

ESTRATTO



Volume 28 - Numero 3  
Marzo 2015

ISSN 0394-9303 (cartaceo)  
ISSN 1827-6296 (online)

# Notiziario

dell'Istituto Superiore di Sanità

**La difterite:  
è ancora una malattia da sorvegliare?**

M. Monaco, F. Mancini, A. Ciervo,  
M. Pataracchia, C. von Hunolstein,  
G. Errico, S. Iannazzo, A. Pantosti



Poste Italiane S.p.A. - Spedizione in abbonamento postale - 70% - DCB Roma

www.iss.it

## LA DIFTERITE: È ANCORA UNA MALATTIA DA SORVEGLIARE?



Monica Monaco<sup>1</sup>, Fabiola Mancini<sup>1</sup>, Alessandra Ciervo<sup>1</sup>, Marco Pataracchia<sup>1</sup>,  
Christina von Hunolstein<sup>2</sup>, Giulia Errico<sup>1</sup>, Stefania Iannazzo<sup>3</sup> e Annalisa Pantosti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, ISS

<sup>2</sup>Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione dei Prodotti Immunobiologici, ISS

<sup>3</sup>Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria, Ufficio Malattie Infettive e Profilassi Internazionale,  
Ministero della Salute, Roma

**RIASSUNTO** - La difterite è una malattia infettiva acuta, potenzialmente fatale, a notifica obbligatoria, causata da ceppi appartenenti alla specie *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* produttori di tossina. Grazie alle massive campagne di vaccinazione, introdotte a partire dagli anni '20 del Novecento, la difterite è stata debellata nella maggior parte dei Paesi industrializzati, ma resta una malattia endemica in diverse aree geografiche, emergendo talvolta come caso sporadico o piccola epidemia. Riconoscere clinicamente un caso sospetto, segnalarlo alle autorità competenti e confermare rapidamente la diagnosi, mediante analisi microbiologiche e molecolari finalizzate all'identificazione e alla conferma della specie e della presenza della tossina, diventa cruciale per il corretto e tempestivo intervento sia sui pazienti che sui contatti.

**Parole chiave:** difterite; *Corynebacterium diphtheriae*; *Corynebacterium ulcerans*; diagnosi molecolare

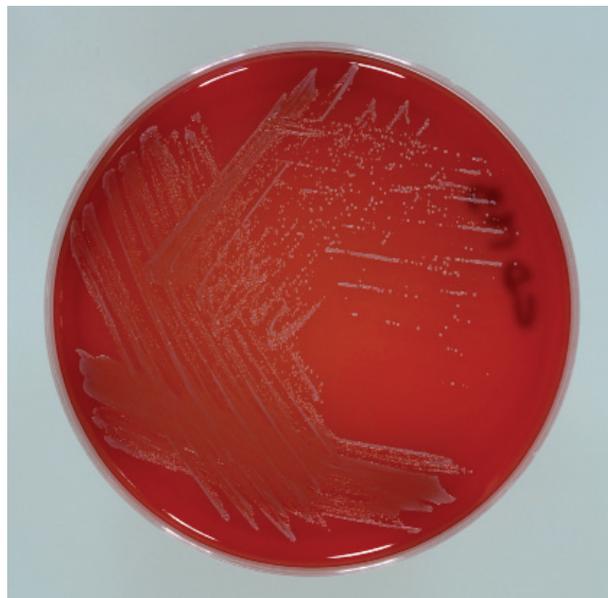
**SUMMARY** (*Is diphtheria still a disease to be monitored?*) - Diphtheria is an acute infectious disease, potentially fatal, notifiable, caused by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans*. Thanks to massive vaccination campaigns, introduced since the 1920s, diphtheria has been eradicated in most industrialized countries. However, it remains an endemic disease in several geographical areas, sometimes emerging as sporadic cases or small epidemics. It is crucial for the correct and timely intervention on patients and contacts to recognize a clinically suspected case, to report it to the competent authorities and to quickly confirm the diagnosis by microbiological and molecular analysis for the identification and confirmation of the species and the presence of the toxin.

