

## **RIDASCREEN<sup>®</sup> Diphtherie IgG**

Enzymimmunoassay zum Nachweis von  
IgG-Antikörpern gegen Diphtherietoxoid in Serum

Enzyme immunoassay for the detection of  
IgG antibodies against diphtheria toxoid in serum

Art. No.: K 3821

In vitro Test  
Lagerung bei 2 - 8 °C  
Storage at 2 - 8 °C

**Anschrift:**

R-Biopharm GmbH  
Dolivostr. 10  
D-64293 Darmstadt

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

**Telefon:**

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0  
Sekretariat Marketing (0 61 51) 81 02-23

**Telefax:**

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20  
Marketing (0 61 51) 81 02-40

RIDA® und RIDASCREEN®  
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm GmbH  
Hersteller: R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Deutschland

RIDA® and RIDASCREEN®  
are registered trademarks of R-Biopharm GmbH  
Manufacturer: R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany

**Inhaltsverzeichnis**

	Seite
1. Allgemeines.....	4
2. Einleitung.....	4
3. Testprinzip.....	5
4. Packungsinhalt.....	6
5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör.....	6
6. Vorsichtsmaßnahmen.....	7
7. Reagenzien und ihre Lagerung.....	7
8. Anzeichen für Reagenzienverfall.....	8
9. Sammlung und Lagerung der Proben.....	8
10. Testdurchführung.....	8
11. Auswertung.....	11
12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation.....	13

**Contents**

	page
1. Intended use.....	14
2. General.....	14
3. Test principle.....	15
4. Reagents provided.....	16
5. Materials required but not provided.....	16
6. Warnings and precautions for the users.....	17
7. Storage instructions.....	17
8. Indication of instability or deterioration of reagents.....	18
9. Specimen collection and storage.....	18
10. Test procedure.....	18
11. Analysis.....	21
12. Remarks about the test procedure and interpretation.....	23

**Appendix**

Literature.....	23
-----------------	----

## 1. Allgemeines

Der RIDASCREEN® Diphtherie IgG-Test ist ein Enzymimmunoassay (EIA) zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das Diphtherietoxoid in humanem Serum.

## 2. Einleitung

Das Krankheitsbild der Diphtherie wird durch *Corynebacterium diphtheriae* verursacht. Dieses Bakterium ist ein grampositives, an den Enden oft verdicktes Stäbchen. Die Länge beträgt 2 - 6 µm und der Durchmesser liegt bei 0,5 - 1 µm. Typisch ist eine V-, Y- oder Pallisaden-artige Anordnung der Stäbchen. Ein markantes Zeichen bei der selektiven Anzucht auf tellurithaltigen Medien ist zudem eine Schwarzfärbung der Kolonien, die durch Reduktion des Tellursalzes zu metallischem Tellur entsteht.

Die Pathogenität von *C. diphtheriae* wird durch ein Exotoxin verursacht, dessen Gen in einem Prophagen lokalisiert ist. Das Toxin ist ein 62 kd großes Polypeptid, das aus zwei funktionell unterschiedlichen Fragmenten besteht. Über das Fragment B bindet das Toxin an Rezeptoren der Zielzellen und wird in diese aufgenommen. In der Zelle blockiert dann das Fragment A irreversibel die Proteinbiosynthese.

Bei der Diphtherie werden zwei Verlaufsformen unterschieden, die lokale Infektion und die primär systemische Intoxikation. Bei lokalem Verlauf werden vorwiegend die Schleimhäute im Mund- und Rachenraum infiziert. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis fünf Tagen entwickeln sich zunächst uncharakteristische Symptome wie Kopfschmerz, Abgeschlagenheit, Schluckbeschwerden und mäßiges Fieber. Der Rachen ist gerötet, und infolge der Läsionen am Infektionsort entwickeln sich flächige Pseudomembranen. Diese können sich auf den Kehlkopf ausdehnen, wodurch ein Krupp mit unterschiedlich ausgeprägter Atemnot bis hin zu schwersten Erstickungsanfällen entsteht. Selten können bei lokalem Infektionsverlauf auch Nasenschleimhäute, Konjunktiven oder Vulva infiziert sein. Bei Neugeborenen kann es zudem zur Nabeldiphtherie sowie bei Erwachsenen zur Wunddiphtherie kommen. Bei systemischer Intoxikation kommt es zu einem fulminanten Verlauf der Diphtherie. Die Lokalbefunde im Rachen sind deutlich ausgeprägter. Durch Wirkung des Toxins auf periphere Nerven und Herz kommt es zu Lähmungserscheinungen und schwersten Kreislaufbeschwerden. Aufgrund der Schädigung des Herzmuskels kann es zum plötzlichen Herztod kommen (Frühtod am 5. - 6. Krankheitstag). Aber auch in der Rekonvaleszenz ist noch mit einem Herzversagen zu rechnen.

