauchsfertig
1 x 60 mL	Waschpuffer 10 x Konzentrat	PBS/Tween Puffer, vor Gebrauch 1:10 mit dest. Wasser verdünnen, vor Gebrauch kurz erwärmen, um mögliche Kristalle zu lösen
2 x	Abdeckfolien	Zur Abdeckung der Mikrotiterplatte (MTP) während der Inkubation
1 x	Plastikhülle	Zur Lagerung nicht benötigter MTP-Streifen

#### 4. Zusätzlich benötigte Materialien

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Pipetten oder Multipipetten
- Photometer für Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter (Referenzfilter 600–690 nm)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten (bei manuellem Waschen: Waschflasche)
- Röhrchen für Serumverdünnungen
- Messzylinder
- Destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität

#### 5. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Den Test nur zur *in-vitro* Diagnostik verwenden! Reagenzien nicht schlucken oder einatmen. Die Sicherheitsbestimmungen des Labors sind zu beachten. Im Labor darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Alle Seren und Plasmen sowie Puffer des Kits, die humanes Probenmaterial enthalten, wurden mit anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und für negativ befunden. Da das Vorhandensein solcher Erreger trotzdem nicht völlig ausgeschlossen werden kann, sollten die Reagenzien wie potenziell infektiöses Material behandelt werden.
- Serum- und Reagenzien-Kontaminationen sollten mit Desinfektionsmitteln gesäubert und der Abfall entsprechend entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur (18–24 °C) gebracht werden.
- Vor der Verwendung sind die Reagenzien gut zu mischen. Heftiges Schütteln und Schaumbildung sind zu vermeiden.
- Beim Pipettieren ist auf gleiche Zeitintervalle zu achten, um für alle Testansätze gleiche Bedingungen zu gewährleisten.
- Beim Öffnen der Fläschchen ist eine Kontamination des Stopfens zu vermeiden. Um das Risiko möglicher Oxidationen zu minimieren, sind die Fläschchen nach Gebrauch sofort wieder zu verschließen.
- Um Verschleppungen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden, sind Einmal-Pipettenspitzen zu verwenden.
- Reagenzien verschiedener Kit-Chargen sollten nicht verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind vor Ablauf des Verfallsdatums zu verwenden.
- Gemäß den GLP (Good Laboratory Practice) oder entsprechenden Richtlinien sind alle Laborgeräte regelmäßig auf Funktion und Präzision zu prüfen, dies gilt z. B. für die Pipetten, Waschgeräte und ELISA-Reader.
- Der Kontakt mit der Schwefelsäure enthaltenden Stopplösung und TMB-Substrat ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und gründlich mit Wasser abwaschen. Alle Geräte sofort nach Gebrauch sorgfältig reinigen.

## 6. Lagerung und Stabilität

Alle Reagenzien bei 2–8 °C lagern.

Das Verfallsdatum jedes Kitbestandteils ist auf dem entsprechenden Etikett vermerkt. Die Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht weiter verwenden.

Verdünnter Waschpuffer kann bei 2–8 °C gelagert werden. Unter diesen Bedingungen kann er bis zu 4 Wochen verwendet werden.

Nach dem Öffnen ist das angebochene Kit innerhalb von 3 Monaten zu verwenden.

## 7. Probengewinnung und -handhabung

Es kann sowohl Serum als auch Plasma (EDTA, Heparin) zur Bestimmung verwendet werden. Die Proben können 3 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Bei längerer Aufbewahrung Proben sofort nach Entnahme in Aliquots aufteilen und bei -20 °C einfrieren. Proben, deren Konzentration über dem höchsten Kalibrator liegt, müssen mit Serumdiluent weiter verdünnt und erneut analysiert werden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden!

Aufgetaute Proben sollten vor der Verwendung im Test gemischt (Vortex) werden.

Lipämische, ikterische oder hämolysierte Proben können falsche Ergebnisse ergeben.

Vor der Analyse müssen Patientenproben mit Serumdiluent 1:101 (z. B. 5 µL Serum + 500 µL Serumdiluent) verdünnt werden.

Zur Vermeidung von Störungen durch Rheumafaktoren können die Patientenproben mit MASTSORB (Kat.-Nr.: 651003) präabsorbiert werden. **Kalibratoren dürfen nicht absorbiert werden.**

## 8. Testdurchführung

### 8.1. Vorbereitung der Reagenzien

**Alle Reagenzien und Proben mischen und auf Raumtemperatur (RT, 18–24 °C) bringen.**

**Waschpuffer:** Beim Vorliegen von Salzkristallen das Konzentrat auf 37 °C erwärmen und nach Lösung der Kristalle mischen.

Das Waschpuffer-Konzentrat mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen (z. B. 60 mL Konzentrat + 540 mL dest. Wasser), mischen.

- Die Gebrauchsanweisung ist zu befolgen. Jegliche Abänderung oder Modifikation erfolgt in Verantwortung des Anwenders.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Reagenzien sollten nur so lange wie nötig bei Raumtemperatur gelagert werden.
- Für die quantitative Auswertung ist mit jedem Testansatz eine Eichkurve zu erstellen.
- Nicht benötigte MTP-Streifen sollten in der Plastikhülle bei 2–8 °C trocken gelagert werden.

