

recomLine Campylobacter IgG

recomLine Campylobacter IgA

Immunoassay mit rekombinanten Antigenen zur Bestimmung von IgG-, und IgA-Antikörpern gegen *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in humanem Serum oder Plasma

1. Allgemeines, Verwendungszweck

Der recomLine Campylobacter ist ein qualitativer *in-vitro* Test zum Nachweis von Serum-Antikörpern gegen verschiedene Antigene von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*.

Nach abgelaufener oder persistierender Campylobacter-Infektion, primär nachgewiesen durch ein kulturelles diagnostisches Verfahren aus dem Stuhl, erlaubt der recomLine Campylobacter durch separates Auflinieren verschiedener rekombinant hergestellter Antigene die Bestimmung von spezifischen Campylobacter-Antikörpern zur Abklärung postinfektiöser Komplikationen (siehe Infektions-Folgeerkrankungen).

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 Antikörpernachweisverfahren 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.

Für den *recomLine* Campylobacter wurden verschiedene immundominante Antigene eingesetzt. Neben MOMP (major outer membrane protein, äußere Hauptmembranprotein), sind auch PEB4 (zytoplasmatisches Membranprotein), PEB2 (periplasmatisches Protein), PEB1 (periplasmatisches Protein, mit Beteiligung an der Zellbindung), OMP18 (outer membrane protein, äußeres Membranprotein, Peptidoglykan-assoziiertes Lipoprotein) und P39 (mögliches ATP/GTP bindendes Protein) auf dem *recomLine*-Streifen aufgebracht.

Rekombinantes Antigen	Abkürzung	Molekulargewicht [kDa]
Major outer membrane protein (porA)	MOMP	46
Cell-binding factor 2 (cbf2)	PEB4	31
Major antigenic peptide PEB2	PEB2	27
Major cell-binding factor (cbf1)	PEB1	28
Peptidoglycane associated lipoprotein	OMP18	18
Putative ATP/GTP binding protein	P39	39

Die in diesem Test eingesetzten Antigene ermöglichen auf einen Blick alternativ den Nachweis und die Identifizierung von IgG- bzw. IgA-Antikörpern, die spezifisch für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* sind. In nur einem Testansatz erhält man einen Überblick der Antikörper-Reaktivitäten gegen die wichtigsten Antigenklassen.

4. Testprinzip

Die rekombinanten, hochgereinigten Proteine werden auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen. Diese Matrix wird anschließend in Streifen geschnitten.

Zum Nachweis von Campylobacter-spezifischen Antikörpern werden die Streifen mit der verdünnten Serumprobe inkubiert, wobei die Antikörper sich an die Antigene auf den Streifen anlagern. Nicht gebundene Antikörper werden anschließend gewaschen und die Streifen in einem zweiten Schritt mit anti-human-IgG, bzw. -IgA inkubiert, die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind. Mit einer durch die Peroxidase katalysierten Färbereaktion werden spezifisch gebundene Antikörper nachgewiesen. Falls eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat, erscheint an der entsprechenden Stelle eine dunkle Bande auf dem Streifen.

Am oberen Ende der Teststreifen befinden sich untereinander vier Kontrollbanden:

1. Die Reaktionskontrolle unter der Streifennummer, die bei jedem Serum eine Reaktion zeigen muss.
2. Zwei Konjugatkontrollen IgG/IgA: diese Banden dienen zur Kontrolle der jeweiligen nachgewiesenen Antikörperklasse. Wird der Teststreifen z. B. zum Nachweis von IgG-Antikörpern benutzt, zeigt die Konjugatkontrollbande IgG eine deutliche Bande. Analoges gilt für die Konjugatkontrollbanden IgA.
3. Cutoff Kontrolle: zur Kontrolle des Färbeprozesses bzw. Auswertung der Teststreifen. Die Intensität dieser Bande erlaubt die Beurteilung der Antikörper-Reaktivität in positiv, fraglich oder negativ.

5. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 20 Bestimmungen.