Zur Therapie wird möglichst frühzeitig ein Antiserum gegen das Toxin injiziert. Zur Unterstützung werden Antibiotika gegeben. Eine alleinige Antibiotikatherapie ist jedoch nicht ausreichend. Bei lokalem Verlauf kommt es nach Injektion des Antiserums meist zur raschen Besserung. Bei systemischer Intoxikation ist jedoch trotz Verabreichung des Antiserums die Letalität hoch.

Die Diagnose wird anhand der klinischen Symptomatik und über den kulturellen Nachweis des Erregers erstellt.

Durch konsequente Impfung bereits im Säuglingsalter ist die Diphtherie eine seltene Erkrankung. Geimpft wird mit einem Toxoid, das durch Behandlung des Toxins mit Formaldehyd gewonnen wird. Dieses Toxoid hat die gleichen antigenen Eigenschaften wie das Toxin, ohne jedoch toxisch zu wirken. IgG-Impftiter, aber auch die nach einer überstandenen Infektion vorhandenen Immunglobuline können somit in einem ELISA auf Toxoidbasis, wie dem RIDASCREEN® Diphtherie IgG EIA, nachgewiesen werden. Durch Anpassung an internationale Einheiten ist die Vergleichbarkeit gemessener Werte gewährleistet.

## 3. Testprinzip

An die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterstreifen ist Diphtherietoxoid gebunden. In diese Vertiefungen werden verdünnte Patientenproben sowie die Kontrollen pipettiert und bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dabei binden vorhandene Antikörper an das immobilisierte Antigen. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt.

Danach erfolgt die Zugabe eines Peroxidase-konjugierten Anti-human-Antikörpers (anti-IgG). Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe von Substrat, das bei positiven Proben durch gebundenes Enzym zur Entwicklung einer blauen Farbe führt. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Stopp-Reagenz beendet. Dabei erfolgt gleichzeitig ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die abschließende Messung erfolgt in einem Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge  $\geq 620$  nm).

#### 4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.  
Jeder Reagenziensatz enthält:

- 1 x 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) mit je 8 Vertiefungen im Halterahmen;  
beschichtet mit Diphtherietoxoid;  
in verschließbarem Alu-Beutel
- 1 x RIDASCREEN® SeroPP (110 ml);  
Probenpuffer, gebrauchsfertig;  
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroWP (100 ml, 10fach konz.);  
Waschpuffer, enthält 0,2 % Bronidox-L
- 1 x Standardkontrolle IgG (2,5 ml);  
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;  
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x Negativkontrolle (1,2 ml);  
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;  
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroG HD (12 ml);  
Anti-human-IgG-Konjugat;  
Peroxidase-markierter Antikörper (Kaninchen);  
gebrauchsfertig
- 1 x RIDASCREEN® SeroSC (12 ml);  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig
- 1 x RIDASCREEN® SeroStopp (12 ml)  
1 N Schwefelsäure
- 1 x Gebrauchsanleitung

#### 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

##### 5.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

##### 5.2. Zubehör

- Probenröhrchen
- Vortex Mixer
- Mikropipetten für 10 - 100 µl und 1 ml Volumina
- Meßzylinder (1000 ml)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter ≥ 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)

#### 6. Vorsichtsmaßnahmen

Die im Kit befindlichen Kontrollseren (Standardkontrolle und Negativkontrolle) wurden auf HIV- und HCV-Ak sowie HBsAg untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten sie, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen behandelt werden.

Standardkontrolle und Negativkontrolle, sowie der Probenpuffer enthalten als Konservierungsmittel 0,01 % Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Der Waschpuffer enthält 0,2 % Bronidox-L als Konservierungsmittel. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Wasserstoffperoxid kann zu Verätzungen führen. Vorsichtig handhaben!

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure. Hautkontakt sowie Kontakt mit Kleidung vermeiden!

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

Ein Austausch der Kontrollseren zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht möglich.

#### 7. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Der verdünnte Waschpuffer (RIDASCREEN® SeroWP) ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

Vor Verwendung sind die Reagenzien und die Mikrotiterstreifen auf Raumtemperatur zu bringen. Zur Vermeidung von Kondenswasser in den Streifen sind diese erst nach Erreichen der Raumtemperatur ihrer Verpackung zu entnehmen. Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, daß der Klippverschluß nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.