### 8.2. Testablauf

**Hinweis:** Es können andere als die empfohlenen Inkubationsbedingungen gewählt werden. Bei Abweichung vom vorliegenden Protokoll (z. B. Inkubationstemperatur 37 °C statt RT) ist der Anwender für die Validierung des Tests verantwortlich.

1. Je 100 µL der vorverdünnten (1:101) Patientenproben und gebrauchsfertigen Kalibratoren in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. Streifen mit der beiliegenden Folie verschließen und bei RT für 60 Minuten inkubieren.

3. Platteninhalt verwerfen und Vertiefungen mit 3 x 300 µL gebrauchsfertigem Waschpuffer waschen. Rückstände von Waschpuffer sind durch Ausklopfen der Platten auf Fließpapier zu entfernen.
4. 100 µL Enzymkonjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Streifen mit der beiliegenden Folie verschließen und bei RT für 30 Minuten inkubieren.
6. Waschen wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. 100 µL TMB-Substrat pipettieren.
8. Streifen mit der beiliegenden Folie verschließen und bei RT für 20 Minuten im Dunkeln inkubieren.
9. Reaktion durch Zugabe von 100 µL Stopplösung beenden.
10. Inhalt der Vertiefungen kurz mischen und anschließend bei 450 nm messen. Als Blank wird gegen Luft gemessen. Es wird empfohlen, als Referenzwellenlänge 600–690 nm zu verwenden. Die Konzentrationen können graphisch an Hand der Eichkurve oder mittels Computersimulation berechnet werden.

**Die entwickelte Farblösung sollte innerhalb von 60 Minuten nach Zugabe der Stopplösung gemessen werden.**

## 9. Auswertung und Interpretation

### Beispiel:

	OD 450 nm	korrigierte OD Werte	Mittelwert OD
Blank	0,016		
Kalibrator 1	0,037 / 0,045	0,021 / 0,029	0,025
Kalibrator 2	0,072 / 0,063	0,056 / 0,047	0,052
Kalibrator 3	0,376 / 0,386	0,360 / 0,370	0,365
Kalibrator 4	1,480 / 1,461	1,464 / 1,445	1,455
Kalibrator 5	2,149 / 2,126	2,133 / 2,110	2,122

Die obige Tabelle dient als Beispiel. Die Daten beschreiben keine Werte, die in anderen Laboratorien erhalten wurden. **Die Daten dürfen nicht zur Erstellung einer Eichkurve verwendet werden.**

### 9.1 Quantitative Auswertung

Die Konzentrationen des MASTAZYME™ DIPHTHERIA ist in internationalen Einheiten (IU/mL) angegeben. Die exakten Konzentrationen sind auf den Etiketten der Kalibratoren angegeben. Die Extinktion wird entweder graphisch oder mittels Computersimulation gegen die Konzentration der Kalibratoren aufgetragen und die Konzentration der Patientenprobe direkt abgelesen oder berechnet. Auch Verlaufskontrollen für einen gegebenen Patienten sind hiermit möglich.

#### Interpretation:

< 0,01 IU/mL	Grundimmunisierung empfohlen
0,01–0,1 IU/mL	Booster-Impfung empfohlen
> 0,1 IU/mL	Guter Immunstatus



## 10. Testcharakteristika

Die Testcharakteristika des MASTAZYME™ DIPHTHERIA wurden entsprechend den Vorgaben der IVD-Direktive der EU erstellt und bewegen sich im erwarteten Bereich. Auf Wunsch können diese Daten dem Anwender zur Verfügung gestellt werden.

## 11. Literatur

1. Borcic, B et al. Immunity to diphtheria in the Croatian population in 1994. Lijec. Vjesn., 118: 227 (1996).
2. CDC. Diphtheria Epidemic – New Independent States of the Former Soviet Union. 1990-1994; MMWR 44: 177 (1995).
3. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Biological Products; Bacterial Vaccines and Toxoids; Implementation of Efficacy Review; Proposed Rule. Federal Register Vol 50 (240): 51002 (1985).
4. Frank, JW et al. Diphtheria overimmunization in children. Can. Med. Assoc. J. 141: 1241 (1989).
5. Gupta, RK et al. Diphtheria antitoxin levels in blood and plasma donors. J. Infect. Dis. 173: 1493 (1996).
6. Kjeldsen, K et al. Immunity against diphtheria and tetanus in the age group 30-70 years. Scand. J. Infect. Dis. 20: 177 (1988).
7. Lau, RC. Detection of diphtheria toxin antibodies in human sera by ELISA. J. Hyg. 96: 415 (1986).
8. Mueller, JH et al. Production of diphtheria toxin of high potency (100 Lf) on a reproducible medium. J. Immunol. 40: 21 (1941).
9. Melville-Smith, M et al. Estimation of diphtheria antitoxin in human sera by ELISA. J. Med. Microbiol. 25: 279 (1988).
10. Nosov, SD. Infectious Diseases of Childhood, 2. Auflage; Mir Publishers, Moskau, 61 (1984).
11. Recommendations of the Advisory Committee of Immunization Practices (ACIP). Diphtheria, Tetanus, and Pertussis: Recommendations for vaccine use and other preventive measures; MMWR 40: 10 (1991).
12. Rieger, J et al. Diphtheria immunity in the German population; Gesundheitswesen 56: 667 (1994).

