

recomWell Campylobacter IgG

recomWell Campylobacter IgA

Enzymimmun-Test mit rekombinant produzierten Antigenen zur Bestimmung von IgG- oder IgA-Antikörpern gegen *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in humanem Serum oder Plasma.

1. Allgemeines, Verwendungszweck

Der **recomWell Campylobacter** ist ein qualitativer bzw. quantitativer in vitro Test zum Nachweis und zur sicheren Identifizierung von IgG- oder IgA-Antikörpern gegen *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in humanem Serum oder Plasma. Der **recomWell Campylobacter** ist ein Screening-Test nach dem Prinzip eines indirekten Sandwich-ELISAs.

2. *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*

Bei der Gattung *Campylobacter* handelt es sich um gramnegative, spiralförmige, mikroaerophile meso- bis thermophile Stäbchenbakterien, die bipolar begeißelt sind. 1963 erhielt der bereits 1889 von Escherich beschriebene Keim die Bezeichnung *Campylobacter jejuni* von Sebald und Vernon. Die Isolation aus Stuhlproben gelang 1972 Dekeyser und Mitarbeiter. Eine Lebensmittelassoziation wurde 1981/1982 von Jones und Kollegen festgestellt. Bezüglich der Taxonomie wird *Campylobacter* der Epsilon-Gruppe der Proteobakterien zugeordnet.

Das Erregerreservoir ist hauptsächlich der Darmtrakt von warmblütigen Wild-, Nutz- und Heimtieren (Vögel und Säugetiere).

Intestinale *Campylobacter*-Infektionen stehen in Deutschland knapp nach den enteralen Salmonellosen an zweiter Stelle aller gemeldeten akuten, bakteriellen Enteritiden (RKI Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten 2006: Salmonellen 52.319, *Campylobacter* 51.764) wobei überwiegend *Campylobacter jejuni* mit mehr als 90% gegenüber *Campylobacter coli* mit ca. 9% vorkommt.

Hauptinfektionsquelle sind kontaminierte Lebensmittel (vorwiegend Geflügel) oder Trinkwasser (tropische Länder). Die Dunkelziffer von nicht erkannten und statistisch nicht erfassten Fällen liegt wahrscheinlich um ein Vielfaches höher. Die jährliche Inzidenzrate weist jahreszeitlich (höhere Raten in den Sommermonaten) und regional bedingte Unterschiede auf, wobei sich der Nachweis nach Aufenthalt in warmen Ländern wegen der bedeutend höheren Inzidenz in der Dritten Welt über das ganze Jahr erstreckt.

Akute Erkrankung:

Die *Campylobacter*-Infektion ist nahezu ausschließlich eine orale Infektion, der Erreger ist weitgehend an den Darm adaptiert; seltener sind systemische Infektionen bis hin zur Meningitis (besonders bei abwehrgeschwächten Patienten, bei Säuglingen oder im vorgeschrittenen Alter) zu beobachten (Skirrow & Blaser, 2000). Die Inkubationszeit ist kurz (1-7 Tage) und vermutlich abhängig von der Infektionsdosis. Neben nahezu asymptomatisch verlaufenden Infektionen finden sich schmerzhafte gastrointestinale Symptome mit teils blutigen Diarrhöen, Fieber, Meningismus und Myalgien. Das akute Krankheitsbild ist bei den meisten Patienten auf wenige Tage beschränkt. Die Infektion verläuft überwiegend selbstlimitierend, schwere Flüssigkeits- und Elektrolytverluste sind jedoch entsprechend auszugleichen.

Infektions-Folgeerkrankungen:

Im zeitlichen Abstand von wenigen Wochen nach enteralen, häufig aber auch urogenitalen Infektionen, durch bestimmte bakterielle und virale Erreger sind **Reaktive Arthritiden (ReA)** als Folgeerkrankung bekannt. Neben urogenitalen Mycoplasmen und Chlamydien und den enteralen Salmonellen, Shigellen, Yersinien sind besonders auch *Campylobacter spp.* bei vorausgegangenen Infektionen diagnostiziert worden (Locht & Krogfeldt, 2002; Cox et al., 2003; Hannu et al., 2004). Der pathophysiologische Hintergrund beruht vermutlich auf der molekularen Mimikry kreuzreagierender Antikörper gegen Antigene der Synovialmembran. Durch die Erhebung entsprechender Laborparameter können Arthritiden unklarer Genese in einigen Fällen einer infektreaktiven Arthritis zugeordnet werden, und nicht fälschlicherweise den rheumatischen Arthritiden.

Ähnlich den Reaktiven Arthritiden kann es im zeitlichen Abstand von wenigen Wochen nach meist

enteralen oder respiratorischen Infektionen durch bestimmte bakterielle und virale Erreger zum **Guillain-Barré-Syndrom (GBS)** kommen. Man geht von einer geschätzten Häufigkeit von 1:1.000 bis 1:10.000 aus. Das GBS ist eine akute immunvermittelte Polyradikuloneuropathie, hervorgerufen durch eine abnorme humorale Immunantwort gegen die periphere Myelinscheide und/oder gegen das Axon. Neben einer Reihe von Viren (z.B. CMV, EBV, VZV, Masernvirus, Mumpsvirus), *Mycoplasma pneumoniae* und Bakterien (*Borrelia burgdorferi*, *Haemophilus influenzae*) sind vor allem *Campylobacter* spp., hauptsächlich *Campylobacter jejuni*, als Erreger einer vorausgegangenen Infektion in verschiedenen Fallkontroll-Studien mit einer Häufigkeit von 30% und darüber überwiegend aufgrund serologischer Befunde berichtet worden (Nachamkin et al., 2000; Prendergast et al., 2004; Gilbert et al., 2004; Leonard et al., 2004). Direkte Erreger-Nachweisverfahren waren dabei meistens negativ. Pathophysiologisch kreuzreagieren Erreger-spezifische Antikörper mit neuronalen Antigenen (u.a. Moran et al., 2000; Yuki et al., 2004) und führen durch Aktivierung von Entzündungsmediatoren zur Invasion von Makrophagen und nachfolgendem lokalem Mikroödem, mit vorübergehendem oder auch bleibendem Ausfall der betroffenen Neuronen. Demzufolge finden sich beim GBS sowohl rein motorische („AMAN“ = acute motor axonal neuropathy, „AIDP“ = acute inflammatory demyelinating polyneuropathy) als auch sensible und gemischte („ANSAM“ = acute motor-sensory axonal neuropathy) neurologische Ausfälle. Leichte und reversible Verläufe kommen neben schweren Verläufen mit bleibenden Lähmungen vor; etwa 5% der GBS-Erkrankungen enden letal. Der Krankheitsverlauf scheint direkt proportional zur Höhe des spezifischen Antikörpertiters zu sein. Klinische Beobachtungen und erste Befunde aus Surveillance-Studien zur „schlaffen Lähmung“ (Differentialdiagnose Poliomyelitis) legen den Verdacht nahe, dass diskrete, vorübergehende Lähmungssymptome im Sinne von Ermüdungserscheinungen der Extremitäten nach vorangegangenen Infektionen pathophysiologisch sehr viel häufiger einem inapparenten GBS entsprechen als bisher angenommen wurde.

3. Diagnostik

Bei Verdacht auf eine *Campylobacter*-Infektion ist die bakteriologische Stuhlkultur, bevorzugt auf Selektivmedien, das diagnostische Standardverfahren (MIQ, Kist et al., 2000). Allerdings kann wegen der speziellen Ansprüche der Erreger das Ergebnis bzw. die Speziesdiagnose zwei bis drei Tage in Anspruch nehmen. Serologische Antikörperrnachweisverfahren sind bei akut erkrankten Patienten wie bei anderen bakteriellen enteralen Infektionen wenig aussagekräftig und kommen allenfalls zur ätiologischen Klärung zur Anwendung, wenn die Erreger nicht mehr nachweisbar sind. In der Regel werden jedoch *Campylobacter* spp. in der Rekonvaleszenz sporadisch, u.U. über mehrere Wochen ausgeschieden, wobei sich negative mit positiven Stuhlproben abwechseln können. Dauerausscheider über viele Monate werden gelegentlich beobachtet. Sie bilden möglicherweise ein Teilkollektiv der Patienten mit Infektions-Folgeerkrankungen.

