

RIDA[®] QUICK Campylobacter

Réf. : N2403



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Tél. : +49 (0) 61 51 81 02-0 / Téléfax : +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Domaine d'application

Pour le diagnostic *in vitro*. RIDA[®]QUICK Campylobacter est un test rapide immunochromatographique pour la détermination qualitative des antigènes de *Campylobacter jejuni* et de *Campylobacter coli* dans les échantillons de selles et les cultures.

2. Résumé et explication du test

La campylobactériose est devenue, avec la salmonellose, une des diarrhées d'origine alimentaire les plus fréquentes chez l'homme, dans le monde entier. La forte augmentation des cas d'entérite à *Campylobacter* est favorisée par la large propagation de la bactérie parmi plusieurs espèces d'animaux sauvages, de rapport et domestiques (oiseaux et mammifères).

Ces bactéries pénètrent dans la chaîne alimentaire humaine notamment par le biais des volailles, dont elles sont commensales de l'intestin. Cependant, d'autres aliments tels que le lait, la viande hachée et l'eau potable sont également des facteurs de transmission de cet agent pathogène. Les nombreux hôtes libèrent dans l'environnement de grandes quantités de *Campylobacter*, qui finit par atteindre les humains via la nourriture contaminée. Mais la campylobactériose peut aussi se transmettre par contact direct avec des animaux domestiques qui en sont atteints, ainsi que par contact fécal-oral, principalement chez les jeunes enfants. La dose provoquant une infection est relativement faible : 500 germes. Parmi les quelque 15 espèces de *Campylobacter* connues, ce sont principalement *C. jejuni* et *C. coli* qui provoquent les gastro-entérites chez l'homme. Après une période d'incubation de 2 à 10 jours, les malades non traités éliminent les agents pathogènes infectieux par les selles, pendant une période pouvant atteindre 4 semaines. En cas d'immunodéficience, cette élimination peut devenir permanente. Tandis que beaucoup d'infections se déroulent de manière asymptomatique, les symptômes typiques de l'entérite avec diarrhée, crampes et douleurs abdominales apparaissent chez les malades après un stade prodromique avec fièvre, maux de tête, myalgies, arthralgies et fatigue. Les diarrhées sont pâteuses à massivement liquides et parfois sanglantes. Les arthrites et le syndrome de Guillain-Barré, rare, sont des séquelles de cette maladie.

Le traitement est le plus souvent symptomatique, consistant en l'absorption de liquides et d'électrolytes. Seuls les cas graves requièrent un traitement antibiotique.

Pour réussir à cultiver l'agent pathogène fragile à partir d'échantillons de selles les plus récents possible, les trajets doivent être courts ou se faire sous réfrigération. Le test rapide RIDA[®]QUICK Campylobacter présenté ici n'est pas lié à ces contraintes : cette méthode moderne détecte l'antigène spécifique de *Campylobacter* dans les échantillons de selles même lorsqu'il n'est plus possible de cultiver l'agent pathogène.

3. Principe du test

Le test rapide présenté ici est un test immunochromatographique sur membrane en une étape, qui utilise aussi bien des anticorps anti-Campylobacter biotinylés que marqués à l'or. Dès que l'agent pathogène est présent dans un échantillon positif, il se forme des immunocomplexes avec les anticorps anti-Campylobacter marqués, qui traversent alors la membrane. La streptavidine qui se trouve sur la ligne de test T lie les immunocomplexes qui s'écoulent via la biotine couplée aux anticorps anti-Campylobacter, entraînant une coloration violet rouge de la ligne T. Les anticorps marqués à l'or non complexés qui traversent sont liés à la ligne de contrôle C qui suit. Sur les échantillons négatifs, les immunocomplexes marqués à l'or ne sont donc pas liés à la ligne T mais uniquement à la ligne C. La ligne C rouge indique en permanence si le déroulement du test a été valide.

4. Contenu du coffret

Les réactifs contenus dans un coffret permettent de réaliser 25 tests.

Cassette	25 tests	25 cassettes de test emballées individuellement
Reagent A	13,5 ml	Anticorps spécifiques anti-Campylobacter ; contient 0,05 % d'acide, prêt à l'emploi, de couleur bleue
Reagent B	13,5 ml	Anticorps spécifiques anti-Campylobacter ; contient 0,05 % d'acide, prêt à l'emploi, de couleur jaune
Pipette	50 unités	Sachet de 50 pipettes multifonctions, graduées pour le pipetage d'échantillons liquides et dotées d'une spatule pour la mesure d'échantillons de selles solide
Reagent vial	25 unités	Sachet de 25 flacons de réaction

5. Les réactifs et leur conservation

On peut conserver le coffret entre 2 et 25 °C ; son contenu est utilisable jusqu'à la date de péremption imprimée. Aucune garantie de qualité ne peut être assumée après dépassement de la date de péremption. De même, le caractère utilisable des cassettes ne peut plus être garanti si leur emballage est endommagé.