	<b>Contents</b>	<b>Page</b>
1.	Intended Use	11
2.	Introduction	11
3.	Principle of the Test	11
4.	Kit Contents	12
5.	Materials Required but not Provided	13
6.	Warnings and Precautions	13
7.	Storage and Stability	13
8.	Specimen Collection and Handling	14
9.	Assay Procedure	14
10.	Results and Interpretation	15
11.	Assay Performance	16
12.	References	16

## 1. Intended Use

MASTAZYME™ DIPHTHERIA has been designed for the detection and the quantification of specific IgG antibodies against the toxin of *Corynebacterium diphtheriae* in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be provided on request.

This assay is intended for *in-vitro* diagnostic use only.

All laboratory test results should be interpreted in conjunction with other clinical data. The clinical judgement and further tests have to be taken into account additionally.

## 2. Introduction

Diphtheria is a bacterial infectious disease which appears predominantly during the childhood. The disease leads particularly to an inflammation of the pharynx, larynx and nasal mucosa. Additionally, bacterial toxins cause via long-distance effect damages of the heart, circulation and CNS. Only the toxigenic strains are pathogenic.

The etiologic agent is the *Corynebacterium diphtheriae*. These gram-positive bacteria prefer a microaerophil to anaerobe environment. Its pathogenicity is based on the secretion of an exotoxin that is circulating in the blood and effecting the heart muscle, kidneys and CNS. The diphtheria toxin will be produced by lysogenic strains.

Depending on the stage of disease the three types 'slight, middle and serious' can be distinguished. The natural source of infection is the sick individual whereas a carrier not absolutely shows symptoms. The infection is spread both through the aerial-droplet route and rarely by milk or smear infection. The appearance of Diphtheria shows a seasonal prevalence with the greatest incidence in winter.

Especially non-vaccinated children will be infected. The incubation time is depending on the number of invasive germs.

The place of infection is the mucosa of the respiratory tract where an acute local infection is developing. The secreted toxin leads to a superficial inflammation of the mucosa associated with the formation of a brown film (pseudo-membrane) upon it consisting of bacteria, necrotic epithelial cells, fibrin, red and white cells. From this local inflammation the toxin reaches other organs by using the blood and lymphatic circulation. Here it may cause severe damages. The grade of disease depends on the immunostate of the child. Usually, a limited Diphtheria arises whereas in case of an immunosuppression, a severe Diphtheria is observed. As a result of this course of disease the patient may die.

In most cases children will be vaccinated (e.g. DTP = Diphtheria-Tetanus-Pertussis) after the third month of life. The state of immunity can be monitored by determining the antitoxin IgG.

## 3. Principle of the Test

The principle of the test reaction can be described in four stages.

### 3.1 Serum incubation

Specific antibodies bind to the antigens on the solid phase to form a stable immune complex. After a 60 minutes incubation at room temperature the wells are washed with prediluted washing buffer to remove all non-reactive serum components.

### 3.2 Conjugate incubation

The anti-human-IgG horseradish peroxidase conjugate is added to all wells. The conjugate binds to IgG antibodies on the solid phase antigen to form a stable sandwich. After a 30 minutes incubation at room temperature the excess conjugate is removed by washing all wells with washing buffer.

### 3.3 Substrate reaction and stopping

The TMB substrate is dispensed into each well and the peroxidase enzyme/substrate reaction forms a stable blue chromogen. The reaction and subsequently the colour development is stopped after 20 minutes incubation at room temperature by adding 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to the wells. The change in pH also causes the chromogen to change colour from blue to yellow.

### 3.4 Reading and interpretation

The intensity of the colour is read in a microtiter plate reader at 450 nm (recommended reference wavelength for bichromatic measurement: 600–690 nm). The intensity of the colour (OD) is directly proportional to the concentration of the specific antibody in the patient sample.

## 4. Kit Contents

The kits contains sufficient reagents for 12 x 8 = 96 determinations. The strips and solutions have to be stored at 2–8 °C. The expiry date is mentioned on the labels.