Die *Campylobacter*-Infektion ist nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtig.

Wegen ihrer relativen Häufigkeit unter den Ursachen postinfektiöser Komplikationen, gehört die serologische Identifizierung von Antikörpern gegen *Campylobacter* spp. zu den unerlässlichen Standardmethoden bei Patienten mit Infektions-Folgeerkrankungen. Diese lassen sich sowohl mittels Komplementbindungsreaktionen (KBR), ELISA-Verfahren als auch durch Immunoblots durchführen.

Campylobacter-Infektionen werden bisher noch unterschätzt. Häufig kommen bei meist geringen Untersuchungszahlen KBR-Teste (Komplement-Bindungsreaktion) zum Einsatz, wobei eine sehr hohe Spezifität durch Verwendung von Gesamtprotein in Hinblick auf die Kreuzreaktivität nicht gewährleistet ist. Erkannt werden bei der KBR IgG- und IgM-Antikörper, der Nachweis von IgA-Antikörpern ist nicht möglich, ebenso keine Differenzierung zwischen IgG- bzw. IgM-Antikörpern.

4. Testprinzip

Die im **recomWell Campylobacter** verwendeten Antigene werden gentechnologisch dargestellt. Dadurch kann eine optimale Darreichung ohne andere störende und kreuzreagierende Proteine erreicht werden. Nur die spezifischen und für die sensitive serologische Diagnostik wichtigen Antigene werden verwendet, was den *recomWell Campylobacter* gegenüber einem ELISA mit Lysat-Antigen auszeichnet.

Neben PEB4 (zytoplasmatisches Membranprotein, 31 kDa), wird auch OMP18 (outer membrane protein, äußeres Membranprotein, Peptidoglykan-assoziiertes Lipoprotein, 18 kDa) und P39 (mögliches ATP/GTP bindendes Protein) im *recomWell Campylobacter* präsentiert.

Die IgG- und IgA-Immunantworten werden getrennt erfasst.

5. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

Jeder Reagenziensatz enthält:

WASHBUF 10 X	100 ml	Waschpuffer (zehnfach konzentriert) Enthält Phosphat-Puffer, NaCl, Detergenz, Konservierungsmittel: MIT (0,01%) und Oxyprion (0,1%)
DILUBUF	125 ml	Verdünnungspuffer (gebrauchsfertig) Enthält Protein, Detergenz und blauen Farbstoff. Konservierungsmittel: MIT (0,01%) und Oxyprion (0,1%)
SUBS TMB	12 ml	Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, gebrauchsfertig)
SOLN STOP	12 ml	Stopplösung 24,9% Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)
INSTRU	1	Gebrauchsinformation
EVALFORM	1	Auswertebogen
TAPE	2 Stück	Abdeckfolien

5.1. recomWell Campylobacter IgG

Jeder Reagenziensatz enthält zusätzlich zu den unter Punkt 5 aufgeführten Komponenten:

MTP	12 x 8 Kavit.	Mikrotiterplatte (Riegel rot markiert) beschichtet mit rekombinanten Campylobacter Antigenen im Vakuum-Druckverschlußbeutel
CONTROL + IgG	450 µl	Positive Kontrolle (Violette Verschlusskappe) enthält MIT (0,1%) und Oxyprion (0,1%)
CONTROL ± IgG	450 µl	Cutoff Kontrolle (Gelbe Verschlusskappe) enthält MIT (0,1%) und Oxyprion (0,1%)
CONTROL - IgG	450 µl	Negative Kontrolle (Weiß e Verschlusskappe) enthält MIT (0,1%) und Oxyprion (0,1%)
CONJ IgG	500 µl	Anti-human IgG Konjugat (101fach konzentriert, Rote Verschlusskappe) enthält NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,01%) und Chlorazetamid (<0,1%)

5.2. recomWell Campylobacter IgA

Jeder Reagenziensatz enthält zusätzlich zu den unter Punkt 5 aufgeführten Komponenten:

MTP	12 x 8 Kavit.	Mikrotiterplatte (Riegel blau markiert) beschichtet mit rekombinanten Campylobacter Antigenen im Vakuum-Druckverschlußbeutel
CONTROL + IgA	450 µl	Positive Kontrolle (Braune Verschlusskappe) enthält MIT (0,1%) und Oxyprion (0,1%)
CONTROL ± IgA	450 µl	Cutoff Kontrolle (Orange Verschlusskappe) enthält MIT (0,1%) und Oxyprion (0,1%)
CONTROL - IgA	450 µl	Negative Kontrolle (Weiß e Verschlusskappe) enthält MIT (0,1%) und Oxyprion (0,1%)
CONJ IgA	500 µl	Anti-human IgA Konjugat (101fach konzentriert, Blaue Verschlusskappe) enthält NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,01%) und Chlorazetamid (<0,1%)

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

Deionisiertes Wasser (hohe Qualität), Teströhrchen, Mikropipetten, Inkubationsschrank 37°C, Mikrotiterplatten-Photometer

7. Hinweise zum Test und den Reagenzien

7.1. Vorsichtsmaßnahmen

- ☞ Für die Herstellung der Kontrollseren wird Blut von Spendern verwendet, bei denen keine Antikörper gegen HIV 1/2, HCV und kein Hepatitis-Bs-Antigen nachgewiesen wurden. Da trotzdem eine Infektion nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, muss das Produkt mit der gleichen Sorgfalt behandelt werden wie eine Patientenprobe.
- ☞ Während des gesamten Testablaufs müssen geeignete Einmalhandschuhe getragen werden.
- ☞ Die Konjugate enthalten Natriumazid, MIT (Methylisothiazolon) und Chlorazetamid. Die Kontrollen, der Verdünnungspuffer und der Waschpuffer enthalten MIT und Oxyprion. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- ☞ Phosphorsäure ist reizend. Kontakt mit Haut und Schleimhäuten unbedingt vermeiden.
- ☞ Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben in Berührung kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens 1 Stunde bei 121°C autoklaviert werden.

7.2. Hinweise zur Handhabung

Die Packungen tragen ein Verfallsdatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.

Die Komponenten Verdünnungspuffer, Waschpuffer, Substrat und Stopplösung für die *recomWell*-Teste können parameter- und chargenübergreifend eingesetzt werden. Dabei ist die Haltbarkeit dieser Komponenten zu beachten.

Die Kontrollseren und Konjugate sind chargengebunden und dürfen nicht parameter- oder chargenübergreifend eingesetzt werden.

Alle MIKROGEN-Mikrotiterplatten sind mit Break-a-part-Riegeln ausgestattet.

Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.

Die Abdeckfolien sind für den einmaligen Gebrauch bestimmt.

Bei substantiellen Änderungen am Produkt, bzw. der Anwendungsvorschrift kann die Anwendung außerhalb der von MIKROGEN vorgegebenen Zweckbestimmung liegen.

Automatisierung ist möglich, nähere Informationen erhalten Sie von MIKROGEN.

7.3. Herstellung der Lösungen

Die Nachweisreagenzien reichen für 96 IgG oder IgA-Bestimmungen. Die unten genannten Mengenangaben beziehen sich jeweils auf die Bearbeitung von einem Mikrotiterplattenstreifen mit 8 Kavitäten. Bei der Verwendung von mehreren Mikrotiterplattenstreifen gleichzeitig müssen die angegebenen Mengen jeweils mit der Anzahl der verwendeten Mikrotiterplattenstreifen multipliziert werden.

Substrat und Stopplösung sind gebrauchsfertig.

7.3.1. Herstellung des gebrauchsfertigen Waschpuffers

Das Waschpuffer-Konzentrat wird **1 + 9** mit H₂O deion. verdünnt. Pro einem Mikrotiterplattenstreifen mit 8 Kavitäten werden 5 ml Konzentrat mit 45 ml H₂O deion. gemischt.

