

# RIDA<sup>®</sup> QUICK Campylobacter

Cod. art.: N2403



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany  
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Campo di applicazione

Per diagnostica *in vitro*. RIDA<sup>®</sup>QUICK Campylobacter è un test rapido immunocromatografico per la rilevazione qualitativa di antigeni di *Campylobacter jejuni* e di *Campylobacter coli* nei campioni di feci e nelle colture.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

La campilobatteriosi è considerata a livello internazionale, come la salmonellosi, tra le malattie batteriche gastrointestinali dell'uomo più diffuse al mondo. L'elevata frequenza di enterite da campylobacter è favorita dall'ampia diffusione estesa a tutte le specie del batterio negli animali da allevamento, da selvaggina e da compagnia (uccelli e mammiferi).

Come commensale nel tratto gastrointestinale di pollame viene trasmesso in particolare da questi animali alle derrate alimentari umane. Ci sono però anche altre modalità di acquisizione dell'infezione ossia mediante alimenti quali il latte, la carne macinata e l'acqua potabile. Il *Campylobacter* viene rilasciato nell'ambiente in grandi quantità da numerosi ospiti e passa all'uomo tramite cibo contaminato. Altre possibili vie di trasmissione dell'enterite da campylobacter sono anche il contatto diretto con animali domestici infetti da campilobatteriosi così come il contatto con le feci, particolarmente in età infantile. La dose di infezione con 500 germi è piuttosto bassa. Di tutte le 15 specie di campylobacter conosciute gli agenti che provocano la gastroenterite nell'essere umano sono soprattutto il *C. jejuni* e il *C. coli*. Dopo un periodo di incubazione che va dai 2 ai 10 giorni la persona infetta non curata secerne con le feci l'agente patogeno per un massimo di 4 settimane. In caso di immunodeficienza possono verificarsi espulsioni ripetute e continue. Mentre alcune infezioni decorrono in forma asintomatica, nelle persone infette vi è una fase prodromica caratterizzata da febbre, emicrania, mialgia, artrite reattiva e stanchezza seguita dai tipici sintomi di enterite con diarrea e dolori crampiformi addominali. L'intensità della diarrea varia da diverse scariche di feci liquide sino a feci francamente ematiche. Complicanze dell'infezione sono l'artrite reattiva e la rara sindrome di Guillain-Barré.

Il trattamento si basa prevalentemente sulla sintomatologia presentata dal paziente e prevede la correzione dello stato di disidratazione e dei disordini elettrolitici, mentre la terapia antibiotica è indicata soltanto per casi gravi.

Per garantire il successo della coltura di agenti sensibili prelevati da campioni di feci freschi occorre trasportarli per il più breve tempo possibile o conservati refrigerati. Dalle modalità di trasporto sono indipendenti le procedure moderne di rilevazione di antigeni come il test rapido RIDA<sup>®</sup>QUICK Campylobacter che rileva antigeni specifici di campylobacter nei campioni di feci anche quando gli agenti patogeni non sono più coltivabili.

## 3. Principio del test

Il presente test veloce è un test immunocromatografico Lateral Flow ad un livello per il quale ven-

gono impiegati sia gli anticorpi biotinilati che quelli anti-campylobacter segnati con color oro. Se l'agente patogeno è presente in un campione positivo, si creano complessi immuni con gli anticorpi anti-campylobacter segnati che passano nella membrana. La streptavidina che si trova nella linea del test T fissa i complessi immuni in arrivo mediante la biotina accoppiata all'anticorpo anti-campylobacter e si verifica una colorazione rosso violaceo della linea T. Sulla successiva linea di controllo C vengono fissati anticorpi continui, segnati con color oro non complessi. Nei campioni negativi i complessi immuni segnati con color oro non vengono fissati sulla linea T, bensì sulla linea C. La linea C rossa indica sempre se il decorso del test è stato valido.

#### 4. Contenuto della confezione

I reagenti di una confezione bastano per 25 determinazioni

<b>Cassette</b>	25 det.	25 cassette singole per cassette test imballate
<b>Reagent A</b>	13,5 ml	anticorpi specifici anti-campylobacter; contiene lo 0,05% di azoturo; pronto per l'uso, di colore blu.
<b>Reagent B</b>	13,5 ml	anticorpi specifici anti-campylobacter; contiene lo 0,05% di azoturo; pronto per l'uso, di colore giallo.
<b>Pipette</b>	50 cad.	Sacchetto da 50 pipette multifunzione graduate per il pipettaggio di campioni liquidi, con spatola per la misurazione di campioni di feci solide
<b>Reagent vial</b>	25 cad.	Sacchetto da 25 flaconcini

#### 5. Reagenti e relativa conservazione

La confezione deve essere conservata a 2-25 °C ed è utilizzabile fino alla data di scadenza indicata. Dopo la data di scadenza non può essere più fornita alcuna garanzia di qualità. Non si può altro modo assicurare l'utilizzabilità delle cassette nel caso in cui la confezione delle stesse sia stata danneggiata.