12	Microtiter strips	single strips each with 8 break-apart wells coated with the purified toxin of <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
1 x	Frame holder	
5 x 2 mL	Calibrators 1–5	human serum containing antibodies against diphtheria toxin (concentrations listed below) diluted in PBS and stabilised with 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane as preservatives, ready to use

		IgG
Calibrator 1	Concentration (IU/mL)	0
Calibrator 2		0.01
Calibrator 3		0.1
Calibrator 4		0.5
Calibrator 5		1.0

IgG is calibrated against WHO reference preparation 00/456. The concentration is stated in IU/mL

1 x 60mL	Serum diluent	PBS/BSA buffer solution, contains < 0.1 % sodium azide as preservative, ready to use
1 x 12 mL	Enzyme conjugate solution	HRP-labelled goat anti-human-IgG, ready to use
1 x 12 mL	TMB substrate	3,3',5,5' Tetramethylbenzidine, ready to use
1 x 12 mL	Stopping solution	0.5 M sulfuric acid, ready to use
1 x 60mL	Washing buffer 10 x concentrated	PBS/Tween buffer solution 10 x concentrated to be diluted 1:10 prior to use; the concentrate should be warmed up to 37 °C for 15 minutes to avoid any crystals
2 x	Plate sealers	to cover microtiter strips during incubation
1 x	Plastic bag	re-sealable for dry storage of non-used strips

## 5. Materials Required but not Provided

- 5 µL-, 100 µL- and 500-µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter plate reader with a 450 nm filter (reference filter 600–690 nm)
- Microtiter Plate Washer (in case of manual washing: wash bottle)
- Reagent tubes for the serum dilution
- Measuring cylinder
- Distilled water or water of higher quality

## 6. Warning and Precautions

- For *in-vitro* diagnostic use only! Do not ingest or swallow! Laboratory safety precautions should be followed. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- All sera and plasma or buffers based upon have been tested to HBsAg, HIV and HCV respectively with generally accepted methods and were found negative. Nevertheless, precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite 5 %) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18–24 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination separate disposable pipet tips have to be used.
- No reagents from different kit lots should be used and they should not be mixed with one another.
- All reagents have to be used within shelf life.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO 9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers e.g. to microliter pipets and washing or reading (ELISA Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents especially the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided because possible irritations and acid burns could arise and there exists a danger of intoxication.

## 7. Storage and Stability

Store all reagents at 2–8 °C.

The expiry date of each reagent is printed on the individual labels. Do not use any reagents after the expiry date has been exceeded.

The diluted washing buffer is stable for up to 4 weeks when stored at 2–8 °C.

The opened kit should be used within three months.

## 8. Specimen Collection and Handling

Both serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood which is aseptically drawn by venipuncture after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored at 2–8 °C for up to 3 days. They should be kept at -20°C for a longer storage. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

Patient sera must be prediluted 1:101 in serum diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL serum diluent) prior to testing.

Samples containing concentrations higher than the highest calibrator have to be diluted further with serum diluent.

In case of interference with rheumatic factors, serum preabsorption with RF absorbent (MASTSORB™ Order Code: 651003) is recommended. **Do not absorb the calibrators.**

## 9. Assay Procedure

### 9.1. Preparation of Reagents

**Allow all kit components and specimens to reach room temperature (RT, 18–24 °C) prior to use and mix well.**

**Washing buffer:** Dissolve any crystals which may be in the bottle by warming to 37 °C and then mix well.

Dilute the concentrated washing buffer 1:10 with distilled water (e.g. 60 mL buffer concentrate + 540 mL distilled water). Mix thoroughly.

- Strictly follow the instructions for reliable test performance. Any changes or modifications are within the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature for longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Put the unused microtiter strips back in the plastic bag and store them dry at 2–8 °C.

### 9.2. Assay Steps

Prepare a sufficient amount of microtiter wells for calibrators, controls and samples.

**Note: Other incubation conditions might be possible. In case of modifications of the recommended test procedure (e.g. incubation temperature 37 °C instead of RT) the user has to validate assay performance.**

1. Pipette 100 µL each of the diluted (1:101) samples and the ready to use calibrators into the appropriate wells.
2. Cover plate with the enclosed plate sealing foil and incubate at room temperature for 60 minutes.
3. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted washing buffer. Afterwards remove residues of the washing solution by gentle tapping of the microtiter plate on a paper towel.
4. Pipette 100 µL of enzyme conjugate solution into each well.
5. Cover plate with plate sealing foil and incubate for 30 minutes at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted washing buffer. Afterwards remove residues of the washing solution by gentle tapping of the microtiter plate on a paper towel.

7. Dispense 100 µL of TMB substrate into each well.
8. Cover plate with the plate sealing foil and incubate for 20 minutes in the dark (e.g. drawer) at room temperature.
9. Add 100 µL of stopping solution to each well.
10. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, read the optical density at 450 nm and calculate the results. Blank against air. A bichromatic measurement using a reference wavelength of 600–690 nm is recommended.

**The developed colour is stable for at least 60 minutes. Read optical densities during this time.**

## 10. Results and Interpretation

### Example:

	OD 450 nm	corrected OD	Mean OD Value
Blank	0.016		
Calibrator 1	0.037/0.045	0.021/0.029	0.025
Calibrator 2	0.072/0.063	0.056/0.047	0.052
Calibrator 3	0.376/0.386	0.360/0.370	0.365
Calibrator 4	1.480/1.461	1.464/1.445	1.455
Calibrator 5	2.149/2.126	2.133/2.110	2.122

The table above should be considered as an example which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. **These data do NOT describe reference values which have to be found in other laboratories in the same way!**

### 10.1 Quantitative Calculation

The ready to use calibrators of the MASTAZYME™ DIPHTERIA are defined and values expressed in International Units (IU/mL). This gives access to an exact and reproducible quantification and in consequence patient antibody titer monitoring is possible. Concentration values for calibrators are printed on the labels of the vials.