6. Autres réactifs et accessoires nécessaires

- Agitateur Vortex (en option)
- Poubelle avec solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 %

7. Mesures de précaution

Uniquement pour un diagnostic *in vitro*.

Seul du personnel de laboratoire formé doit procéder à ce test. Respecter les directives de

travail en laboratoire médical. Respecter à la lettre les instructions de réalisation du test. Les réactifs contiennent un conservateur, l'azoture de sodium. Éviter tout contact avec la peau et les muqueuses.

Ne pas pipetter les échantillons ni les réactifs avec la bouche. Éviter tout contact avec les blessures cutanées et les muqueuses. Porter des gants jetables pour manipuler les échantillons et se laver les mains une fois que le test est terminé. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones où l'on travaille avec des échantillons ou des réactifs de test.

Tous les réactifs et matériels qui entrent en contact avec des échantillons potentiellement infectieux doivent, comme les échantillons eux-mêmes, être traités avec des désinfectants appropriés (p. ex. hypochlorite de sodium), ou à l'autoclave pendant une heure minimum à 121 °C.

8. Collecte et conservation des échantillons

Collecter les échantillons de selles dans des récipients propres, sans aucun adjuvant, et les conserver entre 2 et 8 °C avant de commencer le test. S'il faut conserver les échantillons plus de 3 jours, les congeler à – 20 °C. Dans ce cas, décongeler entièrement les échantillons et les porter à température ambiante avant de commencer le test. Éviter de congeler et de décongeler les échantillons plusieurs fois.

S'il faut utiliser des prélèvements rectaux, veiller à disposer d'une quantité de fèces suffisante pour effectuer le test (env. 50 mg).

9. Réalisation du test

9.1. Généralités

Avant utilisation, porter les échantillons, les réactifs ainsi que les cassettes de test à température ambiante (20 – 25 °C). Retirer les cassettes de test de leur emballage seulement juste avant de les utiliser. Les cassettes utilisées une fois ne sont plus réutilisables. Éviter l'ensoleillement direct pendant la réalisation du test. Ne pas verser les excédents de réactif dans les récipients car cela peut entraîner une contamination.

9.2. Préparation des échantillons

Avant utilisation, mélanger soigneusement tous les échantillons de selles pour répartir les antigènes de manière homogène.

Remarque :

Pour l'analyse de chaque échantillon, deux pipettes graduées Pipette sont disponibles et s'utilisent de la manière suivante :

Pipette 1 : pipetage du réactif A Reagent | A et de l'échantillon (50 µl ou 50 mg avec la spa-

tule, selon la consistance de l'échantillon).

Pipette 2 : pipetage du réactif B Reagent | B et mélange des réactifs A et B avec l'échantillon.

9.3. Analyse des échantillons

Dans un flacon de réaction étiqueté Reagent vial, pipeter 0,5 ml de réactif A Reagent | A avec la **pipette 1** et 0,5 ml de réactif B Reagent | B avec la **pipette 2**. Dans le mélange réactionnel, ajouter l'échantillon de selles de la **pipette 1** précédemment homogénéisé, soit 50 mg avec la spatule (en tenant compte du repère de la spatule), soit 50 µl (première graduation de la pipette) selon la consistance. Fermer hermétiquement le flacon de réaction et bien secouer pour mélanger le contenu (utiliser éventuellement un vortex). Placer le flacon de réaction dans le support de la trousse de test pendant au moins 5 min. Pendant ce temps, l'échantillon réagit avec le mélange réactionnel et les composants fécaux solides se déposent sous forme de sédiments. Entretemps, sortir la cassette de test Cassette amenée à température ambiante de son emballage et la placer sur une surface plane.

Dès que les 5 minutes du temps de réaction sont écoulées, ouvrir avec précaution le tube de réaction et utiliser la **pipette 2** pour prélever 150 µl (deuxième graduation de la pipette) de surnageant clarifié et le transvaser dans l'entonnoir d'échantillonnage sur le bord de la cassette. Veiller à ce que le liquide puisse s'écouler à travers la membrane sans obstruction. Si les conditions sont correctes, la bande de contrôle apparaîtra sur la ligne de contrôle C au bout d'environ 3 minutes. Si la ligne de contrôle n'est toujours pas visible au bout de 3 minutes, refermer le flacon de réaction et le centrifuger pendant 2 min à 2000 x g pour sédimenter les particules solides pouvant perturber la réaction. Ensuite, pipeter 150 µl de surnageant dans l'entonnoir d'échantillonnage d'une autre cassette.