7.3.2. Herstellung der Konjugatlösung

Pro einem Mikrotiterplattenstreifen mit 8 Kavitäten werden 1 ml Verdünnungspuffer mit je 10 µl anti-human IgG Peroxidase-Konjugat (Rote Verschlusskappe) oder IgA Peroxidase-Konjugat (Blaue Verschlusskappe) in einem sauberen Gefäß versetzt und gut gemischt (Verdünnung **1 + 100**).

7.4. Lagerung und Haltbarkeit

Die Reagenzien vor und nach Gebrauch bei 2°C - 8°C lagern.

Der gebrauchsfertige Waschpuffer kann auch in größerer Menge hergestellt werden. Der gebrauchsfertige Waschpuffer kann für die Verwendung bei weiteren Testen vier Wochen bei 2°C - 8°C oder eine Woche bei Raumtemperatur gelagert werden.

Die Verdünnung der Proben, der Kontrollen sowie die Konjugatlösung müssen immer frisch zubereitet werden.

8. Probenmaterial

Das Probenmaterial kann Serum oder Plasma sein, das nach Entnahme möglichst rasch vom Blutkuchen getrennt wurde. Hitzeinaktivierte Proben führen zu erhöhten Hintergrundreaktionen, und dürfen daher nicht verwendet werden. Eine mikrobielle Kontamination der Probe ist unbedingt zu vermeiden. Unlösliche Stoffe sind vor der Inkubation durch Zentrifugation aus der Probe zu entfernen.

Die Verwendung von trüben Proben kann einen erhöhten Background im *recomWell* Campylobacter ergeben und sollte daher vermieden werden.

Achtung!

Sollen die Bestimmungen nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu 2 Wochen bei 2°C - 8°C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20°C oder tiefer möglich. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben wird wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate nicht empfohlen. Mehr als 3 Tiefgefrier- und Auftau-Zyklen sollten vermieden werden.

9. Testdurchführung

9.1. Testvorbereitung

Vor Gebrauch sollen alle Reagenzien etwa 30 Minuten auf Raumtemperatur (18°C - 25°C) gebracht werden. Zur Vermeidung von Kondenswasserbildung in der Mikrotiterplatte muss diese **im verschlossenen Beutel** auf Raumtemperatur gebracht werden. Nach der Entnahme der benötigten Riegel soll die Platte im Beutel wieder verschlossen werden und in den Kühlschrank gegeben werden.

Vor Gebrauch die Kontrollseren und Patientenseren, sowie die konzentrierten Konjugate gut durchmischen und soweit möglich anschließend kurz abzentrifugieren, um die Flüssigkeit am Boden der Gefäße zu sammeln.

9.2. Vorbereitung der Proben und Kontrollen

In 1 ml Verdünnungspuffer werden jeweils 10 µl Probe bzw. Kontrolle pipettiert und gut gemischt (Verdünnung **1 + 100**). Bei jedem Testansatz müssen eine negative Kontrolle, eine Cutoff Kontrolle und eine Positive Kontrolle mitgeführt werden, die ebenso wie die Patientenproben verdünnt werden.

9.3. Inkubation der Proben

Die Mikrotiterplatte wird dem Druckverschlußbeutel entnommen.

Von den verdünnten Proben und verdünnten Kontrollen werden **100 µl** pro Kavität pipettiert. Dabei wird von der Negativen Kontrolle, der Positiven Kontrolle und den Patientenproben mindestens ein Wert angelegt, während die Cutoff Kontrolle doppelt angelegt werden muss. Vorzugsweise wird je eine Cutoff Kontrolle am Anfang der Serie und am Ende der Serie pipettiert.

Die Mikrotiterplatte wird bei manueller Abarbeitung **sorgfältig** mit ungebrauchter Abdeckfolie **abgeklebt** und **1 Stunde** bei **37°C** inkubiert.

9.4. Waschen

Die Kavitäten werden vollständig geleert und anschließend **viermal** mit je 300 µl gebrauchsfertigem Waschpuffer pro Kavität gewaschen. Es wird empfohlen, diesen Schritt mit einem entsprechenden ELISA-Waschgerät durchzuführen. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass der Waschpuffer zwischen den Waschschrritten vollständig entfernt wird.

Nach Beenden des letzten Waschschrilles (auch bei Verwendung eines Waschgerätes) die Platte auf einem Papiertuch ausschlagen, um letzte Flüssigkeitsreste in den Kavitäten zu entfernen.

9.5. Inkubation mit Peroxidase-Konjugat

Von der verdünnten Konjugatlösung (s.7.3.2) werden **100 µl** pro Kavität pipettiert.

Die Mikrotiterplatte wird bei manueller Abarbeitung **sorgfältig** mit ungebrauchter Abdeckfolie **abgeklebt** und **30 Minuten** bei **37°C** inkubiert.

9.6. Waschen

Die Kavitäten werden geleert und wie unter 9.4 gewaschen.

9.7. Substratreaktion

Die Substratlösung ist gebrauchsfertig.

Es werden **100 µl** pro Kavität pipettiert. Abkleben der Platte ist nicht erforderlich.

Die Mikrotiterplatte wird **30 Minuten** bei **Raumtemperatur** unter Schutz vor direkter Sonneneinstrahlung inkubiert. Die Zeit wird ab Pipettieren der ersten Kavität gerechnet.

9.8. Abstoppen der Reaktion

Zum Abstoppen der Reaktion werden **100 µl** Stopplösung pro Kavität pipettiert. Dabei ist dasselbe Pipettierschema wie beim Pipettieren der Substratlösung einzuhalten.

9.9. Messung der Extinktionen

Die Extinktionen der einzelnen Kavitäten werden in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei **450 nm** und der Referenzwellenlänge **650 nm** (620 bis 650 nm zulässig) gemessen. Der Nullabgleich erfolgt gegen Luft. Die Messung muss innerhalb von 60 Minuten nach Abstoppen der Reaktion erfolgen.

10. Kurzanleitung der Testdurchführung

Verdünnungen:

- | | | |
|--|-----------------------------------|--|
| • Verdünnung von Proben und Kontrollen | 1 + 100 mit Verdünnungspuffer | 10 µl + 1 ml
je Probe bzw. Kontrolle |
| • Konjugatverdünnung: | 1 + 100 mit Verdünnungspuffer | 10 µl + 1 ml
je Mikrotiterplattenstreifen |
| • Waschpufferverdünnung: | 1 + 9 mit H ₂ O deion. | 5 ml + 45 ml
je Mikrotiterplattenstreifen |

Testschritte:

- | | | |
|-----------------------|--------------------|---------------------------|
| • Probeninkubation: | 100 µl pro Kavität | 60 min bei 37°C |
| • Waschschrilt: | 300 µl pro Kavität | viermal |
| • Konjugatinkubation: | 100 µl pro Kavität | 30 min bei 37°C |
| • Waschschrilt: | 300 µl pro Kavität | viermal |
| • Substratinkubation: | 100 µl pro Kavität | 30 min bei Raumtemperatur |
| • Abstoppen: | 100 µl pro Kavität | |
| • Photometrieren: | 450 / 650 (620) nm | |

11. Validierung und Auswertung

11.1. Validierung

Cutoff Kontrolle: Von den Extinktionswerten der beiden Cutoffs (am Anfang und am Ende der Serie) wird der Mittelwert gebildet.

Der Test ist unter folgenden Bedingungen auswertbar:

Die einzelnen Extinktionswerte der Doppelbestimmung der Cutoff Kontrolle weichen nicht mehr als 20% von ihrem Mittelwert ab.