A standard curve is plotted by entering the mean absorbance value of the calibrators on the Y-axis and the corresponding concentration on the X-axis using graph paper. The concentration of the patient samples can then be read directly from the graph.

The calculation of the result can be performed using a computer and a suitable software program.

#### Interpretation:

< 0.01 IU/mL	Basic vaccination recommended
0.01–0.1 IU/mL	Booster vaccination recommended
> 0.1 IU/mL	Good Immunity

## 11. Assay Performance

The assay characteristics of the MASTAZYME™ DIPHTHERIA have been established and assessed according to the European IVD directive. Detailed validation data can be provided on special request.

## 12. References

1. Borcic, B et al. Immunity to diphtheria in the Croatian population in 1994. *Lijec. Vjesn.*, 118: 227 (1996).
2. CDC. Diphtheria Epidemic – New Independent States of the Former Soviet Union. 1990-1994; *MMWR* 44: 177 (1995).
3. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Biological Products; Bacterial Vaccines and Toxoids; Implementation of Efficacy Review; Proposed Rule. *Federal Register* Vol 50 (240): 51002 (1985).
4. Frank, JW et al. Diphtheria overimmunization in children. *Can. Med. Assoc. J.* 141: 1241 (1989).
5. Gupta, RK et al. Diphtheria antitoxin levels in blood and plasma donors. *J. Infect. Dis.* 173: 1493 (1996).
6. Kjeldsen, K et al. Immunity against diphtheria and tetanus in the age group 30-70 years. *Scand. J. Infect. Dis.* 20: 177 (1988).
7. Lau, RC. Detection of diphtheria toxin antibodies in human sera by ELISA. *J. Hyg.* 96: 415 (1986).
8. Mueller, JH et al. Production of diphtheria toxin of high potency (100 Lf) on a reproducible medium. *J. Immunol.* 40: 21 (1941).
9. Melville-Smith, M et al. Estimation of diphtheria antitoxin in human sera by ELISA. *J. Med. Microbiol.* 25: 279 (1988).
10. Nosov, SD. *Infectious Diseases of Childhood*, 2. Auflage; Mir Publishers, Moskau, 61 (1984).
11. Recommendations of the Advisory Committee of Immunization Practices (ACIP). Diphtheria, Tetanus, and Pertussis: Recommendations for vaccine use and other preventive measures; *MMWR* 40: 10 (1991).
12. Rieger, J et al. Diphtheria immunity in the German population; *Gesundheitswesen* 56: 667 (1994).



<b>Sommaire</b>	<b>Page</b>
1. Domaine d'utilisation	18
2. Introduction	18
3. Principe du test	18
4. Composition du coffret	19
5. Matériel nécessaire mais non fourni	20
6. Précautions d'utilisation	20
7. Conservation et stabilité	20
8. Prélèvement et transport des échantillons	21
9. Procédure ELISA	21
10. Résultats et interprétation	22
11. Performances du test	23
12. Bibliographie	23

## 1. Domaine d'utilisation

MASTAZYME™ DIPHTHERIA a été conçu pour la détection et la quantification des anticorps IgG dirigés contre la toxine de *Corynebacterium diphtheriae* dans le sérum et le plasma. Des applications supplémentaires sur d'autres prélèvements biologiques sont possibles et peuvent être fournies sur demande.

Diagnostic *in vitro* uniquement.

Tous les résultats d'analyses doivent être interprétés en conjonction avec les données cliniques. Le tableau clinique et les tests supplémentaires doivent également être pris en compte.

## 2. Introduction

La diphtérie est une infection bactérienne qui apparaît surtout dans l'enfance. La maladie conduit particulièrement à une inflammation du pharynx, du larynx et de la muqueuse nasale. De plus, les toxines bactériennes produites provoquent à long terme des dommages sur le cœur, le système circulatoire et le système nerveux central. Seules les souches toxigènes sont pathogènes.

L'agent étiologique est *Corynebacterium diphtheriae*. La bactérie Gram positive préfère une atmosphère microaérophile plutôt qu'anaérobie. Sa pathogénicité est basée sur la sécrétion d'une exotoxine circulant dans le sang et agissant sur le muscle cardiaque, les reins et le système nerveux central. La toxine diphtérique est produite par des souches lysogéniques.

En fonction du stade de la maladie, on distingue le type léger, moyen ou sévère. La source naturelle de l'infection est un individu malade sans symptômes. L'infection se propage via les microgouttes de l'air et plus rarement par le lait contaminé ou des souillures. L'apparition de la diphtérie est saisonnière avec une incidence maximale pendant l'hiver. Les enfants non vaccinés risquent particulièrement d'être infectés. La durée d'incubation dépend du nombre de germes invasifs.