Jeder Reagenziensatz enthält:

WASHBUF A 10 X	100 ml	Waschpuffer A (zehnfach konzentriert) Enthält Phosphat-Puffer, NaCl, KCl, Detergenz, Konservierungsmittel: MIT (0,1%) und Oxypyron (0,2%)
SUBS TMB	40 ml	Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, gebrauchsfertig)
MILKPOW	5 g	Magermilchpulver
INSTRU	1	Gebrauchsinformation
EVALFORM	1	Auswertebogen

5.1 recomLine Campylobacter IgG

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

TESTSTR	2 Stück	Röhrchen mit 10 durchnummerierten Teststreifen, beschichtet mit rekombinant hergestellten Campylobacter Antigenen
CONJ IgG	500 µl	Anti-human IgG Konjugat (hundertfach konzentriert, Grüne Verschlusskappe) Aus Kaninchen, enthält NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,1%) und Chlorazetamid (<0,1%)

5.2 recomLine Campylobacter IgA

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

TESTSTR	2 Stück	Röhrchen mit 10 durchnummerierten Teststreifen, beschichtet mit rekombinant hergestellten Campylobacter Antigenen
CONJ IgA	500 µl	Anti-human IgA Konjugat (hundertfach konzentriert, Farblose Verschlusskappe) Aus Kaninchen, enthält NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,1%) und Chlorazetamid (<0,1%)

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

Deionisiertes Wasser (hohe Qualität), Absaugsystem mit Desinfektionsfalle, Mikropipetten, Plastikpinzette, Schüttler, Messzylinder, Laborwaage.

Inkubationsschalen (sind bei Bedarf von der MIKROGEN GmbH zu beziehen),

7. Hinweise zum Test und den Reagenzien

7.1 Vorsichtsmaßnahmen

- ☞ Während des gesamten Testablaufs müssen geeignete Einmalhandschuhe getragen werden.
- ☞ Die Konjugate enthalten Natriumazid, MIT (Methylisothiazolon) und Chlorazetamid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu 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.
- ☞ Inkubationsschalen nur einmal verwenden.
- ☞ Streifen vorsichtig mit einer Plastikpinzette handhaben.

7.2 Hinweise zur Handhabung

Die Reagenzien vor und nach Gebrauch bei 2°C - 8°C lagern, **nicht einfrieren**. Vor Testbeginn sind alle Bestandteile für mindestens 30 Minuten auf 18°C - 25°C (Raumtemperatur) zu temperieren. Die Testdurchführung erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur.

Kommen in verschiedenen recomLine-, recomBlot- und ImmunoBlot-Testen die gleichen Reagenzien zum Einsatz (siehe Symbol-Aufdruck), können diese parameter- und chargenübergreifend eingesetzt werden. Dabei ist die Haltbarkeit dieser Komponenten zu beachten.

Vor Gebrauch die konzentrierten Konjugate gut durchmischen. Die Patientenseren ebenfalls gut mischen.

Das Röhrchen mit den Teststreifen ist erst unmittelbar vor Gebrauch zu öffnen, um eine Kondenswasserbildung zu vermeiden. Die nicht benötigten Streifen verbleiben im Röhrchen und werden weiterhin bei 2°C - 8°C gelagert (Röhrchen wieder gut verschließen, Teststreifen dürfen vor Versuchsbeginn nicht feucht werden!).

Die Streifen sind mit der fortlaufenden Nummer, sowie dem Testkürzel gekennzeichnet.

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

Die Kitkomponenten während der gesamten Testdurchführung vor direktem Sonnenlicht schützen.

Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.

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

7.3.1 Herstellung des gebrauchsfertigen Waschpuffers A

Dieser Puffer wird für die Serum- und Konjugatverdünnung sowie die Waschschritte benötigt.

Vor dem Verdünnen ist das Volumen des Waschpuffers A für die entsprechende Anzahl der durchzuführenden Tests zu bestimmen.

Das Magermilchpulver wird zuerst in Waschpuffer A-Konzentrat vorgelöst und diese Mischung dann mit deionisiertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt (Verdünnung: 1 + 9). Die benötigten Mengen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Volumina für in der Tabelle nicht aufgeführte Streifen-Anzahlen sind rechnerisch zu ermitteln.

Gebrauchsfertiger Waschpuffer A kann bei 2°C - 8°C vier Wochen gelagert werden. Der gebrauchsfertige Waschpuffer A ist geruchlos und leicht getrübt.

