

RIDA® Quick Campylobacter

Test immunochromatograficzny (kasetkowy) do wykrywania antygenu *Campylobacter jejuni* i *coli*

Nr kat.: N2403

Test In vitro

R-Biopharm AG
An der Neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Germany
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Przeznaczenie testu

Test do diagnostyki in vitro. RIDA®Quick Campylobacter jest testem immunochromatograficznym do jakościowego wykrywania antygenu *Campylobacter jejuni* i *coli* w próbkach kału i hodowli.

2. Informacje ogólne

Na równi z salmonellozą, kampylobakterioza jest jednym z najczęstszych powodów przenoszonej przez żywność biegunki u ludzi na całym świecie. Na zwiększoną zachorowalność wpływa fakt, że bakteria ta jest łatwo przenoszona przez inne gatunki takie jak zwierzęta domowe, pracujące i takie, które mają większy kontakt z człowiekiem (zarówno ssaki jak i ptaki). Ponieważ bakterie te występują bardzo często w układzie pokarmowym ptaków, zwierzęta te są głównym źródłem ich przedostawania się do łańcucha pokarmowego człowieka. Niemniej nie należy wykluczać innych źródeł zachorowań, takich jak mleko, mięso mielone, czy woda pitna. *Campylobacter* jest uwalniany do środowiska zazwyczaj w dużych ilościach i zarażenie nim przez człowieka odbywa się na ogół przez zakażone jedzenie. Inną drogą zarażenia kampylobakteriozą bywa czasem droga fekalno-oralna, która ma zwiększony udział w przypadku dzieci. 500 organizmów to dawka względnie mała. Spośród 15 znanych gatunków *Campylobacter*, *C. jejuni*, oraz *C. coli* są głównym czynnikiem wywołującym zapalenie układu pokarmowego u ludzi. Po czasie inkubacji trwającym od 2 do 10 dni, zarażeni, którzy nie są leczeni zaczynają uwalniać do środowiska patogeny wraz z kałem przez czas do 4 tygodni. W przypadku osób z osłabioną reakcją immunologiczną, wydzielanie antygenu może być zjawiskiem trwałym.

Mimo iż wiele przypadków infekcji kampylobakteriozą odbywa się bezobjawowo, choroba może przejawiać się po okresie zapowiadającym wieloma symptomami takimi jak gorączka, ból głowy, mięśnioból, czy ogólne zmęczenie, oraz typowymi objawami zapalenia układu pokarmowego, czyli biegunką i skurczem i bólem mięśni brzucha. Wydalany kał w tych przypadkach jest bardzo rzadki i wodnisty, czasem krwawy. Do późnych i nieczęstych objawów należą reumatyzm i Syndrom Guillain'a Barre'a. Terapia na ogół polega na leczeniu objawów poprzez zamianę płynów ustrojowych i elektrolitów. Leczenie antybiotykami odbywa się bardzo rzadko i dotyczy bardzo ciężkich przypadków. Diagnozowanie odbywa się na ogół poprzez hodowanie patogenu z próbek kału, które muszą bezwzględnie być tak świeże na ile to tylko możliwe. W związku z tym transport tych próbek musi być przeprowadzony szybko i w warunkach schłodzonych. Nowoczesne metody, takie jak poniższy test RIDA®QUICK *Campylobacter* są niezależne od tych problemów i mogą być wykonywane również wtedy gdy hodowla patogenu nie jest już możliwa.

3. Zasady działania testu

RIDA®Quick *Campylobacter* to jednostopniowy test immunochromatograficzny, wykorzystujący swoiste biotynylowane, oraz swoiste sprzężone ze złotem przeciwciała skierowane przeciwko antygenom *Campylobacter jejuni* i *coli*. Obecne w próbce antygeny *Campylobacter jejuni* i *coli* tworzą kompleksy immunologiczne wraz ze znakowanymi złotem przeciwciałami i migrują przez membranę reakcyjną. Następnie streptawidyna w obszarze testowym (T) wyłapuje migrujące immunokompleksy poprzez wiązanie się z biotyną skoniugowaną z przeciwciałami tworząc w efekcie barwny prążek czerwono-fioletowy w obszarze testowy (T). Migrujące dalej przeciwciała skoniugowane ze złotem, które nie utworzyły immunokompleksów są dalej wychwytywane w obszarze kontrolnym (C). Jeśli w próbce antygeny *Campylobacter jejuni* i/lub *coli* nie były obecne, nie powstaną żadne immunokompleksy i nie wytworzy się barwny prążek w obszarze testowym. Wytworzy się natomiast barwny prążek w obszarze kontrolny (C), który jest potwierdzeniem, że test został wykonany prawidłowo.