- Extinktion negative Kontrolle $\leq 0,150$
- Extinktion Cutoff Kontrolle - Extinktion negative Kontrolle $\geq 0,050$
($E_{\text{Cutoff}} - E_{\text{neg. Kontr.}} \geq 0,050$)
- Extinktion positive Kontrolle - Extinktion Cutoff Kontrolle $\geq 0,300$
($E_{\text{pos. Kontr.}} - E_{\text{Cutoff}} \geq 0,300$)

Die Kontrollen dienen der Validierung der Testergebnisse gemäß Kapitel „Validierungs-Qualitätskontrolle“. Die Bestimmung spezifischer Antikörper relativ zur Cutoff-Kontrolle in U/ml erhöht die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, da durch die Testdurchführung bedingte Schwankungen mit einbezogen werden. Eine Auswertung der positiven Kontrolle und der negativen Kontrolle ist für die Validierung des Testes nicht notwendig. Bei Bedarf kann sie jedoch zum Zweck der internen Qualitätskontrolle durchgeführt werden. In diesem Fall sollten die Ergebnisse in dem im Analysenzertifikat oder auf dem Etikett ausgewiesenen Zielwertbereich liegen.

11.2. Auswertung

11.2.1. Qualitative Auswertung

Cutoff (Grenzwert): Extinktionsmittelwert der Cutoff Kontrolle

Graubereich: untere Grenze = Cutoff
obere Grenze = Cutoff + 20% (Cutoff x 1,2)

- Proben mit Extinktionswerten oberhalb des Graubereiches sind als **positiv** zu betrachten.
- Proben mit Extinktionswerten unterhalb des Graubereiches sind als **negativ** zu betrachten.
- Proben mit Extinktionswerten im Graubereich sind **grenzwertig**. Sie sollten erneut getestet werden. Sind sie nach dem zweiten Test wiederum grenzwertig, empfiehlt es sich, nach einiger Zeit eine weitere Probe zu nehmen und zu testen (vgl. 11.3).

11.2.2. Quantitative Auswertung

Den Extinktionswerten wird mit Hilfe einer Formel die entsprechende Antikörperaktivität in Units pro ml zugeordnet. Bei der Messeinheit U/ml handelt es sich um eine arbiträre Einheit, die keine direkten Rückschlüsse auf (internationale) Referenzwerte erlaubt.

$U/ml \text{ Probe} = (Extinktion \text{ Probe} / Extinktion \text{ Cutoff}) \times 20$

Graubereich: untere Grenze = 20 U/ml
obere Grenze = 24 U/ml

- $U/ml \text{ Probe} > 24$ **positives** Testergebnis
- $U/ml \text{ Probe} < 20$ **negatives** Testergebnis
- $20 \leq U/ml \text{ Probe} \leq 24$ **grenzwertiges** Testergebnis

Die Linearität des Tests konnte bei der Evaluierung innerhalb des folgenden Messbereiches nachgewiesen werden:

20 U/ml bis 150 U/ml ($R^2 = 0,99$)

Bei einer Extinktion $\geq 3,0$ oder bei einem Messwert oberhalb dieses linearen Bereiches sollte entweder das Resultat mit > 150 U/ml angegeben werden oder die Probe verdünnt und erneut getestet werden. Wir empfehlen zunächst eine Endverdünnung von 1:500 und ggf. weitere Verdünnungsschritte.

11.3. Hinweise zur Interpretation der Testergebnisse

Serologische Testergebnisse sollten immer im Zusammenhang mit dem klinischen Bild gesehen werden. Es empfiehlt sich auch hier eine enge Kooperation von Labor und behandelndem Arzt.

Bei unklaren oder fraglichen serologischen Ergebnissen wird eine erneute Testung im zeitlichen Verlauf der Infektion (2-3 Wochen) empfohlen.

Ein negatives *recomWell* Campylobacter Testresultat kann eine Infektion mit Campylobacter nicht ausschließen. Insbesondere in der frühen Infektionsphase können Antikörper noch nicht oder in nicht nachweisbarer Menge vorhanden sein.

Für die Beurteilung des Campylobacter Immunstatus sollten immer die Ergebnisse des IgG- und IgA-Nachweises zusammen betrachtet werden.

Ein positives Ergebnis im *recomWell* Campylobacter sollte durch einen Bestätigungstest (z.B. *recomLine* Campylobacter) abgeklärt werden.

12. Klinische Ergebnisse

12.1. Patienten mit positiver *C.jejuni* / *C. coli* Stuhlkultur

In dieser Studie wurden insgesamt 310 Serumproben mit einer positiven Campylobacter Stuhlkultur untersucht. Die Blutabnahme fand 0 bis 81 Tage nach der Stuhldiagnostik statt, der Krankheitsbeginn war nicht bekannt.

Nach einer gesicherten Campylobacter-Infektion konnten bei 86% der Patientenproben IgG-Antikörper und bei 40% IgA-Antikörper im *recomWell* Campylobacter nachgewiesen werden (siehe Tabelle 1).

12.2. Proben von Patienten mit Verdacht auf Guillain-Barré-Syndrom (GBS) unklarer Ätiologie

Im Rahmen einer vorangegangenen Studie wurden 30 Proben von Patienten mit einem Guillain-Barré-Syndrom unklarer Ätiologie getestet. Diese Proben wurden durch das klinische Bild eines GBS charakterisiert, es waren keine Daten über vorangegangene Durchfallerkrankungen bekannt. Die Studie wurde mit der damals aktuellen Testversion des *recomWell* Campylobacter durchgeführt, die noch kein Antigen P39 enthielt.

Bei diesem Probenkollektiv konnten etwas 5fach häufiger IgA-Antikörper im Vergleich zu Blutspendern nachgewiesen werden, eine signifikante prozentuale Häufung der IgG-Antikörper wurde nicht beobachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

12.3. Proben von Patienten mit Verdacht auf Reaktive Arthritis (ReA) unklarer Ätiologie

Proben von 38 Patienten mit Verdacht auf eine Reaktive Arthritis unklarer Ätiologie wurden auf das Vorhandensein von IgG- bzw. IgA-Antikörpern gegen *C.jejuni/C.coli* getestet. Dieses Kollektiv wurde durch das klinische Bild einer Reaktiven Arthritis charakterisiert, es waren keine Daten über vorangegangene Durchfallerkrankungen bekannt. Im Vergleich zum Blutspenderkollektiv konnten hier etwa zweifach häufiger IgG- und 5fach häufiger IgA-Antikörper nachgewiesen werden (siehe Tabelle 2).

12.4. Blutspender

Bei der Untersuchung von 200 unselektierten Blutspendern wurden bei 16% der Patientenproben IgG-Antikörper und bei 3% IgA-Antikörper im *recomWell* Campylobacter nachgewiesen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: recomWell Campylobacter - Proben von Patienten mit positiver Campylobacter Stuhlkultur und Proben von Blutspendern

	Anzahl	positive oder grenzwertige Beurteilung	
		IgG	IgA
C.jejuni, C.coli positive Stuhlkultur	310	267 (86%)	124 (40%)
Blutspender	200	32 (16%)	6 (3%)

Tabelle 2: recomWell Campylobacter - Proben von Patienten mit Verdacht auf Guillain-Barré-Syndrom bzw. Reaktiver Arthritis unklarer Ätiologie

	Anzahl	positive oder grenzwertige Beurteilung	
		IgG	IgA
GBS-Proben mit unklarer Ätiologie*	30	7 (23%)	4 (13%)
ReA-Proben mit unklarer Ätiologie	38	14 (37%)	6 (16%)

*getestet mit recomWell Campylobacter ohne P39

12.5. Mögliche Kreuzreaktionen

Es wurden insgesamt 100 Proben mit bekannter Serologie zu *Yersinia enterocolitica*/*Y. pseudotuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi* und *Parvovirus B19* untersucht.

Es wurde kein Hinweis auf Kreuzreaktionen gefunden.

12.6. Vergleich Serum und Plasma

Bei der Untersuchung von Patientenproben wurden keine Unterschiede bei der Verwendung von Serum oder Plasma (EDTA-Plasma) festgestellt.