L'infection se situe dans la muqueuse du système respiratoire où une infection aiguë locale se développe. La toxine sécrétée conduit à une inflammation superficielle de la muqueuse avec la formation d'un film marron (pseudo-membrane) constitué de bactéries, de cellules épithéliales nécrotiques, de fibrine, de globules rouges et blancs. A partir de cette inflammation locale, la toxine gagne d'autres organes via la circulation sanguine et lymphatique. A ce stade, elle peut provoquer des dommages importants. Le degré de la maladie dépend de l'état immunologique de l'enfant. En général, la diphtérie est limitée sauf en cas d'immunodépression où elle devient sévère. Dans ce cas, la maladie peut entraîner la mort du patient.

Dans la majorité des cas, les enfants sont vaccinés (DPT: Diphtérie, Tétanos, Polio) au cours des trois premiers mois de la vie. L'état immunitaire peut être suivi en déterminant les anticorps IgG dirigés contre la toxine.

## 3. Principe du test

Le principe du test peut être résumé en quatre étapes.

### 3.1 Incubation des sérums

Les anticorps spécifiques se lient aux antigènes adsorbés sur la phase solide pour former des complexes immuns stables. Après une incubation de 60 minutes à température ambiante, les puits sont lavés avec la solution de lavage prédiluée afin d'éliminer les composants non liés du sérum.

### 3.2 Incubation du conjugué

Le conjugué anti-human-IgG marqué à la peroxydase du Raifort est ajouté dans tous les puits. Il se lie aux anticorps IgG des complexes immuns adsorbés sur la phase solide. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le conjugué en excès est éliminé par lavage de tous les puits avec la solution de lavage.

### 3.3 Réaction du substrat et de la solution stop

Le substrat TMB est déposé dans tous les puits et le développement de la réaction donne une coloration stable bleu. Le développement de la réaction est stoppée après 20 minutes d'incubation à température ambiante par ajout d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.5 M dans chaque puits. La variation de pH provoque un changement de couleur du bleu au jaune.

### 3.4 Lecture et interprétation

L'intensité de coloration est lue à l'aide d'un lecteur de microplaques à 450 nm (filtre de référence recommandé pour la lecture bichromatique: 600–690 nm). L'intensité de coloration (DO) est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps spécifiques présents dans le sérum du patient.

## 4. Composition du coffret

Le coffret contient les réactifs nécessaires et suffisants pour 12 x 8 = 96 déterminations. Les barrettes et les solutions doivent être stockées à 2–8 °C. La date de péremption est inscrite sur les étiquettes.

12 barrettes Barrettes de microtitration Barrettes sécables de 8 puits sensibilisés avec la toxine purifiée de *Corynebacterium diphtheriae*.

1 x Cadre de microplaque

5 x 2 mL Calibrateurs 1–5 Sérums humains contenant des anticorps anti-toxine diphtérique (concentrations ci-dessous) dilués dans du PBS et stabilisés avec 0.01 % de méthylisothiazolone et 0.01 % de bromonitrodioxane comme conservateurs, prêts à l'emploi.

		IgG
Calibrateur 1	Concentration (U/mL)	0
Calibrateur 2		0.01
Calibrateur 3		0.1
Calibrateur 4		0.5
Calibrateur 5		1.0

L'IgG est calibré avec la préparation de référence de l'OMS 00/456. La concentration est en UI/ml.

1 x 60 mL Diluant des sérums Solution tampon PBS/BSA, contient < 0.1 % d'azoture de sodium comme conservateur, prêt à l'emploi.

1 x 12 mL Conjugué Conjugué HRP de chèvre anti-IgG humaines, prêt à l'emploi.

1 x 12 mL Substrat TMB 3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine, prêt à l'emploi.

1 x 12 mL Solution Stop Acide sulfurique 0.5 M, prêt à l'emploi.

1 x 60 mL Solution de lavage concentrée 10 x Solution tampon PBS/Tween concentrée 10 x à diluer au 1:10 avant utilisation; la solution concentrée peut être chauffée à 37 °C pour éviter la formation de cristaux.

2 x Films adhésifs pour couvrir les barrettes de la microplaque pendant les incubations.

1 x Sac plastique refermable pour éviter l'humidité sur les barrettes non utilisées.

## 5. Matériel nécessaire mais non fourni

- Micropipettes et pipettes multicanaux de 5 µL, 100 µL et 500 µL
- Lecteur de microplaques avec filtre à 450 nm (filtre de référence 600–690 nm)
- Laveur automatique de microplaques (en cas de lavage manuel: pissette)
- Tubes pour la dilution des sérums
- Cylindre de mesure
- Eau distillée ou ultra pure