4. Odczynniki dostarczone

Każdy zestaw zawiera wystarczającą ilość odczynników do wykonania 25 pomiarów.

25 x Kasetka	-	25 indywidualnie pakowanych kasetek
1 x Reagent A	(13,5 ml)	Swoiste przeciwciała anti-Campylobacter. Zawiera 0,05 % azydku. Zabarwione na niebiesko. Gotowe do użycia.
1 x Reagent B	(13,5 ml)	Swoiste przeciwciała anti-Campylobacter. Zawiera 0,05 % azydku. Zabarwione na żółto. Gotowe do użycia.
50 x Pipetka	-	Plastikowe opakowanie z 50 wielofunkcyjnymi pipetami, z podziałką do pipetowania próbek płynnych oraz ze szpatułką do odmierzania stałych próbek kału
25 x Fiolka reakcyjna	-	Plastikowe opakowania z jednorazowymi fiolkami.

5. Przechowywanie odczynników

Przechowywać zestaw w temperaturze 2 - 25°C. Zestaw zachowuje ważność do czasu upłynięcia daty zaznaczonej na opakowaniu. Producent nie gwarantuje jakości wyników otrzymanych po upłynięciu daty ważności, oraz w przypadku gdy opakowanie nosi znamiona uszkodzenia.

6. Niezbędny sprzęt i dodatkowo wymagane odczynniki

- Vortex (opcjonalnie)
- Pojemnik na odpadki zawierający roztwór 0,5 % podchlorynu sodu

7. Środki ostrożności

1. Odczynnik tylko do diagnostyki *in vitro*.
2. Test może być wykonywany tylko przez wykwalifikowany personel laboratoryjny. Należy przestrzegać zasad GLP, oraz postępować zgodnie z instrukcją.
3. Odczynniki zawierają azydek sodu jako środek konserwujący. Należy unikać ich kontaktu ze skórą i błoną śluzową.
4. Próbkę i odczynniki nie mogą być pipetowane ustami.
5. Unikać kontaktu ze zranioną skórą oraz z błoną śluzową. Należy używać jednorazowych rękawiczek ochronnych. Po skończeniu testu umyć ręce. Nie palić, nie jeść i nie pić w trakcie wykonywania badań i w pomieszczeniach laboratorium.
6. Jeśli którykolwiek z odczynników lub materiałów miał kontakt z potencjalnie zakażoną próbką musi zostać zdezynfekowany lub wysterylizowany w temp. 121°C przez minimum 1 godzinę.

8. Pobieranie i przechowywanie próbek

Wszystkie próbki należy przechowywać w czystych pojemnikach w temperaturze 2-8°C. Jeśli próbki nie zostaną użyte w ciągu 3 dni, należy je zamrozić w temperaturze -20°C. Należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek. Przed wykonaniem testu próbki doprowadzić do temperatury pokojowej i dokładnie wymieszać. Jeśli wymazówka rektalna do pobierania próbek musi zostać użyta, należy upewnić się czy próbki kału zostały pobrane w odpowiedniej ilości (w przybliżeniu 50 mg).

9. Procedura testu

9.1 Uwagi Wstępne

Przed przystąpieniem do wykonania oznaczenia należy odczekać aż wyjęte z lodówki odczynniki i kasetki osiągną temperaturę pokojową (20-25°C). Wyjąć kasetki z opakowań dopiero przed rozpoczęciem analizy. Każda kasetka jest jednorazowego użytku i nie można używać jej więcej razy. Nie wykonywać testu przy bezpośrednim świetle słonecznym. Nie zwracać pozostałości odczynników z powrotem do fiolek ze względu na groźbę ich zanieczyszczenia.

9.2 Przygotowanie Próbek

Przed użyciem wszystkie próbki kału należy dokładnie wymieszać, aby zapewnić jednorodną dystrybucję antygenów.

Proszę:

Do każdego badania próbki dostępne są dwie pipety miarowe. Pipeta jest dostępna do użycia w następujący sposób:

Pipeta 1: do pipetowania Odczynnik A i preparat (50 µl lub 50 mg szpatułką w zależności od konsystencji preparatu).