12.7. Präzision

12.7.1. Intra-Assay-Varianz:

Ein Serum wurde auf 48 Kavitäten einer Mikrotiterplatte auspipettiert. Der Variationskoeffizient (VK) der Extinktionen wurde errechnet.

VK (IgG) = 4,6%, VK (IgA) = 4,1%

12.7.2. Inter-Assay-Varianz:

Mit 7 Proben unterschiedlicher Extinktionshöhen wurde der recomWell in 8 getrennten Ansätzen durchgeführt. Der VK wurde für die U/ml jedes einzelnen Serums errechnet.

VK (IgG) < 12%, VK (IgA) < 12 %

12.8. Vergleichs-ELISA

Ein Teil des Probenkollektivs wurde parallel in einem Vergleichs-ELISA (Extrakt-Antigen) untersucht. Im Vergleichs-ELISA waren nur 42% bzw 28% (IgG bzw. IgA) der Patienten mit positiver Campylobacter Stuhlkultur positiv oder grenzwertig. Proben von Blutspendern waren negativ.

Tabelle 3: recomWell Campylobacter – Vergleichs-ELISA: Proben von Patienten mit positiver Campylobacter Stuhlkultur und Proben von Blutspendern

	Anzahl	recomWell		Extrakt-Antigen-ELISA	
		positive oder grenzwertige Beurteilung		positive oder grenzwertige Beurteilung	
		IgG	IgA	IgG	IgA
<i>C.jejuni, C.coli</i> positive Stuhlkultur	289	254 (88%)	115 (40%)	122 (42%)	82 (28%)
Blutspender	48	7 (15%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)

13. Literatur

Die ausführliche Literaturliste finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation ab Seite 20.

Auf Anforderung übersenden wir Ihnen gerne weiterführende Literatur zur Campylobacter Diagnostik zu.

14. Erklärung der Symbole

Die Tabelle mit der Erklärung der Symbole finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation auf Seite 21.

recomWell Campylobacter IgG

recomWell Campylobacter IgA

Enzyme immunoassay with recombinant antigens for the detection of IgG or IgA antibodies against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in human serum or plasma

1. General aspects, intended use

recomWell Campylobacter is a qualitative or quantitative in vitro test for the detection and safe identification of IgG or IgA antibodies against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in human serum or plasma. **recomWell Campylobacter** is a screening test based on the principle of an indirect sandwich ELISA.

2. Campylobacter jejuni and Campylobacter coli

The genus *Campylobacter* comprises gram-negative, spiral-shaped, microaerophilic, mesophilic to thermophilic bacteria with bipolar flagella. In 1963, Sebald and Vernon named a bacterium Escherich had described as early as 1889 *Campylobacter jejuni*. Isolation from stool samples was achieved in 1972 by Dekeyser et al. Jones et al. made out a food association in 1981/1982. In taxonomic terms, *Campylobacter* is classified with the epsilon subdivision of the Proteobacteria.

The pathogen reservoir is mainly the intestinal tract of warm-blooded wild, domestic and pet animals (birds and mammals).

Intestinal *Campylobacter* infections are the second most frequent enteric bacterial infections reported in Germany after enteric salmonellosis (Robert Koch Institute 2004: *RKI Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten 2006: Salmonella 52.319, Campylobacter 51.764*), whereby *Campylobacter jejuni* is much more frequent, accounting for over 90% of cases as compared to *Campylobacter coli* at approx. 9%.

Contaminated foods (mainly poultry) and drinking water (tropical countries) constitute the main sources of infection. Unreported cases not reflected in the statistics probably outnumber reported cases many times over. Annual incidence rates vary seasonally (higher rates in the summer months) as well as regionally, with diagnoses following travel to warm countries throughout the year due to considerably higher incidence in Third World countries.

Acute disease

The course of infection with *Campylobacter* is almost exclusively oral, the pathogen is highly adapted to the intestinal tract. Systemic infections up to and including meningitis are observed less frequently (especially in immunocompromised patients, infants and the elderly) (Skirrow & Blaser, 2000). The incubation period is brief (1-7 days) and presumably depends on the infective dose. Besides nearly asymptomatic (clinically inapparent) courses, infected persons suffer from painful gastrointestinal symptoms with sometimes bloody diarrhoea, fever, meningism and myalgias. The acute clinical picture persists for only a few days in most patients. The course of the infection is self-limiting in most cases, although severe losses of fluids and electrolytes must be replaced as required.

Sequelae:

Reactive arthritis (ReA) is among the known sequelae to enteral, and frequently urogenital infections as well caused by certain bacterial and viral pathogens, with onset a few weeks after the primary infection. In addition to urogenital mycoplasmas and chlamydiae, enteral salmonellae, shigellae and yersiniae, *Campylobacter spp.* are prominent among secondary pathogen diagnoses (Locht & Krogfeldt, 2002; Cox et al., 2003; Hannu et al., 2004). The background pathophysiological mechanism is presumably molecular mimicry of cross-reacting antibodies to antigens of the synovial membrane. Some cases of arthritis of unclear genesis can be correctly diagnosed as post-infection Reactive Arthritis, and not rheumatoid arthritis, on the basis of the appropriate laboratory parameters.

Similarly to Reactive Arthritis, **Guillain-Barré-Syndrom (GBS)** may also develop a few weeks after infections, usually enteral or respiratory, caused by certain bacterial and viral pathogens. The presumed level of incidence is between 1:1,000 and 1:10,000. GBS is an acute, immunomediated polyradicular neuropathy caused by an abnormal humoral immune response to the peripheral myelin sheath and/or

the neural axon. A number of different viruses (e.g. CMV, EBV, VZV, measles virus, mumps virus), *Mycoplasma pneumoniae* and bacteria (*Borrelia burgdorferi*, *Haemophilus influenzae*) can cause a GBS, but various case-control studies have implicated that mainly *Campylobacter spp.*, and in particular *Campylobacter jejuni* (Nachamkin et al., 2000; Prendergast et al., 2004; Gilbert et al., 2004; Leonard et al., 2004) as prior agent with a frequency level of 30%, based mainly on serological finding. Direct pathogen detection methods produced negative results in most cases. In pathophysiological terms, pathogen-specific antibodies cross-react with neuronal antigens (e.g. Moran et al., 2000; Yuki et al., 2004), thereby inducing inflammation mediators to invade macrophages, resulting in subsequent local micro-oedemas with transitory or permanent failure of the affected neurones. Neurological failures in GBS therefore include purely motor ("AMAN" = acute motor axonal neuropathy, "AIDP" = acute inflammatory demyelinating polyneuropathy) as well as sensory and mixed types ("ANSAM" = acute motor-sensory axonal neuropathy). Mild and reversible courses are observed as well as severe courses with permanent paralysis. About 5% of GBS cases are terminal. The course of disease appears to be directly proportional to the specific antibody titre. Clinical observations and initial findings from surveillance studies on "flaccid paralysis" (differential diagnosis: poliomyelitis) suggest that, in pathophysiological terms, discrete, transitory paralysis symptoms that take the form of signs of exhaustion in the extremities correspond much more frequently to an inapparent GBS than has been assumed to date.

3. Diagnosis

In suspected *Campylobacter* infections, the bacteriological stool culture, preferably determined on selective mediums, is the standard diagnostic method (MIQ, Kist et al., 2000). However, the result or species-specific diagnosis may require two to three days due to the special demands of the pathogens. As is the case with other enteral bacterial infections, the results of serological antibody detection methods are not very definitive in acutely ill patients and are at most useful in aetiological clarification after the pathogens are no longer detectable. As a rule, however, *Campylobacter spp.* are still excreted sporadically during convalescence, in some cases over a period of several weeks, whereby negative and positive stool samples may alternate. Chronic shedders over periods of many months are observed, who may form a partial collective among patients with infection sequelae.

Campylobacter infections are notifiable according to the (German) Infection Protection Law (IfSG).

Due to the relatively high frequency of occurrence of these pathogens among the causes of post-infection complications, serological identification of antibodies to *Campylobacter spp.* is a necessary standard procedure in patients suffering from infection sequelae. The necessary tests can be based on complement-binding reactions (CBR), ELISA methods or immunoblots.