Eine Kontamination des Substrates (RIDASCREEN® SeroSC) mit der Konjugatlösung ist unbedingt zu vermeiden, da diese eine Verfärbung des Substrates zur Folge hat. Ebenso ist eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

## 8. Anzeichen für Reagenzienverfall

Folgende Kriterien können einen Reagenzienverfall anzeigen:

- eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten
- ein Extinktionswert der Negativkontrolle bei 450/620 nm > 0,3
- ein Extinktionswert des Standardkontrollserums bei 450/620 nm außerhalb des im beigefügten Auswertebrett angegebenen Wertebereichs.

## 9. Sammlung und Lagerung der Proben

Der RIDASCREEN® Diphtherie IgG EIA ist für die Untersuchung humaner Serumproben entwickelt worden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben ist unbedingt zu vermeiden, ebenso mikrobielle Kontamination. Die Verwendung von Hitze inaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

Sollte die Bestimmung nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu einer Woche bei 2 - 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20 °C oder tiefer möglich.

Serumverdünnungen sind nicht länger als 7 Stunden bei 2 - 8 °C haltbar.

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Allgemeines

Einzelne der im vorliegenden Test verwendeten Reagenzien sind nicht kitspezifisch. Diese mit RIDASCREEN® Sero bezeichneten Reagenzien (SeroWP, SeroPP, SeroG HD, SeroSC, SeroStopp) können auch bei anderen RIDASCREEN® EIAs mit entsprechend deklarierten Reagenzien verwendet werden. Dies gilt nicht für die chargenspezifischen Kontrollseren.

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterstreifen für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur zu bringen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Reproduzierbare Ergebnisse hängen in starkem Maße vom genauen Pipettieren, Einhalten der Inkubationszeiten und -temperatur sowie vom gleichmäßigen Waschen der Mikrotiterstreifen ab. Eine Abweichung von den vorgegebenen Inkubationszeiten und Temperaturen führt zu einer übermäßigen Differenz der Standardkontrolle zum vorgegebenen Sollwert, welche nicht mehr von dem ermittelten Wertebereich abgedeckt wird.

Während des Waschens ist darauf zu achten, daß alle Vertiefungen mit Waschpuffer gefüllt werden, und daß zwischen den Waschschrritten keine Flüssigkeit in den Vertiefungen verbleibt. Zwischen den einzelnen Waschschrritten dürfen die Vertiefungen nicht austrocknen.

Direkte Sonneneinstrahlung ist während der Durchführung des Testes zu vermeiden. Es wird empfohlen die Mikrotiterplatte abzudecken.

Mit Ausnahme des Waschpuffers sind alle Reagenzien gebrauchsfertig.

### 10.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Puffer-Konzentrates (RIDASCREEN® SeroWP) wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Hierfür werden 100 ml des Puffer-Konzentrates in einen 1000 ml Standzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen. Der verdünnte Puffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

### 10.3. Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Serumproben werden vor Testbeginn mit dem Probenpuffer (RIDASCREEN® SeroPP) verdünnt.

Verdünnung der Serumproben 1:100:

z. B. 10 µl Serum + 990 µl Probenpuffer

### **Achtung!**

**Negativkontrolle und Standardkontrolle sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden.**

### 10.4. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden von den verdünnten Seren und gebrauchsfertigen Kontrollen jeweils 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert, die Position A1 (Reagenzienleerwert) bleibt frei. Die Negativkontrolle wird einfach und die Standardkontrolle doppelt mitgeführt. Die Platte wird 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dabei sollte der Boden der Kavitäten keinen Kontakt zu gut wärmeleitenden Materialien (Metall oder feuchtes Papier) haben.

A1	Reagenzienleerwert
B1	Negativkontrolle
C1	Standardkontrolle
D1	Standardkontrolle
E1, F1	Patientenserum 1, 2, usw.

### **Achtung!**

**Die ELISA-Platte darf nicht in ein kühles Inkubationsbehältnis gestellt werden, das sich erst während der Inkubation auf 37 °C erwärmt. Das Behältnis muß schon vorab an 37 °C adaptiert sein.**

## 10.5. Waschen

Die Kavitäten werden geleert und die Platte anschließend auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 4mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen zu sorgen.

**Bei Verwendung eines Waschautomaten ist auf die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Plattentyp zu achten.**

## 10.6. Zweite Inkubation

Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroG HD (Anti-*human-IgG*-Konjugat) in alle Vertiefungen (einschließlich A1). Anschließend wird die Platte für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

## 10.7. Waschen

4maliges Waschen gemäß Pkt. 10.5.