Tabelle 1: Waschpuffer A pro eingesetzte Teststreifen

eingesetzte Teststreifen	Magermilch Pulver	Waschpuffer A-Konzentrat	Deionisiertes Wasser	gebrauchsfertiger Waschpuffer A
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
15	1,5 g	30 ml	270 ml	300 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml
25	2,5g	50 ml	450 ml	500 ml
50	5 g	100 ml	900 ml	1000 ml

7.3.2 Herstellung der Konjugatlösungen

Die Konjugatlösung ist unmittelbar vor Gebrauch herzustellen, eine Lagerung der gebrauchsfertigen Konjugatlösung ist nicht möglich.

Ein Teil des IgG- bzw. IgA-Konjugat-Konzentrats wird mit 100 Teilen gebrauchsfertigem Waschpuffer A verdünnt (1 + 100).

Die benötigten Mengen sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Volumina für in der Tabelle nicht aufgeführte Streifen-Anzahlen sind rechnerisch zu ermitteln.

Tabelle 2: Volumina der Anti-human-IgG / IgA-Konjugat-Verdünnung

eingesetzte Teststreifen *	IgG- bzw. IgA-Konjugat-Konzentrat	gebrauchsfertiger Waschpuffer A
1	20 µl	2 ml
2	40 µl	4 ml
3	60 µl	6 ml
5	100 µl	10 ml
10	200 µl	20 ml
15	300 µl	30 ml
20	400 µl	40 ml
25	500 µl	50 ml

* Die Mengen sind ohne Totvolumen berechnet. Je nach Abarbeitung (manuell bzw. an einem Gerät) bitte zusätzliche Konjugatlösung für 1 bis 3 Streifen ansetzen.

7.3.3 Substratlösung

Das Substrat ist gebrauchsfertig. Vor Beginn der Färbung auf Raumtemperatur (18°C - 25°C) bringen.

Eine Kontamination der nicht verwendeten Substratlösung durch unsterile Pipettenspitzen etc. muss unbedingt vermieden werden, da dadurch die Sensitivität des Testes beeinträchtigt werden kann.

7.4 Lagerung und Haltbarkeit

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

Gebrauchsfertiger Waschpuffer A kann bei 2°C - 8°C vier Wochen gelagert werden.

Die Konjugatlösung muss immer frisch zubereitet werden.

8. Probenmaterial

Das Probenmaterial kann Serum oder Plasma sein, das nach Entnahme möglichst rasch vom Blutkuchen getrennt wurde, um eine Hämolyse zu vermeiden. Hitzeinaktivierte Proben können zu erhöhten Hintergrundreaktionen führen. Eine mikrobielle Kontamination der Probe ist unbedingt zu vermeiden. Unlösliche Stoffe sind vor der Inkubation aus der Probe zu entfernen.

Die Verwendung von lipämischen, hämolytischen oder trüben Proben kann einen dunklen Hintergrund auf den Streifen *recomLine Campylobacter* ergeben.

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.

9. Testdurchführung

9.1 Allgemeines

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Streifen ab. Die unter 9.3 und 9.5 beschriebenen Waschfrequenzen sollten deshalb immer eingehalten werden.

9.2 Inkubation der Proben

1. Für jeden Testansatz wird eine Vertiefung einer Inkubationsschale benötigt (siehe 6). In die Vertiefungen werden je **2 ml** des gebrauchsfertigen Waschpuffers A pipettiert. In die mit gebrauchsfertigem Waschpuffer A gefüllten Vertiefungen wird anschließend je ein Teststreifen vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette eingetaucht. Die Streifennummerierung zeigt nach oben.

Achtung!

Die Streifen müssen vollständig mit gebrauchsfertigem Waschpuffer A benetzt und untergetaucht sein.

Verwendete Röhrchennummer und Streifennummer im Auswertebogen notieren.

2. Probenzugabe

IgG/IgA-Testdurchführung: 20 µl einer unverdünnten Probe (Humanserum oder Plasma) werden je Inkubationsansatz zum Teststreifen pipettiert. (Verdünnung 1 + 100)

Bitte achten Sie darauf, die Probe an einem Ende des untergetauchten Streifens in den Waschpuffer A einzupipettieren und schnellstmöglich durch vorsichtiges Schütteln der Inkubationswanne einzumischen.