Campylobacter infections are still underestimated. Testing rates are generally low and usually involve CBR tests, whereby the use of the total protein does not ensure a very high level of specificity in view of the cross-reactivity involved. CBR can detect IgG and IgM antibodies. IgA antibodies cannot be detected, nor can IgG and IgM antibodies be differentiated.

4. Test principle

The antigens used in **recomWell Campylobacter** are made by genetic engineering techniques. In this way, an optimal presentation without other interfering and cross reacting proteins can be achieved. Only specific antigens with importance for the sensitive serological diagnosis are used in comparison to other ELISA-systems using lysate antigens.

The following recombinant antigens are presented in this **recomWell Campylobacter**: PEB4 (cytoplasmic protein, membrane protein), OMP18 (outer membrane protein, peptidoglycan-associated lipoprotein) and P39 (putative ATP/GTP binding protein).

The determination of IgG and IgA antibodies will be practised separately.

5. Package contents

The reagents in one pack are sufficient for 96 determinations.

Each reagent set contains:

WASHBUF 10 X	100 ml	Wash buffer (ten times the concentration) Contains phosphate buffer, NaCl, detergent and preservatives MIT (0,01%) and Oxyprion (0,1%)
DILUBUF	125 ml	Dilution buffer (ready-for-use) Contains protein, detergent and blue dye, preservatives MIT (0,01%) and Oxyprion (0,1%)
SUBS TMB	12 ml	Chromogenic substrate tetramethylbenzidine (TMB, ready-for-use)
SOLN STOP	12 ml	Stop solution 24,9 % Phosphoric acid (H ₃ PO ₄)
INSTRU	1	Instructions for use
EVALFORM	1	Evaluation form
TAPE	2 pieces	Sealing tape

5.1. recomWell Campylobacter IgG

Additionally to the components listed under point 5 each reagent set contains:

MTP	12 x 8 wells	Microplate (section marked in red) coated with recombinant Campylobacter antigens in vacuum-pressure sealed bag
CONTROL + IgG	450 µl	Positive control (violet screw cap) Preservatives: MIT (0,1%) and Oxyprion (0,1)
CONTROL ± IgG	450 µl	Cutoff control (yellow screw cap) Preservatives: MIT (0,1%) and Oxyprion (0,1)
CONTROL - IgG	450 µl	Negative control (white screw cap) Preservatives: MIT (0,1%) and Oxyprion (0,1)
CONJ IgG	500 µl	Anti-human IgG conjugate (101 times the concentration, red screw cap) contains NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,01%), Chloracetamide (<0,1%)

5.2. recomWell Campylobacter IgA

Additionally to the components listed under point 5 each reagent set contains:

MTP	12 x 8 wells	Microplate (section marked in blue) coated with recombinant Campylobacter antigens in vacuum-pressure sealed bag
CONTROL + IgA	450 µl	Positive control (brown screw cap) Preservatives: MIT (0,1%) and Oxyprion (0,1)
CONTROL ± IgA	450 µl	Cutoff control (orange screw cap) Preservatives: MIT (0,1%) and Oxyprion (0,1)
CONTROL - IgA	450 µl	Negative control (white screw cap) Preservatives: MIT (0,1%) and Oxyprion (0,1)
CONJ IgA	500 µl	Anti-human IgA conjugate (101 times the concentration, blue screw cap) contains NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,01%), Chloracetamide (<0,1%)

6. Additional reagents and accessory equipment required

Deionised water (high quality), test tubes, micro pipettes, incubator 37°C, microplate photometer.

7. Information on test and reagents

7.1. Precautions

- ☞ Control sera are from blood donors verified for the absence of antibodies to HIV 1/2, HCV and no Hepatitis Bs-antigen. Since an infection cannot be excluded with absolute certainty despite this precaution, the product must be treated with the same care as the patient sample.
- ☞ Suitable single-use gloves must be worn during the entire test procedure.
- ☞ The conjugates contain sodium azide, MIT (methylisothiazolone) and Chloracetamide. The controls, dilution buffer and wash buffer contain MIT and Oxypyrion. Avoid contact with skin or mucosa.
- ☞ Phosphoric acid is an irritant. Avoid all contact with skin or mucosa.
- ☞ All reagents and materials contaminated with potentially infectious samples must be treated with suitable disinfectants or autoclaved at 121°C for at least 1 hour.

7.2. Handling information

A quality guarantee can only be given up to the expiry date on the packages.

The components dilution buffer, wash buffer, substrate and stop solution for all *recomWell*-tests can be used irrespective of parameter or lot. Please mind the expire date of the components.

All control sera and conjugates are to be used with the lot noted on the cover of the kit, they must not be used with other parameters or lots.

All MIKROGEN microtiter plates are equipped with Break-a-part-bars.

The test must be performed by well-trained and authorised qualified personnel.

The sealing tapes are to be used only once.

In case of substantial modifications of the product or the instructions for use, the application of the test might differ from the purpose intended by MIKROGEN.

Automation is possible, please refer to MIKROGEN for details.

7.3. Preparation of the solutions

The test reagents are sufficient for 96 IgG or IgA tests. The amounts indicated below refer to processing of a microplate strip with 8 wells. If several microplate strips are used at the same time, the amounts indicated must be multiplied by the number of microplate strips used.

Substrate and stop solution are ready to use.

7.3.1. Preparation of ready-to-use wash buffer

The wash buffer concentrate is diluted **1 + 9** with deionised H₂O. 5 ml concentrate are mixed with 45 ml deionised H₂O per microplate strip with 8 wells.

7.3.2. Preparation of conjugate solution

Per each microplate strip with 8 wells, 10 µl anti-human IgG peroxidase conjugate (red cap) or IgA peroxidase conjugate (blue cap) are added to 1 ml dilution buffer in a clean vessel and mixed well (dilution **1 + 100**).

7.4. Storage and stability

Store the reagents at **2°C - 8°C** before and after use.

The ready-to-use wash buffer can be prepared in larger amounts. Ready-to-use wash buffer may be stored at 2°C - 8°C for four weeks or at room temperature for one week for use in further tests.

The sample dilutions, controls and conjugate solution must always be prepared freshly.

8. Sample material

The sample material can be serum or plasma that is separated from the coagulum as soon as possible after sampling. Heat-inactivated samples will result in raised background reaction levels and are therefore unsuitable for use. A microbial contamination of the sample has to be avoided at all costs. Insoluble substances must be removed from the sample prior to incubation by centrifugation.

Important!

If the tests are not carried out immediately, the samples can be stored for up to 2 weeks at 2°C - 8°C. Longer storage of the samples is possible at -20°C or below. Repeated freezing and thawing of the samples is not recommended because this may affect the quality of the results. Avoid more than 3 cycles of freezing and thawing.

9. Test procedure

9.1. Test preparations

Temper all reagents to room temperature (18°C - 25°C) before use for about 30 minutes. To avoid condensation of water in the microplate, it must be brought up to room temperature **in the closed bag**. After the required section is removed, the bag containing the plate must be reclosed and placed in the refrigerator.

Before use, the control and patient sera and concentrated conjugates must be mixed well and briefly centrifuged if practicable to collect the liquid at the bottom of the tubes.

9.2. Preparation of samples and controls

Pipette 10 µl of sample or control into 1 ml dilution buffer each and mix well (dilution **1 + 100**). A negative control, cutoff control and positive control must be run parallel to each test run and diluted just like the patient samples.

9.3. Incubation of the samples

The microplate is removed from the pressure-sealed bag.

Pipette **100 µl** per well of the diluted samples and diluted controls. One value is tested for each negative control, positive control and patient sample, whereas the cutoff control must be double-tested. It is preferable to pipette one cutoff control at the beginning and again at the end of the series.

In manual processing, the microplate is **carefully taped** over with unused sealing tape and incubated for **1 hour at 37°C**.