Pipeta 2: do pipetowania Odczynnika B i mieszaniny Odczynnika A i B oraz próbki.

9.3 Testowanie

W oznaczonej fiole z odczynnikiem fiołka reakcyjna, odmierzyć pipetą 0,5 ml Odczynnika A za pomocą Pipety 1 i 0,5 ml Odczynnika B za pomocą Pipety 2. Dodać wcześniej zhomogenizowaną próbkę kału, albo 50 mg Pipety 1 za pomocą szpatułki (zwrócić uwagę na zaznaczenie na szpatułce) lub 50 µl (pierwsza podziałka na pipecie) w zależności od konsystencji, do mieszaniny odczynników. Szczelnie zamknąć fiolkę reakcyjną i dobrze wstrząsnąć zawartością w celu wymieszania (opcjonalnie: worteks). Umieścić fiolkę reakcyjną w ramce z zestawu testowego na co najmniej 5 min. W tym czasie próbka reaguje z mieszaniną odczynników, podczas gdy stałe składniki kału osadzają się w postaci osadu. W międzyczasie wyjąć kasetę testową w temperaturze pokojowej z opakowania i umieścić ją na równej powierzchni. Po upływie 5-minutowego czasu reakcji, ostrożnie otworzyć fiolkę reakcyjną i użyć Pipety 2, aby pobrać 150 µl (druga podziałka na pipecie) sklarowanego supernatantu i odpipetować go do lejka na próbki znajdującego się na krawędzi kasety. Upewnić się, że płyn przepływa przez membranę bez przeszkód. Jeśli wykonano prawidłowo, pasek kontrolny pojawi się na linii kontrolnej C po około 3 minutach. Jeśli linia kontrolna nie jest widoczna po 3 minutach, fiolkę reakcyjną należy ponownie zamknąć i wirować przez 2 minuty przy 2000 x g, aby osadzić wszelkie problematyczne cząstki stałe. Następnie odpipetować 150 µl supernatantu do lejka na próbki nowej kasety. Odczytać wynik testu po 15 minutach. Przez cały czas wywoływania i po wyschnięciu paska, zabarwienie i intensywność pasm może zmieniać się od czerwono-fioletowego przez niebiesko-szaro-fioletowy.

9.3.1 Przygotowanie płynnych i stałych kultur *Campylobacter*

Dodać 50 µl bulionu odżywczego (np. Bolton bulion) do 1,0 ml już przygotowanej mieszaniny odczynników w naczyniu reakcyjnym (0,5 ml Odczynnika A i 0,5 ml Odczynnika B) i wymieszać. Do badania próbek stosować 150 µl mieszaniny (patrz 9.3.). W przypadku stosowania pożywek stałych należy najpierw usunąć i całkowicie zawiesić jak najwięcej kolonii z płytki hodowlanej w 1 ml wody destylowanej lub roztworu soli fizjologicznej (0,9% NaCl). Następnie dodać 50 µl tej zawiesiny do 1,0 ml już przygotowanej mieszaniny odczynników w fiole reakcyjnej (0,5 ml Odczynnika A i 0,5 ml Odczynnika B) i wymieszać. Do badania próbek stosować 150 µl mieszaniny (patrz 9.3.).

10. Kontrola jakości - wskaźniki nietrwałości odczynnika

Test należy interpretować tylko wówczas, gdy przed użyciem wygląda on na nietknięty i na membranie nie wystąpiły żadne barwne zmiany. Ponadto po wykonaniu oznaczenia, w polu testowym musi być widoczny niebieski prążek kontrolny. Jeśli prążek ten nie wystąpi, należy sprawdzić poniższe przed powtórzeniem testu:

- Data ważności kasetek i buforu ekstrakcyjnego,
- Zgodność z procedurą zawartą w instrukcji,
- Obecność zanieczyszczeń w buforze ekstrakcyjnym.

Jeśli po sprawdzeniu powyższych czynników i powtórzeniu oznaczenia, niebieski prążek nadal nie występuje, prosimy o skontaktowanie się z „FABIMEX” Więcek Sp. j.