**Key words:** diphtheria; *Corynebacterium diphtheriae*; *Corynebacterium ulcerans*; molecular diagnosis

monica.monaco@iss.it

La difterite è una malattia infettiva, a notifica obbligatoria (DM 15 dicembre 1990, *Gazzetta Ufficiale* n. 6, 8 gennaio 1991), altamente contagiosa, che nel passato è stata caratterizzata da elevata mortalità, soprattutto nei bambini, generando grande preoccupazione nella popolazione che assisteva impotente alla diffusione di una malattia che provocava la morte per soffocamento. È soltanto alla fine dell'800 che è stato identificato l'agente patogeno: il *Corynebacterium diphtheriae*. Questo batterio produce una tossina (tossina difterica) che, oltre a causare necrosi tessutale locale, è in grado di diffondere attraverso il circolo sanguigno e

raggiungere organi vitali causando gravi complicanze. I ceppi tossinogenici infettano le vie aeree superiori dando origine, dopo una breve incubazione (2-4 giorni), a rinite, faringite (angina difterica), laringotracheite (croup difterico) con formazione di pseudomembrane. Il croup difterico può condurre a morte per soffocamento. Esiste anche una forma cutanea di difterite che si manifesta con la formazione di un'ulcera gangrenosa in seguito a una puntura di insetto o a una ferita. La difterite cutanea è piuttosto rara in Europa e negli Stati Uniti, mentre è più diffusa nei Paesi tropicali manifestandosi soprattutto nei soggetti indigeni. ▶



*C. diphtheriae* biotipo *mitis*, crescita su agar sangue

Nelle forme più gravi della malattia, causate dalla diffusione della tossina difterica nel sistema circolatorio, si possono avere complicanze sistemiche a carico del miocardio e del sistema nervoso periferico. La formulazione di un vaccino e le campagne di vaccinazione di massa in America (1920) e in Europa (1940) hanno favorito la quasi totale eliminazione della malattia nella maggior parte dei Paesi industrializzati. Tuttavia, esistono aree del mondo come l'Asia (Cina, India e Indonesia), il Sud-America e l'Africa dove la malattia è ancora endemica (1). Nonostante il grande successo ottenuto grazie alla somministrazione del vaccino, durante gli anni '90 numerosi episodi epidemici, anche di vaste proporzioni, sono stati riportati in Russia e nei Nuovi Stati Indipendenti (NSI) della ex-Unione Sovietica. La riemergenza della difterite in questi Paesi fu dovuta soprattutto a fattori di tipo sociali, economici, politici e sanitari, che hanno subito un importante e grave deterioramento in seguito alla disgregazione dell'Unione Sovietica, contribuendo alla diffusione della malattia (2).

La terapia più efficace per la difterite è la somministrazione di siero immune equino (1) conosciuto come antitossina difterica (DAT). La DAT, scoperta e prodotta su larga scala alla fine dell'800, si dimostra efficace soltanto nelle primissime fasi dell'infezione quando la tossina difterica è in circolo e non si è ancora fissata ai tessuti. Con l'avvento del vaccino e la drastica riduzione del numero dei casi, è diminuita anche la richie-

sta di DAT, che oggi è prodotta solo da pochissimi Paesi, tra cui il Brasile. La DAT, oltre che per la terapia, è importante anche per la diagnostica ed è utilizzata nel saggio di immunoprecipitazione (Elek test) che serve a determinare la produzione di tossina *in vitro* da parte dei corinebatteri. La mancanza di scorte di DAT (l'Italia è uno dei Paesi europei a non avere scorte) mette a serio rischio la possibilità di intervenire precocemente a livello terapeutico; in situazioni di emergenza si può utilizzare il plasma di pazienti convalescenti, ma l'alternativa più promettente è rappresentata dagli anticorpi monoclonali. In uno studio americano, questi anticorpi si sono dimostrati efficaci nel neutralizzare la tossina difterica sia *in vivo* che *in vitro* e ne è stata autorizzata la sperimentazione preclinica e clinica nell'uomo per valutarne sicurezza ed efficacia (3). L'utilizzo di anticorpi monoclonali eviterebbe il potenziale rischio di reazioni di ipersensibilità legate alla somministrazione di DAT. Nei casi di difterite si interviene, inoltre, con una terapia di supporto basata sull'uso di antibiotici quali penicilline e/o macrolidi, raccomandati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) sia per il trattamento dei casi che dei contatti.