## 10.8. Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroSC in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroStopp in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion in einem Plattenphotometer bei 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge  $\geq$  620 nm). Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen den Reagenzienleerwert (Position A1).

### **Achtung:**

**Zur Entfernung von Kondenswasser muß die Unterseite der Mikrotiterplatte vor der Messung abgewischt werden.**

## **Zusammenfassung der Testdurchführung**

1. Reagenzien auf Raumtemperatur bringen
2. Verdünnung des RIDASCREEN® SeroWP
3. Herstellung der Serumverdünnungen
4. Pipettieren von 100 µl Standardkontrolle und Negativkontrolle bzw. Probe in die Mikrotiterstreifen; 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer
5. Entleerung der Kavitäten; anschließend 4maliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer
6. Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroG HD; 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer
7. Entleerung der Kavitäten; anschließend 4maliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer
8. Zugabe von je 100 µl RIDASCREEN® SeroSC; 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer
9. Nach Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroStopp photometrische Auswertung bei 450 nm (Referenzwellenlänge  $\geq$  620 nm)

## **11. Auswertung**

Die Auswertung des Tests kann auf drei unterschiedliche Arten durchgeführt werden:

1. über die beiliegende Standardkurve
2. über die Wertetabelle (siehe beiliegendes Datenblatt)
3. mathematisch nach der 4-Parameter-Auswertung oder der  $\alpha$ -Methode

**Von allen Extinktionswerten muß vor der Auswertung der Reagenzienleerwert abgezogen werden.**

### 11.1. Qualitätskontrolle

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Standardkontrolle (Doppelbestimmung) und Negativkontrolle mitzuführen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle bei 450/620 nm in dem Wertebereich liegt, der auf dem beigefügten Datenblatt angegeben ist. Weichen die beiden Einzelmessungen um mehr als 20 % vom Mittelwert ab, muß der Test wiederholt werden. Die Negativkontrolle muß bei 450/620 nm einen Extinktionswert  $< 0,3$  aufweisen.

### 11.2. Auswertung über die Standardkurve

Um eine Auswertung mittels Standardkurve durchzuführen, muß zunächst über den Mittelwert der Standardkontrolle (siehe auch Pkt. 11.1.) eine Korrektur der Tagesschwankung vorgenommen werden. Aus dem Sollwert der Standardkontrolle und dem aktuell gemessenen Wert der Kontrolle wird der Korrekturfaktor F berechnet. Der chargenabhängige Sollwert ist auf dem beiliegenden Datenblatt vermerkt.

$$F = \frac{\text{Sollwert der Standardkontrolle}}{\text{Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle}}$$

Mit dem Faktor F werden alle OD-Werte der Proben multipliziert. Mit diesen korrigierten Werten wird dann der entsprechende Unit-Wert in der Standardkurve abgelesen.

### 11.3. Auswertung über die Wertetabelle

Der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle (siehe auch Pkt. 11.1.) bestimmt in der Wertetabelle die Spalte mit dem Wertebereich, der für die aktuelle Messung gültig ist. Innerhalb der Spalte wird der gemessene Extinktionswert der Probe dem passenden Extinktionsbereich zugeordnet und in der zweiten Spalte von links der entsprechende Titer in Units/ml abgelesen.

IUnits/ml	Wertebereich der Standardkontrolle	
		0,77 - 0,81
< 0,10	< 0,10	
0,10 - 0,29	0,10 - 0,22	
0,30 - 0,49	0,23 - 0,35	
0,50 - 0,99	0,36 - 0,64	
1,00 - 1,49	0,65 - 0,91	
1,50 - 2,00	0,92 - 1,13	
> 2,00	> 1,13	

Abb. 1: Beispiel (Auszug aus einem chargenspezifischen Datenblatt)

Der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle beträgt beispielsweise bei einer Messung 0,81. In diesem Fall ist für die Ermittlung des Ergebnisses die Spalte mit dem Bereich 0,77 bis 0,81 aus der Tabelle entscheidend. Eine Patientenprobe mit einem Extinktionswert von 0,41 liegt dann einem Titer-Bereich von 0,50 bis 0,99

IUnits/ml. (Die genannten Werte sind als Beispiel zu sehen und können von den aktuellen Werten des Datenblattes abweichen.)