Lire le résultat du test au bout de **15 minutes**. Au fur et à mesure du développement et après séchage de la barrette, l'intensité et la coloration des bandes peuvent évoluer de rouge-violet à gris-violet, en passant par bleu-violet.

9.3.1. Utilisation de cultures de Campylobacter liquides et solides

À l'aide d'une pipette, ajouter 50 µl de **bouillon de culture** (p. ex. bouillon Bolton) à 1,0 ml du mélange de réactifs préparé auparavant dans le flacon de réaction, composé du réactif A (0,5 ml) et du réactif B (0,5 ml), puis mélanger. On utilisera 150 µl de ce mélange pour tester les échantillons (point 9.3.).

Si l'on utilise des **bouillons de culture solides**, prélever le plus de colonies possible sur le fond des boîtes et les mettre d'abord en suspension complète dans 1 ml d'eau distillée ou de solution saline (NaCl à 0,9 %). Ensuite, à l'aide d'une pipette, ajouter 50 µl de cette suspension à 1,0 ml du mélange de réactifs préparé auparavant dans le flacon de réaction, composé du réactif A (0,5 ml) et du réactif B (0,5 ml), puis mélanger. On utilisera 150 µl de ce mélange pour tester les échantillons (point 9.3.).

10. Contrôle qualité – Signes de dégradation des réactifs

On ne peut exploiter les résultats du test que si la cassette de test est en parfait état avant de recevoir la suspension d'échantillon et si elle ne présente aucun changement de couleur ni aucune bande. En outre, on doit pouvoir voir au moins la bande de contrôle violet rouge après le temps d'incubation de 15 minutes. Si tel n'est pas le cas, vérifier les points suivants avant de refaire le test :

- durée de conservation des cassettes de test et des réactifs utilisés
- réalisation correcte du test
- contamination des réactifs

Si la bande de contrôle n'est toujours pas visible après répétition du test avec une nouvelle cassette de test, prière de contacter le fabricant ou le distributeur R-Biopharm local.

11. Exploitation et interprétation

Deux bandes au maximum doivent apparaître, dans l'ordre suivant vu depuis la case d'application de l'échantillon : une bande de réaction violet rouge sur la ligne de test T et une bande de contrôle violet rouge sur la ligne de contrôle C. **Si la bande de contrôle n'apparaît pas, le test ne peut être exploité et il n'est pas valable !**

Interprétations possibles :

- **Campylobacter positif** : les deux bandes sont visibles.
- **Campylobacter négatif** : seule la bande de contrôle est visible.
- **Non valable** : aucune bande n'est visible, ou l'agencement est différent de celui indiqué ci-dessus. De même, les colorations de bandes qui apparaissent seulement bien après 15 minutes n'ont aucune valeur diagnostique et sont inexploitable.

12. Limites de la méthode

Le test RIDA[®]QUICK Campylobacter détecte la présence d'antigènes de Campylobacter dans les échantillons de selles ou après leur enrichissement dans des cultures de Campylobacter. On ne peut pas en déduire une relation entre l'intensité de la bande spécifique visible et l'apparition ou la gravité des symptômes cliniques. **Toujours interpréter les résultats obtenus en corrélation avec le tableau clinique.**

Un résultat **positif** n'exclut pas la présence d'autres agents pathogènes ou sources d'infection.

Un résultat **négatif** n'exclut pas une infection éventuelle par *Campylobacter*. Il peut résulter d'une élimination intermittente de l'agent pathogène ou d'une quantité trop faible d'antigènes dans l'échantillon. Si l'anamnèse laisse craindre de manière justifiée une infection par l'agent pathogène recherché, analyser un autre échantillon de selles du patient.

Un échantillon de selles trop volumineux peut entraîner une coloration brunâtre de la bandelette d'essai, qui masque la coloration violet rouge de la bande de test spécifique. Dans ce cas, il faut refaire le test avec une quantité de selles moindre ou avec une suspension de selles mieux éclaircie par centrifugation, afin de déterminer si les antigènes de *Campylobacter* recherchés sont présents dans l'échantillon mais ont été masqués par une matrice fécale trop abondante.

13. Caractéristiques de performances

13.1 Qualité du test

Dans le cadre d'une étude, la performance du test rapide RIDA®QUICK *Campylobacter* a été comparée à l'étalon-or, une culture de l'agent pathogène sur CCD-agar en conditions micro-aérophiles. Pour cela, 574 échantillons de selles provenant du diagnostic quotidien d'un laboratoire qui les a envoyés ont été analysés avec le test rapide RIDA®QUICK *Campylobacter*. Les résultats sont résumés dans le tableau 1 ci-après.