Probennummern und zu detektierende Immunglobulinklasse (IgG, IgA) im Auswertebogen notieren.

Die Inkubationsschale wird mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt und unter leichtem Schütteln **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubiert.

Achtung!

Es ist darauf zu achten, dass die Inkubationslösungen nicht in andere Vertiefungen verschleppt werden; insbesondere beim Öffnen und Schließen des Deckels sind Spritzer zu vermeiden.

9.3 Waschen

1. Nach der Inkubation werden die Kunststoffdeckel vorsichtig von den Inkubationsschalen abgenommen.
2. Die Serumverdünnung wird vorsichtig aus den einzelnen Vertiefungen abgesaugt.

Achtung!

Nach dem Absaugen der Lösungen aus einer Vertiefung sind die Pipettenspitzen zu wechseln oder nach jedem Absaugvorgang gut mit deionisiertem Wasser zu spülen, da die Gefahr einer Kreuzkontamination besteht.

Bei maschineller Abarbeitung sind diesbezüglich die Hinweise des Geräteherstellers zu beachten.

3. In jede Vertiefung werden anschließend **2 ml** des gebrauchsfertigen Waschpuffers A gegeben und für **5 Minuten** unter leichtem Schütteln auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem Waschvorgang wird der Waschpuffer A abgesaugt.
4. Der Waschschrift unter Punkt 3 wird insgesamt **dreimal** durchgeführt.

9.4 Inkubation mit Peroxidase-Konjugat

Nach dem Waschen der Streifen werden in jede Vertiefung **2 ml** der entsprechend vorbereiteten Konjugatlösung (siehe Tabelle 2) gegeben und **45 Minuten** unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wird die Inkubationsschale mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt.

9.5 Waschen

Die Konjugatlösungen werden aus den Inkubationswannen abgesaugt und die Streifen erneut gewaschen (vergleiche 9.3).

9.6 Substratreaktion

1. In jede Vertiefung werden **1,5 ml Substratlösung** gegeben und **5 - 10 Minuten** unter leichtem Schütteln und unter Beobachtung bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Sobald die Cutoff-Kontrollbande zu sehen ist, wird der Färbeprozess beendet.

9.7 Abstoppen der Reaktion

1. Nach Absaugen der Substratlösung werden die Streifen dreimal kurz mit deionisiertem Wasser gewaschen.
2. Die Streifen werden vorsichtig mit einer Plastikpinzette aus dem Wasser entnommen und zum Trocknen für ca. 2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähigen Papiers gelegt. Anschließend können die Streifen auf dem beigelegten Auswertebogen aufgeklebt und die Ergebnisse protokolliert werden.
3. Die Streifen sollten vor Licht geschützt aufbewahrt werden.

10. Zusammenfassung der Testdurchführung

1.	alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.
2.	in 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A die Streifen einlegen, die Streifen müssen komplett untergetaucht sein.
3.	jeweils 20 µl von der Probe einpipettieren
4.	1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren

5.	dreimal je 5 Minuten, mit je 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A, auf dem Schüttler waschen
6.	2 ml gebrauchsfertige Konjugatlösung zugeben
7.	45 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren
8.	dreimal je 5 Minuten, mit je 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A, auf dem Schüttler waschen
9.	1,5 ml der Substratlösung zugeben; 5 - 10 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren.
10.	mindestens dreimal mit deionisiertem Wasser waschen
11.	2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähigen Papiers trocknen und das Ergebnis ablesen

11. Auswertung

11.1 Bewertung der Bandenintensität

- Notieren Sie im beigegefügtten Auswertebogen Datum und Chargen-Nummer, sowie die detektierte Antikörperklasse.
- Tragen Sie die Proben-Identifizierungs-Nummern in das Protokollblatt ein.
- Kleben Sie nun mit einem Klebestift die dazugehörigen Teststreifen in die entsprechenden Felder des Auswertebogens. Richten Sie dazu die Teststreifen mit der Reaktionskontroll-Bande an der eingezeichneten Markierungslinie aus. Kleben Sie dann mit einem durchsichtigen Klebeband die Teststreifen links von der Markierungslinie an. Flächiges Ankleben der ganzen Teststreifen mit Klebestift oder Klebeband kann zu Veränderungen der Färbung führen.
- Identifizieren Sie nun die Banden der entwickelten Teststreifen anhand des aufgedruckten Kontrollstreifens des Auswertebogens und tragen diese in das Protokollblatt ein. Nehmen Sie dazu anhand der Tabelle 3 die Bewertung der Intensität der auftretenden Banden gesondert für die entsprechenden Immunglobulin-Klassen vor.