## Il batterio

*C. diphtheriae*, che comprende 4 diversi biotipi (*gravis*, *mitis*, *intermedius* e *belfanti*) è la più comune delle specie potenzialmente tossinogeniche e può dare origine a focolai epidemici trasmettendosi da uomo a uomo per via aerea (starnuti, tosse) o per contatto diretto (lesioni cutanee). Tutti i biotipi, a eccezione di *belfanti*, possono produrre la tossina difterica e sono distinguibili sia dal punto di vista morfologico che biochimico.

Oltre a *C. diphtheriae*, altre due specie possono produrre la tossina difterica: il *Corynebacterium ulcerans* e il *Corynebacterium pseudotuberculosis*, entrambi rilevanti in ambito veterinario. Il *C. ulcerans* è responsabile di mastiti bovine e di infezioni in animali selvatici e domestici, quali piccoli uccelli, cani e gatti, che possono quindi rappresentare un serbatoio e una fonte di trasmissione per l'uomo. Le infezioni umane da *C. ulcerans*, in aumento in Europa e negli Stati Uniti (4), sono generalmente associate al consumo di latte crudo o al contatto con animali infetti, sia da allevamento che da compagnia. *C. pseudotuberculosis*, responsabile della linfadenite negli ovini, può causare anche infezioni in altri animali quali cavalli e mucche da latte. Le

infezioni umane causate da *C. pseudotuberculosis* sono molto rare e associate a esposizione professionale. Né per *C. ulcerans*, né per *C. pseudotuberculosis*, è nota la trasmissione da uomo a uomo.

Alcuni ceppi di *C. diphtheriae* privi dei geni della tossina difterica (non tossinogenici) possono colonizzare il nasofaringe e causare faringiti, batteriemie, endocarditi, artriti settiche, ascessi e polmoniti (5, 6). L'emergenza dei ceppi non tossinogenici di *C. diphtheriae* è stata documentata di recente negli Stati Uniti e in Europa, inclusa l'Italia. Eccezionalmente, alcuni di questi ceppi non-tossinogenici presentano i geni della tossina e sono definiti come portatori del gene *tox* non-tossinogenici. Questi ceppi sono stati osservati per la prima volta durante e dopo l'epidemia degli anni '90 nei diversi Paesi dell'Europa dell'Est (Russia ed NSI) e più recentemente in Gran Bretagna (7). La circolazione di questi ceppi rappresenta un rischio per la diffusione della difterite perché potrebbero tornare a produrre la tossina attraverso reversione spontanea al ceppo tossinogenico o per ricombinazione omologa tra i diversi corinebacteriofagi (7).

### L'epidemiologia nel mondo nell'era vaccinale

La difterite è una malattia prevenibile con il vaccino antidifterico, costituito da tossina difterica resa non tossica (anatossina o tossoide) da trattamenti chimici. In Italia, il vaccino antidifterico esiste in diverse formulazioni, sia per bambini che per adulti;



si può trovare in combinazione con il tossoide tetanico (tetano-difterite per adulti) e con il vaccino anti-pertosse acellulare (DTaP). Ai bambini nel primo anno di vita si somministra comunemente un vaccino esavalente combinato (Difterite-Tetano-Pertosse acellulare, Polio inattivato, *Haemophilus influenzae* tipo b, Epatite B), che assicura una protezione contro la difterite superiore al 98%.

I casi di difterite riportati negli Stati Uniti prima dell'avvento del vaccino erano superiori a 200.000 per anno con un tasso di incidenza della malattia pari a 191 casi per milione di abitanti. La vaccinazione ha drasticamente ridotto questi numeri fino a 0 casi negli anni '60 (8). Negli anni '80 i casi riportati erano meno di 5 per anno e si trattava generalmente di casi importati (9). In Europa, sulla base dei dati dell'OMS (WHO European Region), grazie alle politiche vaccinali, nel decennio 2000-2009 il tasso di incidenza è diminuito, passando da 1,82 casi per milione di abitanti nel 2000 a 0,07 casi per milione nel 2009, con una mortalità del 14,6% in pazienti con difterite respiratoria associata a pseudomembrane contro l'1,3% dei pazienti con difterite respiratoria in assenza di pseudomembrane (4).

Nel periodo 2011-2013 sono stati riportati globalmente ogni anno dai 4.500 ai 5.500 casi, la maggior parte dei quali segnalati in India e in Indonesia. Sebbene la difterite causi più morti nei Paesi ad alta endemia, il tasso di letalità è più alto nei Paesi in cui la malattia non è endemica dove a causa della poca familiarità con la malattia si può andare incontro a ritardi nella diagnosi e nel trattamento (10).