#### 6. Reagenti aggiuntivi necessari - accessori richiesti

- Miscelatore Vortex (optional)
- Cestino per rifiuti con una soluzione di sodio-ipoclorito da 0,5%

#### 7. Precauzioni

Solo per diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le disposizioni per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso nell'esecuzione del test. I reagenti contengono il conservante azoturo di sodio. Evitare il contatto con la pelle o con le mucose.

Non introdurre con la bocca campioni o reagenti mediante pipetta. Evitare il contatto con la cute

lesa o con le mucose. Durante la manipolazione dei campioni indossare guanti monouso e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

Tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati con adeguato disinfettante (p.e. sodio-ipoclorite) o sottoposti a sterilizzazione a vapore per almeno un'ora a 121 °C.

## 8. Raccolta e deposito dei campioni

Raccogliere i campioni di feci in contenitori puliti senza additivi e prima di iniziare il test deporli a 2-8°C. In caso di deposito per più di 3 giorni occorre congelare il campione a -20 °C. In questo caso far scongelare completamente il campione prima di iniziare il test e portarlo a temperatura ambiente. Evitare assolutamente il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni.

Se devono essere impiegati tamponi rettali occorre assicurarsi che sia disponibile abbastanza campione di feci (circa 50 mg) per l'esecuzione del test.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1. Generalità

Prima dell'utilizzo portare tutti i campioni, i reagenti e le cassette per il test a temperatura ambiente (20 -25 °C). Togliere l'involucro delle cassette per il test solo poco prima del loro impiego. Le cassette non possono essere utilizzate più di una volta. Evitare l'esposizione diretta ai raggi solari durante l'esecuzione del test. Il reagente avanzato non deve riessere inserito nei contenitori in quanto potrebbe contaminarli.

### 9.2. Preparazione dei campioni

Prima dell'uso, tutti i campioni di feci devono essere accuratamente miscelati per garantire una distribuzione omogenea degli antigeni.

#### **Nota:**

Per ogni test sui campioni, sono disponibili due pipette graduate **Pipette** da utilizzare come segue:

**Pipetta 1:** per il pipettaggio del Reagente A **Reagent | A** e del campione (50 µl o 50 mg con la spatola a seconda della consistenza).

**Pipetta 2:** per il pipettaggio del Reagente B **Reagent | B** e della miscela di Reagente A e B con il campione.

### 9.3. Test di campioni

In un flacone di reagente con etichetta **Reagent vial**, pipettare 0,5 ml di Reagente A **Reagent A** utilizzando la **Pipetta 1** e 0,5 ml di Reagente B **Reagent B** utilizzando la **Pipetta 2**. Aggiungere il campione di feci precedentemente omogeneizzate: 50 mg della **Pipetta 1** utilizzando la spatola (notare il segno sulla spatola) o 50 µl (prima tacca sulla pipetta), a seconda della consistenza, a questa miscela di reagente. Chiudere ermeticamente il flacone di reazione e agitare bene il contenuto per miscelarlo (in alternativa, vorticare). Estrarre il flacone di reazione dal kit del test e collocarlo sul telaio per almeno 5 min. Durante questo intervallo di tempo il campione reagisce con la miscela di reagente, mentre i componenti fecali solidi sedimentano. Nel frattempo, prelevare la cassetta del test **Cassette** a temperatura ambiente dalla confezione e collocarla su una superficie piana.

Trascorsi i 5 minuti del tempo di reazione, aprire con cautela il contenitore di reazione e utilizzare la **Pipetta 2** per prelevare 150 µl (seconda tacca sulla pipetta) di surnatante chiarificato e pipettarlo nell'imbuto del campione sul bordo della cassetta. Assicurarsi che il liquido fluisca attraverso la membrana senza difficoltà. Se il procedimento viene eseguito correttamente, dopo circa 3 minuti la banda di controllo appare sulla linea di controllo C. Se la linea di controllo non è visibile dopo 3 minuti, il flacone di reazione deve essere richiuso e centrifugato per 2 min a 2000 x g al fine di lasciar sedimentare eventuali particelle solide problematiche. In seguito, pipettare 150 µl di surnatante nell'imbuto del campione di una nuova cassetta.

Leggere il risultato del test dopo **15 minuti**. Per l'intero tempo di sviluppo e dopo l'essiccazione della striscia, la colorazione e l'intensità delle bande può variare dal rosso-violetto al blu o al grigio-violetto.