9.4. Washing procedure

The wells are emptied completely, then washed **four times**, each time with 300 µl ready-to-use wash buffer per well. We recommend performing this step with the appropriate ELISA washing equipment. Make absolutely sure that the wash buffer is removed completely between the washing steps.

After the last washing step is completed (even if washing equipment is being used) tap the plate over a paper towel to remove any residual liquid from the wells.

9.5. Incubation with peroxidase conjugate

Pipette **100 µl** per well.

In manual processing, the microplate is **carefully taped** over with unused sealing tape and incubated for **30 minutes at 37°C**.

9.6. Washing procedure

The wells are emptied and washed as described under 9.4.

9.7. Substrate reaction

The substrate solution is ready to use.

Pipette **100 µl** per well. It is not necessary to tape the microplate.

The microplate is incubated for **30 minutes** at **room temperature** while protecting it from direct sunlight. The time is counted from pipetting of the first well.

9.8. Stopping the reaction

To stop the reaction, pipette **100 µl** of stop solution per well, using the same pipetting scheme as for the substrate solution.

9.9. Measurement of the extinctions

The extinction in the individual wells are measured in a microplate photometer at **450 nm** and at the reference wavelength **650 nm** (620 to 650). Blank on air. Measurement should be performed within 60 minutes after stopping the reaction.

10. Summary of the test procedure

Dilutions:

- Dilution of samples and controls 1 + 100 with dilution buffer 10 µl + 1 ml per sample resp. control
- Conjugate dilution: 1 + 100 with dilution buffer 10 µl + 1 ml per microplate strip
- Wash buffer dilution: 1 + 9 with deionised H₂O 5 ml + 45 ml per microplate strip

Test steps:

- Sample incubation: 100 µl per well 60 min at 37°C
- Washing step: 300 µl per well four times
- Conjugate incubation: 100 µl per well 30 min at 37°C
- Washing step: 300 µl per well four times
- Substrate incubation: 100 µl per well 30 min at room temperature
- Stopping: 100 µl per well
- Photometry: 450 / 650 (620) nm

11. Validation and evaluation

11.1. Validation

Cutoff control: The average value of the extinction values for the two cutoffs (at the beginning and end of the series) is obtained.

The test can be evaluated under the following conditions:

The individual extinction values for double-testing of the cutoff control deviate from their average value not more than 20%.

- Extinction negative control ≤ 0.150
- Extinction cutoff control - Extinction negative control ≥ 0.050
($E_{\text{cutoff}} - E_{\text{neg. contr.}} \geq 0.050$)
- Extinction positive control - Extinction cutoff control ≥ 0.300
($E_{\text{pos. contr.}} - E_{\text{cutoff}} \geq 0.300$)

These checks are used to validate the test results as per the "Validation Quality Control" chapter. The reproducibility of results can be improved by determining the specific antibodies relative to the cut-off check in U/ml, as the fluctuations from the performance of the test are also included. In validating the test, the positive and negative checks do not need to be evaluated. If necessary, however, they can be carried out for internal quality control purposes. In this case, the results should lie within the target value range given in the analysis certificate or on the label.

11.2. Evaluation

11.2.1. Qualitative evaluation

Cutoff (boundary value): Extinction average for cutoff control

Grey range: Lower limit = Cutoff
 Upper limit = Cutoff + 20% (cutoff x 1.2)

- Samples with extinction values above the grey range are to be considered **positive**.
- Samples with extinction values below the grey range are to be considered **negative**.
- Samples with extinction values in the grey range are **borderline** and should be retested. If they are still borderline after the second test, it is recommended that an additional sample should be taken after a period of time and retested (cf. 11.3).

11.2.2. Quantitative evaluation

The antibody activity levels in units per ml are assigned to the extinction values using a formula. The measurement units U/ml are arbitrary units, which do not allow conclusions concerning (international) reference values.

U/ml sample = (extinction sample / extinction cutoff) x 20

Grey range: Lower limit = 20 U/ml
 Upper limit = 24 U/ml

- U/ml sample > 24 **positive** test result
- U/ml sample < 20 **negative** test result
- $20 \leq \text{U/ml sample} \leq 24$ **borderline** test result

The linearity of the test was determined during the evaluation within the following range:
20 U/ml to 150 U/ml ($R^2 = 0.99$)

In case of an extinction ≥ 3.0 or a measuring value above the linear range, the result should either be given as > 150 U/ml, or the sample may be diluted and measured again. We recommend to start with a final sample dilution of 1:500 and if necessary further subsequent dilution steps.

11.3. Directions for the interpretation of test results

In all test interpretations it is important to include any other clinical record data available. Close cooperation between laboratory and the physician in charge of treatment is recommended here as well.

Samples with unclear or questionable results should be rechecked after 2 - 3 weeks in keeping with the clinical situation.

A negative *recomWell* Campylobacter result does not exclude the possibility of a campylobacter infection. False negative results may occur with serum samples obtained at a very early stage after infection in which no antibodies to *C.jejuni/C.coli* have been produced as yet.

When evaluating the test results, IgG and IgA findings should always be considered together.

We generally recommend to check positive and borderline ELISA results by a confirmation test (e.g. *recomLine* Campylobacter).

12. Clinical results

12.1. Sera from patients with positive *C.jejuni* / *C.coli* stool culture

This study considered a total of 310 serum samples from patients with positive Campylobacter stool cultures. Blood samples were taken 0 to 81 days after the stool diagnostics, the beginning of the disease was unknown.

Following confirmed Campylobacter infections, 86% of patient samples were found to contain IgG antibodies and 40% IgA antibodies (see Table 1).

12.2. Samples from patients with suspected Guillain-Barré-Syndrome (GBS) of unclarified aetiology

Within the framework of a former study of the year 2005, 30 samples from patients with suspected Guillain-Barré syndrome of unclarified aetiology were tested. These samples were characterised by the clinical picture of GBS, whereby no data on previous illnesses involving diarrhoea were known. The study was performed with the *recomWell* Campylobacter test version of the year 2005 without antigen P39.

IgA antibodies were detected 5 times more frequently in this sample collective than among the blood donors. No significant frequency percentiles of IgG antibodies were observed. The results are presented in Table 2.

12.3. Sera from patients with suspected Reactive Arthritis (ReA) of unclarified aetiology

Samples from 38 patients with suspected Reactive Arthritis of unclarified aetiology were tested for the presence of IgG and IgA antibodies to *C. jejuni* / *C. coli*. This collective was characterised by the clinical picture of Reactive Arthritis, whereby no data on previous illnesses involving diarrhoea were known. IgA and IgG antibodies were detected in this collective 5 times and 2 times more frequently than in the blood donor collective. The results are presented in Table 2.

12.4. Blood donors

200 non-selected blood donor plasma samples were tested.

The results were a seroprevalence in the IgG test of 16% and in the IgA test of 3% (see Table 1).

Table 1: *recomWell* Campylobacter - Samples from patients with positive *C.jejuni* / *C. coli* stool culture and blood donors

	n	positive or borderline interpretation	
		IgG	IgA
<i>C.jejuni</i>, <i>C.coli</i> positive stool culture	310	267 (86%)	124 (40%)
Blood donors	200	32 (16%)	6 (3%)

Table 2: recomWell Campylobacter - Samples from patients with suspected Guillain-Barré-Syndrom resp. Reactive Arthritis unclarified aetiology

	n	positive or borderline interpretation	
		IgG	IgA
GBS-samples with unclarified aetiology*	30	7 (23%)	4 (13%)
ReA-samples with unclarified aetiology	38	14 (37%)	6 (16%)

* recomWell Campylobacter test version of the year 2005 without antigen P39.

12.5. Potentially falsifying sera

Sera of patients (n=100) infected by *Yersinia enterocolitica*/*Y. pseudotuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi* and *Parvovirus B19* did not show a higher number of increased Campylobacter antibody titers.

12.6. Serum-plasma comparison

Analysis of samples from patients revealed no differences between serum and plasma analyses.