### La sorveglianza europea

In seguito all'epidemia di difterite segnalata negli stati dell'ex-Unione Sovietica, nel 1993 si è istituito, a livello europeo, il primo Gruppo di lavoro sulla difterite (European Laboratory Working Group on Diphtheria, ELWGD), con lo scopo di controllare e contrastare la diffusione della malattia. Nel corso degli anni, grazie ai finanziamenti della Commissione Europea (DG SANCO), la sorveglianza della difterite è stata implementata e nel 2010 è passata sotto il coordinamento dell'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), con il nome di European Diphtheria Surveillance Network (EDSN) ([www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EDSN/Pages/index.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EDSN/Pages/index.aspx)). ►

Questa sorveglianza, che può contare su una rete di 32 Paesi partecipanti, è utile non solo a mantenere alta l'attenzione verso la malattia, ma soprattutto a mantenere le capacità diagnostiche dei laboratori di riferimento, armonizzando i metodi e le prestazioni in tutta Europa. Ogni due anni le procedure dei laboratori di riferimento dei Paesi della rete vengono valutate mediante un Controllo di Qualità Esterno (EQA).

Nell'ultimo report, pubblicato nel 2013 dall'ECDC (dati 2011), si documenta una progressiva riduzione dei casi di difterite da 42 per centomila abitanti nel 2008, a 20 nel 2011 ([www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/annual-epidemiological-report-2013.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/annual-epidemiological-report-2013.pdf)).

La Lettonia resta il Paese con il maggior numero di casi, sebbene si sia passati da 29 casi per centomila abitanti nel 2008 a 6 casi nel 2014.

### L'attività del Laboratorio di riferimento per la difterite presso l'ISS

Presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), il Laboratorio di riferimento per la difterite, con il sostegno del Ministero della Salute, attraverso un apposito Accordo di collaborazione CCM, esegue la diagnosi microbiologica dei ceppi appartenenti alle specie *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* attraverso coltura, saggi biochimici (mediante API Coryne, bio Meriéux) e meto-



di molecolari (Polymerase Chain Reaction, PCR), che consentono di identificare le diverse specie di *Corynebacterium* tossinogeniche e determinare la presenza della tossina stessa, responsabile della malattia. Il Laboratorio di riferimento ha messo a punto una metodica in Real-Time PCR per la diagnosi rapida su coltura o campione clinico, mediante la ricerca simultanea del gene *rpoB* (che individua il patogeno e discrimina tra le specie *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*) e del gene della tossina *tox* (11).

### La situazione italiana dagli anni '90 a oggi

In Italia, i casi più recenti di difterite causati da *C. diphtheriae* produttori di tossina risalgono agli anni '90 con due episodi di difterite respiratoria, uno nel 1993 dovuto a *C. diphtheriae* biotipo *gravis* in una donna peruviana di 38 anni il cui stato vaccinale non era noto, e l'altro, nel 1995, dovuto a *C. diphtheriae* biotipo *mitis* isolato da essudato faringeo in una bambina italiana di tre anni non vaccinata (6). Nel periodo 2000-2014, i casi di difterite, confermati microbiologicamente presso l'ISS, sono stati due, entrambi segnalati nel Nord Italia e causati da *C. ulcerans*. Il primo è stato segnalato nel 2002 in un paziente di 14 anni, vaccinato, che presentava pseudomembrane nel faringe. Il secondo caso è stato diagnosticato a febbraio 2014 in una paziente di 70 anni non vaccinata che presentava pseudomembrane a livello rinofaringeo; inoltre, la coltura del tampone nasale ottenuto dal cane della paziente ha evidenziato la presenza di *C. ulcerans*. I risultati della genotipizzazione eseguita sui due ceppi confermano la trasmissione del ceppo di *C. ulcerans* dal cane alla paziente.