Tab. 1 : Comparaison entre RIDA®QUICK *Campylobacter* et la culture sur plaques CCDA

		Culture (CCDA)	
		positif	négatif
RIDA®QUICK <i>Campylobacter</i>	positif	62	7
	négatif	1	504

Sensibilité :	98,4 %
Spécificité :	98,6 %
VPP :	89,8 %
VPN :	99,8 %

13.2 Sensibilité analytique

La limite de détection analytique a été déterminée séparément pour *C. jejuni* et *C. coli*. Elle correspond à la concentration minimale de germes pouvant être jugée positive comme bande

juste encore visible dans RIDA®QUICK Campylobacter. Elle a été déterminée à partir de 60 approches de test avec des cassettes provenant de deux lots différents et par 3 lecteurs différents (95% IC) ; elle s'élève à $2,1 \times 10^4$ UFC/ml pour Campylobacter jejuni et à $8,5 \times 10^5$ UFC/ml pour Campylobacter coli.

13.3 Précision

Pour déterminer la précision du test RIDA®QUICK Campylobacter, on a analysé la reproductibilité intra-dosage, la reproductibilité inter-jour (10 jours), la reproductibilité inter-opérateur (3 opérateurs) et la reproductibilité inter-lot (3 lots). Cinq répliques de références ont été mesurées pour chaque analyse : un échantillon négatif, deux moyennement positifs, deux faiblement positifs. Toutes les mesures ont donné le résultat attendu pour le test RIDA®QUICK Campylobacter.

13.4 Réactivité croisée

Différents germes pathogènes du tractus intestinal ont été testés avec le test rapide RIDA®QUICK Campylobacter et n'ont montré aucune réactivité croisée. Les tests ont été réalisés avec des suspensions bactériennes (10^6 à 10^9 UFC/ml), avec des cultures de parasites (10^7 à 10^9 organismes/ml) et avec des surnageants de cultures de cellules infectées par un virus. Les résultats sont énumérés dans le tableau 2 ci-après. À part les deux souches de Campylobacter C. jejuni et C. coli, aucun des organismes testés n'a réagi dans le test rapide RIDA®QUICK Campylobacter.

Tab. 2 : Réactions croisées avec des germes pathogènes du tractus intestinal

Germe testé	Origine/Source	Résultat
Adénovirus	Surnageant de culture infectieux	négatif
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Culture	négatif
Astrovirus	Surnageant de culture infectieux	négatif
<i>Bacillus cereus</i>	Culture	négatif
<i>Bacteroides fragilis</i>	Culture	négatif
<i>Campylobacter coli</i>	Culture	positif
<i>Campylobacter fetus</i>	Culture	négatif
<i>Campylobacter jejuni</i>	Culture	positif
<i>Campylobacter lari</i>	Culture	négatif
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	Culture	négatif
<i>Candida albicans</i>	Culture	négatif

<i>Citrobacter freundii</i>	Culture	négatif
<i>Clostridium difficile</i>	Culture	négatif
<i>Clostridium perfringens</i>	Culture	négatif
<i>Clostridium sordellii</i>	Culture	négatif
<i>Cryptosporidium muris</i>	Culture	négatif
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Culture	négatif
<i>E. coli</i> (O26:H-)	Culture	négatif
<i>E. coli</i> (O6)	Culture	négatif
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Culture	négatif
<i>Enterobacter cloace</i>	Culture	négatif
<i>Enterococcus faecalis</i>	Culture	négatif
Échantillon avec <i>Giardia intestinalis</i>	Échantillon de selles	négatif
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Culture	négatif
<i>Proteus vulgaris</i>	Culture	négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Culture	négatif
Rotavirus	Surnageant de culture infectieux	négatif
<i>Salmonella enteritidis</i>	Culture	négatif
<i>Salmonella typhimurium</i>	Culture	négatif
<i>Serratia liquefaciens</i>	Culture	négatif
<i>Shigella flexneri</i>	Culture	négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Culture	négatif
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Culture	négatif
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Culture	négatif
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Culture	négatif

14. Substances interférentes

Les substances énumérées ci-après n'ont eu aucun effet sur les résultats de test, après avoir été ajoutées aux échantillons de selles *Campylobacter jejuni* ou *Campylobacter coli* positifs et négatifs dans les concentrations indiquées :

Sulfate de baryum (5 % m/m), lopéramide (antidiarrhéique, 5 % m/m), peptobismol (antidiarrhéique, 5 % v/m), mucine (5 % m/m), cyclamate (édulcorant artificiel, 5 % v/m), sang humain (5 % v/m), acide stéarique / acide palmitique (mélange 1:1, 40 % m/m), métronidazole 0,5 (antibiotique, 5 % v/m), diclofénac (0,00263 % v/m).

Bibliographie

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, Highes 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.