12.7. Precision

12.7.1. Intra-Assay-Variance:

A serum was examined on 48 cavities of a microtiterplate. The variation coefficient (VC) was calculated: VC (IgG) = 4,6%, VC (IgA) = 4,1%.

12.7.2. Inter-Assay-Variance:

7 sera of different ODs were examined in 8 different determinations. The variation coefficient was calculated for each single serum (U/ml):

VC (IgG) < 12%, VC (IgA) < 12 %

12.8. Comparison with extract-antigen ELISA

A part of the samples were also tested with an extract-antigen ELISA. Only 42% and 28% of the patients with positive Campylobacter stool cultures were IgG- and IgA- positive or borderline, respectively. Blood donor samples were negative (Table 3).

Table 3: Comparison with extract-antigen ELISA: Samples from patients with positive Campylobacter stool cultures resp. Blood donors.

	n	recomWell		extract-antigen -ELISA	
		positive or borderline interpretation		positive or borderline interpretation	
		IgG	IgA	IgG	IgA
<i>C.jejuni</i>, <i>C.coli</i> positive stool culture	289	254 (88%)	115 (40%)	122 (42%)	82 (28%)
Blood donors	48	7 (15%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)

13. Literature

- (1) Skirrow MB, Blaser MJ (2000), Clinical Aspects of Campylobacter Infection, in: Nachamkin I, Blaser MJ (eds), Campylobacter, 2nd Ed. ASM, Washington.
- (2) Loch H, Krogfeldt KA (2002), Comparison of rheumatological and gastrointestinal symptoms after infection with *Campylobacter jejuni/coli* and enterotoxigenic *Escherichia coli*, Ann Rheum Dis 61: 448-52.
- (3) Cox CJ, Kempell KE, Gaston JS (2003), Investigation of infectious agents associated with arthritis by reverse transcription PCR of bacterial rRNA, Arthritis Res Ther 5: R1-8.
- (4) Hannu T, Kauppi M, Tuomala M, Laaksonen I, Klements P, Kuusi M (2004), Reactive arthritis following an outbreak of Campylobacter jejuni infection, J Rheumatol 31: 528-30.
- (5) Nachamkin I et al. (2000), *Campylobacter jejuni* Infection and the Association with Guillain-Barré Syndrome, in: Nachamkin I, Blaser MJ (eds), Campylobacter, 2nd Ed. ASM, Washington.
- (6) Prendergast MM, Tribble DR, Baqar S, Scott DA, Ferris JA, Walker RI, Moran AP (2004), In Vivo Phase Variation and Serologic Response to Lipooligosaccharide of *Campylobacter jejuni* in Experimental Human Infection, Infect Immun 72: 916-22.
- (7) Gilbert M, Godschalk PC, Karwaski MF, Ang CW, van Belkum A, Li J, Wakarchuk WW, Endtz HP, (2004), Evidence for Acquisition of the Lipooligosaccharide Biosynthesis Locus in *Campylobacter jejuni* GB11, a Strain Isolated from a Patient with Guillain-Barré Syndrome, by Horizontal Exchange, Infect Immun 72: 1162-65.
- (8) Leonard EE 2nd, Tompkins LS, Falkow S, Nachamkin I, (2004), Comparison of *Campylobacter jejuni* Isolated Implicated in Guillain-Barré Syndrome and Strains That Cause Enteritis by a DNA Microarray, Infect Immun 72: 1199-203.
- (9) Moran AP, Penner JL, Aspinnall GO (2000), Campylobacter Lipopolysaccharides, in: Nachamkin I, Blaser MJ (eds), Campylobacter, 2nd Ed. ASM, Washington.
- (10) Yuki N, Susu+ki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Tagushi K, Miyatake T, Furukawa K, Kobata T, Yamada M, (2004), Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and Campylobacter jejuni lipooligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome, Proc Natl Acad Sci USA 101: 11404-9.
- (11) Kist M, Bockemühl J (Hersg.), (2000), Gastrointestinale Infektionen, MIQ (Qualitätsstandards in der mikrobiologischen Diagnostik, Urban & Fischer, München.
- (12) Heitschel v. Heinegg E. (1997), Diagnostische Bibliothek Campylobacter, Blackwell Wissenschafts-Verlag Laboratoriumsmedizin 52.
- (13) Kist M. (2000), Lebensmittelbedingte Infektionen durch Campylobacter, Springer-Verlag, Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 45, 497-506.
- (14) Altekruse S. F., Stern N. J., Fields P. I., Swerdlow D. L. (1999), Campylobacter jejuni-An Emerging Foodborne Pathogen, Emerging Infectious Diseases 5/1.
- (15) Zhang Q., Meitzler J. C., Huang S., Morishita T. (2000), Sequence Polymorphism, Predicted Secondary Structures, and Surface-Exposed Conformational Epitopes of Campylobacter Major Outer Membrane Protein, Infection and Immunity 68/10, 5679-5689.
- (16) Burnens A., Stucki U., Nicolet J., Frey J. (1995), Identification and Characterization of an Immunogenic Outer Membrane Protein of Campylobacter jejuni, J Clin Microbiol 33/11 2826-2832.
- (17) Pei Z., Ellison R. T., Blaser M. J. (1991), Identification, Purification, and Characterization of Major Antigenic Proteins of *Campylobacter jejuni*, J Biological Chemistry 266/25, 16363-16369.
- (18) Ketley J. M. (1997), Pathogenesis of enteric infection by Campylobacter, Microbiology 143, 5-21.
- (19) Nachamkin I., Allos B. M., Ho T. (1998), Campylobacter Species and Guillain-Barré-Syndrome, Clinical Microbiology Reviews 11/3, 555-567.
- (20) Nachamkin I. (2002), Chronic effects of Campylobacter infection, Microbes and Infection 4, 399-403.
- (21) Colmegna I., Cuchacovich R., Espinoza L.R., (2004), HLA-B27-Associated Reactive Arthritis: Pathogenetic and Clinical Considerations, Clinical Microbiology Reviews 17/2, 348-369
- (22) Lecuit et al. (2004), Immunoproliferative Small Intestinal Disease Associated with Campylobacter jejuni, N Engl J Med 350: 239-48
- (23) Yli-Kerttula T., Luukkainen R., Yli-Kerttula U., Möttönen T., Hakola M., Korpela M. Sanila M., Uksila J., Toivanen A., (2003), Effect of a three month course of ciprofloxacin on the late prognosis of reactive arthritis, Ann Rheum Dis, 62:880-884
- (24) Schmidt-Ott R. (2005), Improved serodiagnosis of Campylobacter jejuni infections using recombinant antigens, Journal of Medical Microbiology 54, 761-767
- (25) Schmidt-Ott R. (2006), Improved serological diagnosis stresses the major role of Campylobacter jejuni in triggering Guillain-Barré syndrome, Clinical and Vaccine Immunology, July 2006, p. 779-783

We will be pleased to send you further literature on the diagnosis of Campylobacter at your request.

14. Explanation of the symbols

	Contains sufficient for < n > tests (number of tests)	Inhalt ist ausreichend für < n > Ansätze (Anzahl der Ansätze)
TVALUE	Target and/or target range in U/ml	Zielwert und/oder Zielwertbereich in U/ml
	Consult instructions for use	Gebrauchsinformation beachten
CONT	Contains	Inhalt, enthält
IVD	in vitro diagnostic device	In vitro Test
LOT	Batch/version number	Chargen-/Versionsnummer
	Do not freeze	Nicht einfrieren
REF	Catalogue number	Bestell-Nummer
	Use by Expiry date	verwendbar bis Verfallsdatum
	Store at x°C to y°C	Lagerung bei x°C bis y°C
	Manufacturer	Hersteller

recomWell Campylobacter IgG	Artikel-Nr. / Article No.: 6204
recomWell Campylobacter IgA	Artikel-Nr. / Article No.: 6205
Gebrauchsinformation Version/Instruction for use version gültig ab / valid from	GIRECJ010DE 2023-03
 MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Germany Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-Mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de	
	



GIRECJ010