### 11.4. Mathematische Auswertung

Die benötigten Werte für eine mathematische Auswertung nach der 4-Parameter-Auswertung oder der  $\alpha$ -Methode sind auf dem beiliegenden Datenblatt vermerkt. Bei Fragen zur Anpassung des EIAs an Laborgeräte sowie zur mathematischen Auswertung stehen wir Ihnen gerne jederzeit unter folgender Rufnummer zur Verfügung: 0 61 51 / 81 02-0.

### 11.5. Testergebnis

IU/ml	empfohlene Impfung
< 0,1	Grundimmunisierung
0,1 - 0,9	Auffrischimpfung
1,0 - 1,4	Auffrischimpfung nach 5 Jahren
1,5 - 2,0	Auffrischimpfung nach 7 Jahren
> 2,0	Auffrischimpfung nach 10 Jahren

## 12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation

Die in Pkt. 11.5. gemachten Angaben orientieren sich an einer Publikation von Pietsch aus dem Jahre 1993. Der Autor geht davon aus, daß ab einem Wert von 0,1 IU/ml (internationale Einheiten pro ml) von einem Immunschutz ausgegangen werden kann, der aber erst ab 1,0 IU/ml ausreichend ist. Bei Titern kleiner 0,1 sollte eine Grundimmunisierung vorgenommen werden.

## RIDASCREEN® Diphtherie IgG

Enzyme immunoassay for the detection of IgG antibodies against diphtheria toxoid in serum

### 1. Intended use

The RIDASCREEN® Diphtherie test is an enzyme immunoassay (EIA) for the detection of IgG antibodies against diphtheria toxoid in human serum.

### 2. General

The symptoms of diphtheria are caused by *Corynebacterium diphtheriae*. This is a gram-positive, rod-shaped bacteria which is often thicker at the ends. The length is 2 - 6 µm and the diameter is 0.5 - 1 µm. Typically, the rods are arranged in V, Y or palisade formation. A characteristic feature during selective culture on tellurite-containing media is the blackening of the colonies caused by the reduction of the telluric salt to metallic tellurium.

The pathogenic behavior of *C. diphtheriae* is caused by an exotoxin, the gene for which is located in a prophage. The toxin is a 62 kilodalton polypeptide composed of two fragments of different functionality. The toxin bonds to receptors on the target cell via Fragment B and is absorbed into the cell. Once inside the cell, Fragment A blocks the synthesis of protein irreversibly.

Two courses of the infection can be distinguished for diphtheria: local infection and primary systemic intoxication. In the case of local infection, the mucous membranes of the mouth and throat are predominantly infected. After an incubation time of two to five days, uncharacteristic symptoms develop initially, such as headache, exhaustion, difficulty in swallowing and moderate fever. The throat reddens and flat pseudomembranes develop as a result of the lesions at the site of infection. These membranes may spread to the larynx resulting in a croup, with differing degrees of shortness of breath, and choking attacks in the most severe cases.

It is rarely found that the nasal mucous membranes, conjunctivas or vulva are infected during the course of local infection. Navel diphtheria can develop in the case of new-born children and wound diphtheria in the case of adults. Systemic intoxication results in fulminant diphtheria. The local symptoms in the throat are significantly more pronounced. Due to the effect of the toxin on peripheral nerves and heart, symptoms of paralysis develop and, in the most severe cases, circulatory distress. Cardiac death may occur suddenly as a result of damage to the cardiac muscle (early death on the fifth or sixth day of the disease). Heart failure can also be expected during the recovery period.

Therapy involves administration of an antiserum against the toxin by injection as early as possible and antibiotics. Administering antibiotics on their own, however, is not sufficient. When treating the local infection by administering the antiserum by injection, improvement is rapid in most cases. However, for systemic intoxication fatalities are high in spite of administering the antiserum.

The diagnosis is established from clinical symptoms and via cultural evidence of the pathogen.

Diphtheria is a rare disease owing to the consistent vaccination of infants. Vaccination is carried out using a toxoid obtained by treating the toxin with formaldehyde. This toxoid has the same antigenic properties as the toxin without the toxic effects. IgG vaccine titers, even the immunoglobulins present after recovery from an infection, can therefore be found in a toxoid-based ELISA, such as the RIDASCREEN® Diphtheria IgG EIA. Comparability of the measured values is ensured by matching to international units.

### 3. Test principle

Diphtheria toxoid is bound on the surface of the microtiter wells. Diluted serum samples and controls are pipetted into the wells and incubated at 37 °C in a humid chamber. Present antibodies bind to the immobilized antigen. Unbound material is removed in a washing step.