#### 9.3.1. Impiego di colture liquide e solide di campylobacter

50 µl di un **brodo nutritivo** (p.e. brodo bolton) vengono inseriti mediante pipetta in 1,0 ml della miscela di reagenti preparata prima nel recipiente per reazione composta da reagente A (0,5 ml) e reagente B (0,5 ml) e mescolati. Della miscela vengono impiegati 150 µl per la verifica dei campioni (par. 9.3.).

In caso di impiego di **terreno nutritivo solido** vengono prelevate più possibili colonie di piastre di terreno nutritivo e messe subito in sospensione completamente in 1 ml d'acqua dist. oppure di soluzione salina (0,9% NaCl). 50 µl di questa sospensione vengono poi inseriti mediante pipetta in 1,0 ml della miscela di reagenti preparata prima nel recipiente per reazione composta da reagente A (0,5 ml) e reagente B (0,5 ml) e mescolati. Della miscela vengono impiegati 150 µl per la verifica dei campioni (par. 9.3.).

## 10. Controllo della qualità - Segni di scadenza dei reagenti

E' possibile analizzare il test solamente se la cassetta per test è intatta prima dell'inserimento mediante pipette della sospensione di campioni e se sulla stessa non sono visibili mutamenti di colore o bande colorate. Inoltre dopo 15 minuti di tempo di incubazione deve essere almeno

visibile la banda di controllo rosso violaceo. Se non compare, prima della ripetizione del test verificare quanto segue:

- Periodo di conservazione della cassetta per test e dei reagenti utilizzati
- Corretta esecuzione del test
- Contaminazione dei reagenti

Se anche in caso di ripetizione del test con una nuova cassetta da test non compare la banda di controllo, rivolgersi al produttore o al distributore locale R-Biopharm.

## 11. Valutazione e interpretazione

Possono comparire al massimo due bande, dalla prospettiva del campo di applicazione dei campioni nella seguente sequenza: Una banda di reazione rosso violacea sulla linea del test T ed una banda di controllo rosso violacea sulla linea di controllo C. **Se manca la banda di controllo non si può analizzare il test che risulta pertanto non valido!**

Sono possibili le seguenti interpretazioni:

- **Campylobacter positivo** : entrambe le bande sono visibili.
- **Campylobacter negativo** : è visibile solo la banda di controllo.
- **Non valido**: Nessuna banda visibile o in un'altra costellazione rispetto a quanto sopra descritto. Anche colorazioni delle bande che dovessero comparire molto dopo i 15 minuti non hanno valore diagnostico e non sono pertanto analizzabili.

## 12. Limiti del metodo

Il RIDA<sup>®</sup>QUICK Campylobacter attesta la presenza di antigeni di Campylobacter in campioni di feci oppure dopo il loro inserimento in colture di Campylobacter. Non è possibile dedurre una relazione tra l'intensità delle bande specifiche visibili e l'insorgenza o la gravità della sintomatologia clinica. **I risultati ottenuti devono essere sempre interpretati in relazione al quadro clinico.**

Un risultato **positivo** non esclude la presenza di altri agenti patogeni infettivi.

Un risultato **negativo** non esclude la possibile infezione con campylobacter. Essa può essere causata da espulsione intermittente dell'agente patogeno o da quantità troppo bassa di antigene nel campione. Se in relazione all'anamnesi vi è un sospetto fondato di un'infezione con l'agente patogeno ricercato, occorre esaminare un ulteriore campione di feci del paziente.

Un'eccedenza di campione di feci può causare una colorazione marrone delle strisce del test che si va a sovrapporre alla colorazione rosso violaceo della banda del test specifica. In questi casi è necessario eseguire un nuovo test con minor quantità di feci o con una sospensione di

feci maggiormente chiarificata mediante centrifugazione, al fine di capire se l'antigene di campylobacter ricercato si trova nelle feci ed è stato sovrapposto da troppa matrice di feci impiegata.

### 13. Prestazioni opzionali

#### 13.1 Qualità del test

L'efficienza delle prestazioni del test veloce RIDA® QUICK Campylobacter è stata comparata in uno studio con il Goldstandard, la coltura dell'agente patogeno su agar CCD in condizioni microaerofile. A tal fine sono stati testati in totale 574 campioni di feci dalla diagnostica quotidiana di un laboratorio con il test veloce RIDA® QUICK Campylobacter.

I risultati sono riassunti nella seguente tabella 1.