11. Ocena wyników

Na kasetce nie może pojawić się więcej niż 2 prążki w następującej kolejności licząc od okienka na dodawanie próbek: prążek testowy T i prążek kontrolny C. **Jeśli nie pojawi się prążek kontrolny C, test jest nieważny.**

Interpretacji wyników dokonuje się w sposób następujący:

1. **Wynik pozytywny na obecność *Campylobacter*:** Pojawiły się 2 barwne prążki.
2. Wynik negatywny na obecność *Campylobacter*: Pojawił się 1 barwny prążek w obszarze kontrolnym C.
3. **Wynik nieważny:** Nie pojawia się w okienku reakcyjnym prążek testowy w strefie T i prążek kontrolny w strefie C, ewentualnie pojawia się wyłącznie prążek testowy w strefie T. W takich sytuacjach test jest nieważny i powinien być powtórzony przy użyciu nowej kasetki.

12. Ograniczenia metody

Test RIDA® Quick *Campylobacter* wykrywa antygeny *Campylobacter jejuni* i *coli* w próbkach kału i hodowli. Intensywność zabarwienia prążka nie jest proporcjonalna do ostrości obserwowanych objawów choroby, a świadczy jedynie o obecności antygeny w próbce. **Interpretacji wyniku testu diagnostycznego powinien zawsze dokonywać lekarz na podstawie wszystkich dostępnych wskazań klinicznych.**

Wynik pozytywny nie wyklucza możliwości zakażenia innym antygenem.

Negatywny wynik nie może w 100% wykluczyć infekcji. Spowodowane to może być nierównomiernym wydaleniem antygeny z organizmu, lub ilością antygeny poniżej progu czułości testu. Jeśli mimo negatywnego wyniku istnieje uzasadnione podejrzenie infekcji należy pobrać nową próbkę od pacjenta i ją przebadać.

Nadmierna ilość próbki kału może spowodować powstanie brązowych plam na pasku testowym, które mogą zakryć czerwono-fioletowy kolor określonych linii testowych i kontrolnych. W przypadku takiego zabarwienia badanie należy powtórzyć z mniejszą ilością próbki kału; alternatywnie można przeprowadzić silniejsze odwirowanie zawiesiny stolca w celu określenia, czy docelowe antygeny *Campylobacter* rzeczywiście są obecne w próbce, ale są maskowane przez nadmiar macierzy stolca.

13. Charakterystyka testu

13.1 Jakość testu

Badania porównawcze przeprowadzono na 574 próbkach kału przez niezależne laboratorium w porównaniu do metody „złotego standardu” tj. hodowli bakterii na podłożu agarowym CCD. Wyniki przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1: Porównanie RIDA® Quick Campylobacter z metodą hodowli na agarze CCD.

		Hodowla na agarze CCD	
		+	-
RIDA® Quick Campylobacter	+	62	7
	-	1	504
Czułość		98,4 %	
Swoistość		98,6 %	
PWP		89,8 %	
PWN		99,8 %	

13.2 Czułość analityczna

Czułość analityczną testu wyznaczono poprzez oddzielne testowanie *C. jejuni* i *C. coli*. Limit detekcji (LOD) to najniższe stężenie patogenu oznaczane przez metodę jako wynik pozytywny. Niniejsza analiza była wykonana przez 3 analityków na kasetkach z 2 różnych serii i przy 60 powtórzeniach. Określona tym sposobem czułość to $2,1 \times 10^4$ CFU/ml dla *Campylobacter jejuni* i $8,5 \times 10^5$ CFU/ml dla *Campylobacter coli*.

13.3 Precyzja

Precyzję testu oceniono na podstawie jego odtwarzalności (3 operatorów) i powtarzalności (10 dni). Powtórzenia 5 próbek referencyjnych były przetestowane w każdym wypadku: negatywna, 2 słabo pozytywne i 2 średnio pozytywne. We wszystkich przypadkach test dał prawidłowe wyniki.

13.4 Reaktywność krzyżowa

Różne patogeny jelit zostały poddane badaniu przy użyciu testu RIDA® Quick Campylobacter nie wykazując żadnej reakcji krzyżowej. Badanie zostało wykonane poprzez analizę nierozcieńczonych zawiesin bakteryjnych o stężeniu 10^6 do 10^9 CFU/ml, zawiesin pasożytów 10^7 do 10^9 organizmów / ml, supernatantów z zainfekowanych hodowli, oraz zawirusowanych komórek. Żaden z mikroorganizmów poza *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* nie dał wyniku pozytywnego niniejszym testem. Wyniki przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2: Reakcyjność krzyżowa testu RIDA® Quick Campylobacter z patogennymi organizmami.