In a second step, a peroxidase-conjugated anti-human antibody (anti-IgG) is added. After incubation, unbound conjugate is removed by washing. Substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB) is added to the wells and incubated at 37 °C in a humid chamber. The enzyme bound in the wells converts the colorless substrate to a blue color. Addition of stop solution converts the color from blue to yellow. The absorption is measured at 450 nm wavelength (reference wavelength ≥ 620 nm).

#### 4. Reagents provided

The reagents in one package are sufficient for 96 determinations.  
Each test kit contains:

- 1x 12 Microwell Strips (breakable) with 8 wells each in a frame;  
coated with diphtheria toxoid;  
in a resealable foil bag
- 1 x RIDASCREEN® SeroPP (110 ml);  
Sample Diluent, ready to use;  
contains 0.01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroWP (100 ml, 10x conc.);  
Washing Buffer, contains 0.2 % Bronidox-L
- 1 x Standard Control (2.5 ml);  
diluted human serum, ready to use;  
contains 0.01 % Thimerosal
- 1 x Negative Control (1.2 ml);  
diluted human serum, ready to use;  
contains 0.01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroG HD (12 ml);  
Anti-human-IgG-Conjugate;  
peroxidase-conjugated antibody (rabbit);  
ready to use
- 1 x RIDASCREEN® SeroSC (12 ml);  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/tetramethylbenzidine (TMB), ready to use
- 1 x RIDASCREEN® SeroStopp (12 ml);  
1 M sulfuric acid
- 1 x Instructions for use

#### 5. Reagents required but not provided

##### 5.1 Reagents

- Distilled or deionized water

##### 5.2 Accessories

- Test tubes
- Vortex mixer
- Micropipets for volumes of 10 - 100 µl and 1 ml
- Microplate washer or multichannel pipet
- Microplate reader (450 nm, reference wavelength ≥ 620 nm)
- Absorbent paper

#### 6. Warnings and precautions for the users

The control sera (standard control and negative control) have been tested for HIV- and HCV-Ab as well as for HBsAg and were found to be negative. However, they as well as the patient samples should be considered potentially contagious and be treated with the necessary safety precautions.

The standard control and the negative control as well as the sample diluent contain 0.01 % Thimerosal. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.

The washing buffer contains Bronidox-L. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.

Hydrogen peroxide can cause cauterization. Handle with care!

The stop solution contains 1 N sulfuric acid. Avoid contact with skin and clothing!

All reagents and materials coming in contact with potential infectious specimens must be treated with disinfectants or autoclaved at 121 °C for at least one hour.

An exchange of the controls between kits of different lot numbers is not possible.

#### 7. Storage instructions

All reagents have to be stored at 2 - 8 °C and can be used up to the expiry date printed on the labels. Microbial contamination has to be avoided. A quality warranty cannot be given beyond the kit expiration date.

The diluted washing buffer (RIDASCREEN® SeroWP) can be used up to the expiry date printed on the labels if stored at 2 - 8 °C.

Allow reagents and microwell strips to get room temperature before use. To avoid moisture within the strips, do not take the strips out of the foil bag before having reached room temperature. The foil bag should be opened with a pair of scissors without detaching the fastener. Return any unused strips to the foil bag, reseal and store them directly at 2 - 8 °C.

It is absolutely necessary to avoid contamination of the substrate (RIDASCREEN® SeroSC) with the conjugate solution, since this results in a coloration of the substrate. In the same way, the colorless substrate must be protected from exposure to direct light to avoid deterioration or coloration by autoxidation. If the substrate has turned blue, the reagent should be discarded.

## 8. Indication of instability or deterioration of reagents

The following criteria may indicate a reagent deterioration:

- a turbidity or a blue coloration of the colorless substrate prior to its use
- an absorbance value of the negative control at 450/620 nm > 0.3
- an absorbance value of the positive control at 450/620 nm out of the values given in the attached tables of values

## 9. Specimen collection and storage

The RIDASCREEN® Diphtherie IgG EIA has been evaluated for the investigation of human serum samples. Repeated freezing and thawing of the samples as well as microbial contamination must be avoided. The application of heat treated, lipemic, hemolytic, icteric or turbid samples can lead to wrong results.

The sample material can be stored for up to 1 week at 2 - 8 °C if the test cannot be carried out immediately. A prolonged storage of samples is possible at -20 °C.

Diluted samples can be used for up to 7 hours if they have been stored at 2 - 8 °C.

## 10. Test procedure

### 10.1. Preliminary comments

The RIDASCREEN® EIAs for serological antibody detection contain some test independent reagents. These reagents are labeled RIDASCREEN® Sero (SeroWP, SeroPP, SeroG HD, SeroSC, SeroStopp). They are not kit specific and can be changed between single test kits with correspondingly labeled reagents. But, this is not valid for the controls.