Tab.1: Confronto del RIDA® QUICK Campylobacter con la coltura su piastre CCDA

		Coltura (CCDA)	
		positiva	negativa
RIDA® QUICK Campylobacter	positiva	62	7
	negativa	1	504

Sensibilità:	98,4%
Specificità:	98,6%
PPW:	89,8%
NPW:	99,8%

#### 13.2 Sensibilità analitica

Il limite di attestazione analitico è stato stabilito in modo separato per i C. jejuni e per i C. coli. Viene descritta la concentrazione più bassa di germi che può essere misurata con RIDA® QUICK Campylobacter ancora come positiva se la banda è visibile. Essa è stato stabilita da una quota di 60 parti con cassette da due diversi lotti e 3 diversi lettori (CI 95%) e si attesta per il campylobacter jejuni su  $2,1 \times 10^4$  KBE/ml) e per il campylobacter coli sull' $8,5 \times 10^5$  KBE/ml.

#### 13.3 Precisione

Per stabilire la precisione del test RIDA® QUICK Campylobacter sono state esaminate la riproducibilità Intra-Assay, la riproducibilità Inter-Tag (10 giorni), la riproducibilità Inter-Operator

(3 operatori) e la riproducibilità Inter-Lot (3 lotti). Per ogni esame sono state misurate 5 referenze in replicazioni: un campione negativo, due molto positivi e due quasi positivi. Il test RIDA<sup>®</sup>QUICK Campylobacter ha attestato in tutte le misurazioni il risultato previsto.

#### 13.4 Crossreattività

Sono stati esaminati diversi germi patogeni del tratto gastrointestinale con il test veloce RIDA<sup>®</sup>QUICK Campylobacter e non sono emersi casi di crossreattività. Sono stati eseguiti esami con sospensioni di batteri (da 10<sup>6</sup> a 10<sup>9</sup> KBE/ml), con colture di parassiti (da 10<sup>7</sup> a 10<sup>9</sup> organismi/ml) e con cellule infettate con il virus del supernatante della coltura di cellule. I risultati sono elencati nella seguente tabella 2. Tranne le due specie di Campylobacter *C. jejuni* e *C. coli* nessuno degli organismi testati ha reagito nel test veloce RIDA<sup>®</sup>QUICK Campylobacter.

Tab. 2 : Reazioni crociate con germi patogeni del tratto gastrointestinale

Germe del test	Origine/fonte	Risultato
Adenovirus	Supernatante infetto di coltura	Negativo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Coltura	Negativo
Astrovirus	Supernatante infetto di coltura	Negativo
<i>Bacillus cereus</i>	Coltura	Negativo
<i>Bacteroides fragilis</i>	Coltura	Negativo
<i>Campylobacter coli</i>	Coltura	Positivo
<i>Campylobacter fetus</i>	Coltura	Negativo
<i>Campylobacter jejuni</i>	Coltura	Positivo
<i>Campylobacter lari</i>	Coltura	Negativo
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	Coltura	Negativo
<i>Candida albicans</i>	Coltura	Negativo
<i>Citrobacter freundii</i>	Coltura	Negativo
<i>Clostridium difficile</i>	Coltura	Negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	Coltura	Negativo
<i>Clostridium sordellii</i>	Coltura	Negativo
<i>Cryptosporidium muris</i>	Coltura	Negativo
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Coltura	Negativo
<i>E. coli</i> (O26:H-)	Coltura	Negativo
<i>E. coli</i> (O6)	Coltura	Negativo
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Coltura	Negativo
<i>Enterobacter cloace</i>	Coltura	Negativo



<i>Enterococcus faecalis</i>	Coltura	Negativo
Campione Giardia lamblia	Campione di feci	Negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Coltura	Negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	Coltura	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Coltura	Negativo
Rotavirus	Supernatante infetto di coltura	Negativo
<i>Salmonella enteritidis</i>	Coltura	Negativo
<i>Salmonella typhimurium</i>	Coltura	Negativo
<i>Serratia liquefaciens</i>	Coltura	Negativo
<i>Shigella flexneri</i>	Coltura	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coltura	Negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coltura	Negativo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Coltura	Negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Coltura	Negativo

#### 14. Sostanze interferenti

Le seguenti sostanze non hanno avuto alcun effetto sui risultati del test quando sono state mescolate con le concentrazioni indicate nei campioni di feci positivi e negativi campylobacter jejuni o campylobacter coli.

Solfato di bario (5 % w/w), loperamid (antidiarroico, 5 % w/w), pepto-bismol (antidiarroico; 5 % v/w), muzin (5 % w/w), ciclammato (dolcificante artificiale 5 % v/w), sangue umano (5 % v/w), acido stearico / acido palmitico (miscela 1:1, 40 % w/w), metronidazol (0.5) (antibiotico 5 % v/w), diclofenac (0.00263 % v/w).

## Letteratura

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 cow milk. J Appl Bacteriol 65: 93 – 96.
5. 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.