## 6. Précautions d'utilisation

- Usage *in vitro* uniquement! Ne pas ingérer ou avaler ! les mesures de sécurité du laboratoire doivent être suivies. Ne pas manger, boire ou fumer dans le laboratoire.
- Tous les sérums et réactifs inclus dans le coffret ont été trouvés négatifs pour l'antigène Hbs, le VIH et le VHC. Cependant, des précautions telles que le port de gants doivent être prises.
- Si des sérums ou des réactifs sont renversés, nettoyer la surface avec une solution désinfectante (ex: eau de Javel à 5 %) puis jeter dans des récipients adaptés.
- Tous les réactifs doivent être ramenés à température ambiante (18–24 °C) avant de commencer le test.
- Avant de pipeter, tous les réactifs doivent être mélangés doucement en les inclinant ou en les retournant doucement. Eviter la formation de mousse par des mélanges trop vigoureux.
- Il est important de distribuer les réactifs avec des intervalles de temps constants pour que tous les puits de la microplaques soient dans les mêmes conditions.
- Veillez à ne pas contaminer les bouchons des flacons de réactifs Eviter les risques de mélange des réactifs. Le contenu des flacons est souvent sensible à l'oxydation, ils doivent donc rester ouverts le moins longtemps possible.
- Changer d'embouts de pipette entre chaque réactif ou sérum afin d'éviter les contaminations.
- Ne pas échanger les réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser le coffret au delà de la date de péremption.
- Selon les Bonnes Pratiques de Laboratoires ou la norme ISO 9001 tous les matériels de laboratoire utilisés doivent être vérifiés régulièrement pour l'exactitude et la précision. Ceci comprend, les micropipettes et l'instrumentation ELISA telle que le lecteur et le laveur.
- Eviter le contact de la solution stop et du substrat avec la peau, les yeux et les muqueuses car ils peuvent provoquer des irritations ou des brûlures acides. De plus, il existe un risque d'intoxication.

## 7. Conservation et stabilité

Conserver tous les réactifs à 2–8 °C.

La date de péremption de chaque réactif est imprimée sur son étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date de péremption.

La solution de lavage diluée est stable 4 semaines à 2–8 °C.

Une fois ouvert le kit doit être utilisé dans les 3 mois.

## 8. Prélèvement et transport des échantillons

Le sérum ou le plasma (EDTA, héparine) peuvent être utilisés pour le test. Prélever le sang aseptiquement puis séparer le sérum par centrifugation après coagulation. Les échantillons de sérum ou de plasma peuvent être conservés pendant 3 jours à 2–8 °C. Ils doivent être conservés à -20 °C pour des durées plus longues. Les échantillons ne doivent pas être congelés et décongelés de façon répétée. Les échantillons hyperlipidiques, hémolysés ou contaminés peuvent donner des résultats faussement négatifs ou positifs.

Les échantillons de sérum doivent être prédilués au 1:101 dans le diluant des sérums (ex: 5 µL de sérum + 500 µL de diluant des sérums) avant le test.

Les échantillons ayant des concentrations supérieures au plus fort calibrateur doivent être redilués dans le diluant des sérums.

En cas d'interférences avec le facteur rhumatoïde, il est conseillé d'adsorber les échantillons avec l'adsorbant (MASTSORB Code: 651003). **Ne pas adsorber les calibrateurs.**

## 9. Procédure ELISA

### 9.1. Préparation des réactifs

**Ramener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (18-24°C) avant utilisation et bien les mélanger.**

**Solution de lavage:** Dissoudre les éventuels cristaux en chauffant à 37 °C et bien mélanger.

Diluer la solution de lavage concentrée au 1:10 avec de l'eau distillée (ex: 60 mL de solution de lavage concentrée + 540 mL d'eau distillée). Mélanger minutieusement

- Suivre strictement les instructions pour obtenir de bons résultats. Tous changements ou modifications sont sous la responsabilité de l'utilisateur.
- Tous les réactifs et les échantillons doivent être ramenés à température ambiante avant utilisation, mais ne doivent pas rester à cette température plus longtemps que nécessaire.
- Une courbe étalon doit être réalisée pour chaque test.
- Conserver les barrettes non utilisées dans leur sac plastique à 2–8 °C.

### 9.2. Test ELISA

Préparer la quantité suffisante de puits pour les calibrateurs, les contrôles et les échantillons.

**Remarque :** **D'autres conditions d'incubation peuvent être utilisées. En cas de modifications dans la procédure du test (ex: incubation à 37 °C au lieu de la température ambiante) l'utilisateur doit valider les performances du test.**

1. Déposer 100 µL de chaque échantillon dilué (1:101) et de chaque calibrateur prêt à l'emploi dans les puits appropriés.
2. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incuber à température ambiante pendant 60 minutes.
3. Éliminer le contenu des puits et laver 3 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Ensuite, éliminer les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.
4. Déposer 100 µL de conjugué dans chaque puits.
5. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incuber à température ambiante pendant 30 minutes.
6. Éliminer le contenu des puits et laver 3 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Ensuite, éliminer les résidus de solution de lavage au fond des puits en tapant doucement la microplaque sur du papier absorbant.

7. Distribuer 100 µL de substrat dans tous les puits.
8. Recouvrir la microplaque avec le film adhésif fourni et incubé pendant 20 minutes dans le noir (ex: dans un tiroir) à température ambiante.
9. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt dans chaque puits.
10. Mélanger doucement, essuyer le dessous de la microplaque et lire la densité optique à 450 nm. Calculer les résultats. Blanc contre l'air. Une lecture bichromatique utilisant un filtre de référence à 600–690 nm est recommandée.