Bring all reagents and the microwell strips to room temperature before use. Mix the reagents well before use. Reproducibility in any EIA depends on exact pipetting, the observance of incubation times and temperature and the consistency of wash sequences. A deviation from the given incubation times and temperatures leads to an excessive difference of the standard control serum to the given target value, which is no longer covered by the determined area of values. During the washing steps, take care that all wells are filled with buffer and that the liquid is completely removed from the wells. Do not allow microwells to dry between steps.

Avoid direct sunlight during all incubations. Covering the microtiter plate is recommended.

Except the washing buffer, all reagents are ready to use.

### 10.2. Preparation of the washing buffer

1 part of the concentrated washing buffer (RIDASCREEN® SeroWP) is diluted with 9 parts of distilled water. Crystals in the buffer concentrate can be dissolved in a waterbath at 37 °C. Add 100 ml of the concentrated washing buffer to a

1000 ml graduated cylinder. Bring the final volume to 1000 ml with distilled or deionized water. The diluted washing buffer can be used up to the expiry date printed on the labels if stored at 2 - 8 °C.

### 10.3. Preparation of the samples

Before starting the test, serum samples have to be diluted with the sample diluent (RIDASCREEN® SeroPP).

Dilution of the serum sample 1:100:

e.g. 10 µl serum + 990 µl sample diluent

#### **Attention!**

**Negative control and standard control are ready to use and must not be diluted.**

### 10.4. First incubation

After insertion of a sufficient number of cavities into the microwell holder, 100 µl of the diluted sera and ready to use controls are each added to the corresponding wells, the position A1 remains empty (blank). One negative control and two standard controls are carried along. The plate is incubated in a humid chamber at 37 °C for 30 min. The bottom of the cavities should not be in touch with materials that conduct temperature well (metal or wet paper).

A1	blank
B1	negative control
C1	standard control
D1	standard control
E1, F1	patient serum 1, 2, etc.

#### **Attention!**

**The ELISA plate should not be placed in a cold incubation container which is heated to 37 °C during the incubation. The container must already be adapted to 37 °C prior to the incubation.**

### 10.5. Washing

Decant or aspirate all microwells into a waste container with a disinfectant. Ensure complete removal of the liquid from the microwells by tapping the inverted plate onto absorbent paper. Then wash all wells 4 times with 300 µl of prepared washing buffer. Be sure to remove residual washing solution by firmly tapping the inverted microwells on absorbent paper after single washing steps.

**If a microplate washer is used, take care that the washer is adjusted to the used microplate type.**

## 10.6. Second incubation

Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroG HD (anti-*human-IgG*-conjugate) into each well (including A1). Incubate the plate for 30 min at 37 °C in a humid chamber.

## 10.7. Washing

Wash 4 times according to step 10.5.

## 10.8. Third incubation

Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroSC into each well. Incubate the plate for 30 min at 37 °C in a humid chamber. Following the incubation, the reaction is stopped by adding 100 µl of RIDASCREEN® SeroStopp to each well. After careful mixing (soft tapping on the edge of the plate) the absorbance is measured in a microplate reader at 450 nm (reference wavelength ≥ 620 nm). Correct for blank value against position A1.

### Remark:

**To remove moisture, wipe the bottom of the microplate before measuring.**

### Summary of the test procedure

1. Bring all reagents to room temperature
2. Dilute the RIDASCREEN® SeroWP
3. Dilute the serum samples
4. Pipet 100 µl of the standard control, the negative control or the diluted samples into the microwells; 30 minutes incubation at 37 °C in a humid chamber
5. Discard the incubate and wash 4 times with 300 µl of washing buffer
6. Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroG HD; 30 minutes incubation at 37 °C in a humid chamber
7. Discard the incubate and wash 4 times with 300 µl of washing buffer
8. Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroSC; 30 minutes incubation at 37 °C in a humid chamber
9. After addition of 100 µl RIDASCREEN® SeroStopp spectrophotometric determination at 450 nm (reference wavelength ≥ 620 nm)

## 11. Analysis

Analysis of the test can be done in three different ways:

1. using the standard curve enclosed
2. using the table of values (see data sheet enclosed)
3. mathematically by the 4-parameter calculation or the  $\alpha$ -method

**The blank (A1) must be subtracted from all OD values prior to the analysis.**

### 11.1. Quality control

For the quality control, standard control (double determination) and negative control must be carried along with each test procedure. The test was carried out correctly if the mean absorbance value of the standard control at 450/620 nm corresponds to the value range of the data sheet enclosed. If the single measurements diverge from the mean absorbance value more than 20 %, the test must be repeated. The negative control must show an absorbance value at 450/620 nm < 0.3.