Patogen	Próbka	Wynik
Adenovirus	Supernatant	Negatywny
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Hodowla	Negatywny
Astrovirus	Supernatant	Negatywny
<i>Bacillus cereus</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Bacteroides fragilis</i>	Hodowla	Negatywny

<i>Campylobacter coli</i>	Hodowla	Pozytywny
<i>Campylobacter fetus</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Campylobacter jejuni</i>	Hodowla	Pozytywny
<i>Campylobacter lari</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Candida albicans</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Citrobacter freundii</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Clostridium difficile</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Clostridium perfringens</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Clostridium sordellii</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Cryptosporidium muris</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Hodowla	Negatywny
<i>E. coli</i> (O26:H-)	Hodowla	Negatywny
<i>E. coli</i> (O6)	Hodowla	Negatywny
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Hodowla	Negatywny
<i>Enterobacter cloacae</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Enterococcus faecalis</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Giardia lamblia</i>	Próbka kału	Negatywny
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Proteus vulgaris</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hodowla	Negatywny
Rotavirus	Supernatant	Negatywny
<i>Salmonella enteritidis</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Salmonella typhimurium</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Serratia liquefaciens</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Shigella flexneri</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Staphylococcus aureus</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Hodowla	Negatywny
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Hodowla	Negatywny

13.5 Substancje interferujące

Poniżej wymienione substancje w podanych stężeniach po zmieszaniu z próbką kału nie miały wpływu na wynik testu: siarczan baru (5% wag.), loperamid (immodium 5% wag.), Peptobismol (5% objęt./wag.), mucin (5% wag), słodzik (5% objęt./wag.), krew ludzka (5% objęt./wag.), kwas stearynowy/kwas palmitynowy (mieszanina 1:1, 40% wag.), metronidazol (0,5) płyn iniekcyjny (5% objęt./wag.), diclofenac (0,00263% objęt./wag.)

Bibliografia

1. Skirrow MB, Blaser MJ (1995): *Campylobacter jejuni*. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL (eds) *Infections of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, 825 – 248.
2. Kist M, Bereswill S (2001) *Campylobacter jejuni*. In: Mühldorfer I, Schäfer KP (eds) *Emerging bacterial pathogens*. Contrib Microbiol Vol.8. Karger, Basel, 150 –165.
3. Skirrow MB (1977) *Campylobacter enteritis: a new disease*. Br Med J 2: 9 –11.
4. Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Hughes RA (1995) *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barré syndrome. N Engl J Med 333: 1374 – 1379.
5. Beumer RR, Cruysen JJ, Birtantie IR (1988) The occurrence of *Campylobacter jejuni* in raw cows milk. J Appl Bacteriol 65: 93 – 96.
6. Jones K (2001) *Campylobacters in water, sewage and the environment*. J Appl Microbiol 90: 68 S - 79 S
7. Skirrow MB, Turnbull GL, Walker RE, Young SEJ (1980) *Campylobacter jejuni* enteritis Transmitted from cat to man. Lancet 1: 1188.
8. Steinbrückner B, Härter G, Pelz K, Kist M (1999) Routine identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human stool samples. FEMS Microbiol Lett 179: 227 – 232.
9. Kist M (2002) Lebensmittelbedingte Infektionen durch *Campylobacter*. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 45: 497 –506.

Rev. 2017 - 11 - 27

Autoryzowany dystrybutor w Polsce:

„FABIMEX” Więcek Sp. J. 04-565 Warszawa, ul. Cedrowa 16,
tel./fax (48-22) 872-40-53, 872-10-68

Gwarancja

R-Biopharm AG nie ponosi żadnej odpowiedzialności za wyjątkiem gwarancji, że wszystkie produkty firmy R-Biopharm AG wykonane zostały z materiałów o odpowiedniej jakości. Jeśli którykolwiek z produktów jest wadliwy R-Biopharm AG dostarczy wymianę. Jednak użytkownik ponosi wszelką odpowiedzialność i ryzyko za wykonane procedury i użycie produktu. R-Biopharm AG nie ponosi żadnej odpowiedzialności za szkody i straty spowodowane bezpośrednio, lub pośrednio użytkowaniem produktów R-Biopharm AG.