**La couleur est stable pendant au moins 60 minutes. Lire les densités optiques dans cet intervalle de temps.**

## 10. Résultats et interprétation

### Exemple

	DO 450 nm	DO nettes	DO moyennes
Blanc	0.016		
Calibrateur 1	0.037 / 0.045	0.021 / 0.029	0.025
Calibrateur 2	0.072 / 0.063	0.056 / 0.047	0.052
Calibrateur 3	0.376 / 0.386	0.360 / 0.370	0.365
Calibrateur 4	1.480 / 1.461	1.464 / 1.445	1.455
Calibrateur 5	2.149 / 2.126	2.133 / 2.110	2.122

Le tableau ci-dessus doit être considéré comme un exemple obtenu dans des conditions arbitraires de température et d'environnement. Il ne s'agit pas des valeurs de référence à retrouver par d'autres laboratoires dans les mêmes conditions!

### 10.1 Résultats quantitatifs

Les calibrateurs prêts à l'emploi du coffret MASTAZYME™ DIPHTERIA sont définis et les valeurs sont exprimées en unités internationales (UI/ml) pour les IgG. Les calibrateurs ont été calibrés avec la préparation de référence de l'OMS WHO 00/456. Ceci donne accès à une quantification exacte et reproductible et par conséquent, le titre en anticorps des patients peut être suivi.

Tracer la courbe étalon en reportant la DO moyenne de chaque calibrateur sur l'axe des Y et la concentration correspondante sur l'axe des X en utilisant du papier millimétré. Les concentrations des échantillons peuvent facilement être lues directement sur la courbe.

Le calcul des résultats peut aussi être réalisé avec un ordinateur et un logiciel adapté.

Pour les IgG, les résultats de chaque patient peuvent être évalués de la façon suivante:

< 0.01 IU/mL	Vaccination de base recommandée
0.01–0.1 IU/mL	Vaccination de rappel recommandée
> 0.1 IU/mL	Bonne immunité

## 11. Performances du test

Les caractéristiques du test MASTAZYME™ DIPHTHERIA ont été établies et évaluées en accord avec la directive Européenne de Diagnostic In Vitro. Les données de la validation peuvent être obtenue sur demande spéciale.

## 12. Bibliographie

1. Borcic, B et al. Immunity to diphtheria in the Croatian population in 1994. *Lijec. Vjesn.*, 118: 227 (1996).
2. CDC. Diphtheria Epidemic – New Independent States of the Former Soviet Union. 1990-1994; *MMWR* 44: 177 (1995).
3. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Biological Products; Bacterial Vaccines and Toxoids; Implementation of Efficacy Review; Proposed Rule. *Federal Register* Vol 50 (240): 51002 (1985).
4. Frank, JW et al. Diphtheria overimmunization in children. *Can. Med. Assoc. J.* 141: 1241 (1989).
5. Gupta, RK et al. Diphtheria antitoxin levels in blood and plasma donors. *J. Infect. Dis.* 173: 1493 (1996).
6. Kjeldsen, K et al. Immunity against diphtheria and tetanus in the age group 30-70 years. *Scand. J. Infect. Dis.* 20: 177 (1988).
7. Lau, RC. Detection of diphtheria toxin antibodies in human sera by ELISA. *J. Hyg.* 96: 415 (1986).
8. Mueller, JH et al. Production of diphtheria toxin of high potency (100 Lf) on a reproducible medium. *J. Immunol.* 40: 21 (1941).
9. Melville-Smith, M et al. Estimation of diphtheria antitoxin in human sera by ELISA. *J. Med. Microbiol.* 25: 279 (1988).
10. Nosov, SD. *Infectious Diseases of Childhood*, 2. Auflage; Mir Publishers, Moskau, 61 (1984).
11. Recommendations of the Advisory Committee of Immunization Practices (ACIP). Diphtheria, Tetanus, and Pertussis: Recommendations for vaccine use and other preventive measures; *MMWR* 40: 10 (1991).
12. Rieger, J et al. Diphtheria immunity in the German population; *Gesundheitswesen* 56: 667 (1994).

**Hersteller / Manufactured by:**  
**Fabriqué par:**

**MAST DIAGNOSTICA**  
Laboratoriumspräparate GmbH  
Feldstraße 20, D-23858 Reinfeld  
Deutschland  
Tel.: +49 4533 2007-0  
Fax: +49 4533 2007-68  
www.mastgrp.com  
mast@mast-diagnostica.de

**Distributed by:**

**MAST GROUP Ltd.**  
MAST House, Derby Road, Bootle  
UK-Mersey Side L20 1EA  
Great Britain  
Phone: +44 151 933 7277  
Fax: +44 151 944 1332  
www.mastgrp.com  
sales@mastgrp.com

**Distribué par:**

**MAST DIAGNOSTIC**  
115, Rue Jules Barni  
80000 Amiens  
France  
Tél.: + 33 3 22 80 80 67  
Fax: + 33 3 22 80 99 22  
www.mastgrp.com  
service-commercial@mast-diagnostic.fr