### 11.2. Analysis with the standard curve

If the analysis is to be carried out with the standard curve, first the daily variation must be corrected by a double determination of the standard control (see also pt. 11.1.). The correction factor F is calculated with the given target value of the standard control and the actually measured standard control value. The Lot-dependent target value is given on the data sheet enclosed.

$$F = \frac{\text{target value of the standard control}}{\text{mean absorbance value of the standard control}}$$

All OD values of the samples are multiplied by the factor F. With these corrected values, the corresponding IUnit value is read from the standard curve.

### 11.3. Analysis with the table of values

The mean absorbance value of the standard control (see also pt. 11.1.) determines the column of the value range in the attached value table, which is decisive for the actual measurement. Within this column the measured absorbance value of the sample is classed to the suited absorbance range and the corresponding titer in IUnits/ml is read in the second column from the left.

IUnits/ml	range of standard control	
	0.77 - 0.81	
< 0.10	< 0.10	
0.10 - 0.29	0.10 - 0.22	
0.30 - 0.49	0.23 - 0.35	
0.50 - 0.99	0.36 - 0.64	
1.00 - 1.49	0.65 - 0.91	
1.50 - 2.00	0.92 - 1.13	
> 2.00	> 1.13	

Fig. 1: Example (Excerpt from a Lot dependent data sheet)

The mean absorbance value of the standard control in a measurement is 0.81 for example. In this case, the column with the value range from 0.77 to 0.81 is decisive for result determination. Then, a patient sample with an absorbance of 0.41 lies in a titer range from 0.50 to 0.99 IUnits/ml. (The foregoing values are an example and can differ from the actual values of the Lot-dependent data sheet.)

#### 11.4. Mathematical analysis

Needed values for a mathematical analysis by the 4-parameter calculation or the  $\alpha$ -method are given on the data sheet enclosed.

#### 11.5. Test result

IU/ml	recommended immunization
< 0.1	initial immunization
0.1 - 0.9	booster immunization
1.0 - 1.4	booster immunization in 5 years
1.5 - 2.0	booster immunization in 7 years
> 2.0	booster immunization in 10 years

## 12. Remarks about the test procedure and interpretation

The information under Section 11.5. is oriented towards a publication by Pietsch in 1993. The author assumed that immunization could start with a titer of 0.1 IU/ml (international units per ml), but would only be sufficient with titers greater than 1.0 IU/ml. Basic immunization should be carried out in the case of titers smaller than 0.1 IU/ml.

### Appendix

#### Literature

1. Naumann, P. und Nemes, G. (1982). Die Diphtherie und ihre aktuelle Bedeutung, Deutsches Ärzteblatt 51/52, S. 21-28
2. Naumann, P., Hagedorn, H.-J., Paatz, R. (1983), Diphtherie-Immunität und ihre epidemiologische Bedeutung, Dtsch. med. Wschr. 108, S. 1090-1096
3. Naumann, P., Paatz, R., und Thomas, L., Diphtherie-Adsorbat-Impfstoff für Erwachsene: Immunologische Wirksamkeit. Die gelben Hefte XXIV (1984), S. 109-115
4. Thilo, W., Farchim, F., Hölzer, E., Winkler, C., Sowa, W. und Kilias, F., Serologische Immunität gegen Diphtherie 1986, Z. Klin. Med. 42 (1987) Heft 20, S. 1807-1808
5. Krech, T., Naumann, P., Wittelbürger, Ch., Reinicke, H.H, Retgen, B., Jungnitz, Be., Watermann, R. (1987), Die Diphtherie, eine Importkrankheit, Dtsch. med. Wschr. 112, S. 541-544
6. Alexander, M. und Raettig, H.J., Infektionskrankheiten. Thieme Verlag Stuttgart, New York (1987)
7. Brandis, H., Pulverer, G., Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York (1988), 6. Auflage
8. Naumann, P. und Weber, H.G.: Diphtherie Immunität bei Schulanfängern und nach Wiederimpfung mit d-Impfstoff, Dtsch. med.Wschr., 117, 1308-1312, 1992
9. Pietsch, M., Impfserologie zur Ergänzung von Impfungen. Der Allgemeinarzt, 18, 1993
10. Pietsch, M., et al., Immunitätslücken gegen Diphtherie und Tetanus bei Kindern und Jugendlichen, Sozialpädiatrie, 15. Jg., 1993, Nr. 5