Nello stesso periodo sono stati segnalati anche cinque casi di infezioni dovuti a ceppi di *C. diphtheriae* non produttori di tossina e, tra questi, due sono stati particolarmente gravi. Nel primo caso, segnalato nel 2012, *C. diphtheriae* biotipo *belfanti* (non tossinogenico) ha causato polmonite in una paziente di 62 anni, precedentemente vaccinata (5) e con una storia pregressa di viaggi all'estero; nel secondo caso, segnalato nel 2014, *C. diphtheriae*, biotipo *gravis* (non tossinogenico), è stato responsabile di un'ulcera cutanea in un uomo di 44 anni, italiano, vaccinato, affetto da impetigine manifestatasi dopo un viaggio all'estero. I casi esaminati nel periodo 2000-2014 sono riportati in Tabella.

**Tabella** - Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti con isolamento di *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* in Italia nel periodo 2000-2014

Caso	Anno	Città	Età/sexo	Vaccinazione antidifterica	Diagnosi	Campione	Specie	Produzione di tossina
1	2002	Vicenza	14/M	Sì	Faringite con pseudomembrane	Tampone faringeo	<i>C. ulcerans</i>	Sì
2	2007	Roma	Non nota/F	Non nota	Faringite	Tampone faringeo	<i>C. diphtheriae</i> var <i>mitis</i>	No
3	2009	Lecco	61/F	Sì	Colonizzazione	Tampone nasale	<i>C. diphtheriae</i> var <i>belfanti</i>	No
4	2012	Verona	44/M	Sì	Impetigine	Lesione cutanea	<i>C. diphtheriae</i> var <i>gravis</i>	No
5	2012	Milano	62/F	Sì	Polmonite	Aspirato tracheo-bronchiale	<i>C. diphtheriae</i> var <i>belfanti</i>	No
6	2014	Piacenza	70/F	No	Rinofaringite con pseudomembrane	Biopsia rinofaringea	<i>C. ulcerans</i>	Sì
7	2014	Roma	9/F	Sì	Colonizzazione	Secrezione respiratoria	<i>C. diphtheriae</i> var <i>gravis</i>	No

### Siero-epidemiologia della difterite

La vaccinazione antidifterica non conferisce immunità permanente. La protezione diminuisce nel corso degli anni e quindi si possono manifestare casi anche in soggetti precedentemente vaccinati. I livelli anticorpali antitossina, in accordo con i criteri internazionali, determinati con il saggio che utilizza cellule VERO (12), sono considerati: non protettivi (< 0,01 UI/ml), scarsamente protettivi (0,01-0,09 UI/ml), protettivi (0,1-0,9 UI/ml) e protettivi a lungo termine ( $\geq 1$  UI/ml). I test ELISA, comunemente usati per la determinazione di anticorpi anti difterite, non sempre concordano con il saggio su cellule VERO, di conseguenza è possibile che individui valutati con il test ELISA possano ricevere indicazioni erronee circa la necessità o meno di vaccinarsi (13). Studi di sieropidemiologia condotti in Europa (14) hanno evidenziato come in alcuni Paesi, Italia inclusa, la popolazione giovanile (>20 anni) e quella adulta non siano protette nei confronti della difterite. Nel 2011, in un campione di 200 donatori di sangue, di età compresa tra 21 e 60 anni, si è osservato un incremento della percentuale di soggetti con livelli anticorpali non protettivi (< 0,01 IU/ml) rispetto a uno studio condotto nel 1996 (22 % *vs* 15%) (14). Per prevenire il rischio di diffusione del microorganismo in una popolazione non correttamente protetta attraverso la circolazione di individui da Paesi endemici per difterite (turisti o altro) è importante seguire la raccomandazione del

Ministero della Salute ([www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?lingua=italiano&id=648&area=Malattie%20infettive&menu=vaccinazioni](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=648&area=Malattie%20infettive&menu=vaccinazioni)) di ripetere ogni 10 anni il *booster* del vaccino anti-difterite, ricordando che la vaccinazione anti-difterite conferisce anche una protezione crociata nei confronti della tossina difterica prodotta da *C. ulcerans* o *C. pseudotuberculosis* grazie all'elevata omologia delle tossine prodotte da queste tre specie.

### Conclusioni

La difterite, grazie alle campagne di vaccinazione di massa attuate a partire dal 1920, è stata quasi completamente debellata nella maggior parte dei Paesi industrializzati, ma rimane endemica in alcuni Paesi, mentre in altri, per la mancanza di politiche vaccinali adeguate, è ancora causa di episodi sporadici o epidemici.

Studi di sieroprevalenza hanno dimostrato che i livelli di protezione del vaccino diminuiscono a distanza di anni dopo la vaccinazione primaria; pertanto, la popolazione adulta spesso non è protetta ed è potenzialmente a rischio di un possibile contagio. Gli operatori sanitari e la popolazione generale dovrebbero essere sensibilizzati sulla necessità di effettuare dosi di richiamo a distanza di dieci anni dall'ultima somministrazione per riportare i livelli sierici della popolazione generale a valori pro- ►

tettivi e non rischiare nuove epidemie. Il richiamo della vaccinazione antidifterica può essere effettuato in concomitanza del richiamo della vaccinazione anti-tetanica con l'uso dei vaccini difto-tetano per adulti.

Attualmente, grazie alla rete di sorveglianza coordinata dall'ECDC, più di 30 Paesi europei lavorano attivamente per mantenere alto il livello di attenzione e le capacità diagnostiche dei laboratori di riferimento. Attraverso metodiche molecolari innovative è possibile effettuare diagnosi in tempi rapidi e con un grado di efficienza molto elevato. La rapida identificazione delle diverse specie di *Corynebacterium* potenzialmente produttori di tossina e la conoscenza dello stato tossinogenico permette di intervenire non solo sui soggetti malati con cure adeguate, ma anche sui contatti con opportune misure di profilassi. Il Laboratorio di riferimento dell'ISS può fornire un contributo importante per la diagnosi rapida di difterite su ceppi batterici sospetti e/o materiali clinici e per la conferma dei casi sospetti segnalati su tutto il territorio nazionale. ■

#### Dichiarazione di conflitto di interessi

*Gli autori dichiarano che non esiste alcun potenziale conflitto di interesse o alcuna relazione di natura finanziaria o personale con persone o con organizzazioni, che possano influenzare in modo inappropriato lo svolgimento e i risultati di questo lavoro.*

#### Riferimenti bibliografici

- Adler NR, Mahony A, Friedman ND. Diphtheria: forgotten, but not gone. *Intern Med J* 2013;43(2):206-10.
- Markina SS, Maksimova NM, Vitek CR, et al. Diphtheria in the Russian Federation in the 1990s. *J Infect Dis* 2000;181 Suppl 1:527-34.
- Sevigny LM, Booth BJ, Rowley KJ, et al. Identification of a human monoclonal antibody to replace equine diphtheria antitoxin for treatment of diphtheria intoxication. *Infect Immun* 2013; 81(11):3992-4000.
- Wagner KS, White JM, Lucenko I, et al. Diphtheria Surveillance Network. Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000-2009. *Emerg Infect Dis* 2012;18(2):217-25.
- Bilucaglia L, Aliberti S, Viganò EF, et al. A 61-year-old female with chronic cough and purulent sputum. *Eur Respir J* 2013;41(2):472-4.
- von Hunolstein C, Alfaroni G, Scopetti F, et al. Molecular epidemiology and characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains isolated in Italy during the 1990s. *J Med Microbiol* 2003;52(Pt 2):181-8.
- Zakikhany K, Neal S, Efstratiou A. Emergence and molecular characterisation of non-toxigenic toxin-bearing *Corynebacterium diphtheriae* biovar *mitis* in the United Kingdom, 2003-2012. *Euro Surveill* 2014;19(22):20819.
- Hodes HL. Diphtheria. *Pediatr Clin North Am* 1979;26(2): 445-59.
- Golaz A, Lance-Parker S, Welty T, et al. Epidemiology of diphtheria in South Dakota. *SD J Med* 2000;53(7):281-5.
- Both L, White J, Mandal S, et al. Access to diphtheria antitoxin for therapy and diagnostics. *Euro Surveill* 2014; 19(24):20830.
- Mancini F, Monaco M, Pataracchia M, et al. Identification and molecular discrimination of toxigenic and nontoxigenic diphtheria *Corynebacterium* strains by combined real-time polymerase chain reaction assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73(2):111-20.
- Miyamura K, Nishio S, Ito A, et al. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. *J Biol Stand* 1974;2:189-201.
- Di Giovine P, Pinto A, Ölander RM, et al. External quality assessment for the determination of diphtheria antitoxin in human serum. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:1282-90.
- Edmunds WJ, Pebody RG, Aggerback H, et al. The sero-epidemiology of diphtheria in Western Europe. *Epidemiol Infect* 2000;125:113-25.