11.2 Kontrollergebnisse

Eine Auswertung des Tests kann erfolgen, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Reaktionskontroll-Bande (oberste Linie) deutlich gefärbt, dunkle Bande
- Antikörperklasse (zweite und dritte Bande): die entsprechende Konjugatkontrollbande muss eine deutliche Färbung zeigen. Die andere Konjugatkontrollbande kann eine schwache, unspezifische Färbung entwickeln.
- Cutoff-Kontrolle (vierte Bande): schwache, aber sichtbare Färbung

Tabelle 3: Bewertung der Bandenintensität im Bezug zur Cutoff-Bande

Banden	Intensität
keine Reaktion	-
sehr schwache Intensität (geringer als Cutoff-Bande)	+/-
schwache Intensität (entspricht Cutoff Bande)	+
starke Intensität / (stärker als Cutoff-Bande)	++
sehr starke Intensität	+++

Achtung !

Die Bandenmuster beim *recomLine* Campylobacter IgG- und IgA-Nachweis können unterschiedliche Intensitäten aufweisen. Es ist möglich, dass der *recomLine* IgG kräftigere und dunklere Banden als der *recomLine* IgA zeigt. Die Intensität der Proteinbanden ist abhängig von der Konzentration der Campylobacter-spezifischen Antikörper.

11.3 Testergebnisse und Testinterpretation

Zur sicheren und einfachen Testauswertung wurde auf Grund von klinischen Evaluierungen und einer mathematischen Analyse eine Punktbewertung der Campylobacter-Antigene im **recomLine Campylobacter** durchgeführt. Darauf basierend kann das Testergebnis durch Summierung der Punkte und anschließende Beurteilung erhalten werden.

Das Testergebnis erhält man durch Addition der entsprechenden Punktwerte der einzelnen mit + , ++ oder +++ bewerteten Banden (Tabelle 4). Die resultierende Summe wird in die Spalte mit dem Summenzeichen eingetragen. Die positive, fragliche oder negative Beurteilung der Probe kann dann direkt bestimmt und in die Spalte Beurteilung eingetragen werden.

Tabelle 4: Punktbewertung der Campylobacter-Antigene im recomLine Campylobacter

Antigen	Punkte im IgG	Punkte im IgA
MOMP	3	3
PEB4	5	5
PEB2	1	1
PEB1	2	2
OMP18	5	5
P39	5	5

Tabelle 5: Beurteilung der Testergebnisse im recomLine Campylobacter

Summe der Punkte	Beurteilung
≤ 3	negativ
4	fraglich
≥ 5	positiv

Teststreifenauswerte-Software: recomScan

Die recomScan-Software ist zur Unterstützung der Interpretation der **recomLine Campylobacter**-Teststreifen bestimmt.

Weitere Informationen hierzu erhalten Sie auf Anfrage bei MIKROGEN.

Achtung:

Verwenden Sie nicht die automatisierte Interpretation ohne die unten beschriebenen Hinweise zur Interpretation zu beachten.

11.4 Hinweise zur Interpretation

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

Proben mit fraglichen Ergebnissen sollten in Abhängigkeit von der klinischen Situation nach 2 - 3 Wochen kontrolliert werden.

Für alle Testinterpretationen, besonders aber bei fraglichen/positiven Resultaten, ist die Einbeziehung klinischer Informationen unerlässlich. Es empfiehlt sich auch hier eine enge Kooperation von Labor und behandelndem Arzt.

Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer *Campylobacter jejuni/coli*-Infektion nicht grundsätzlich aus. Falsch negative Ergebnisse können auftreten, wenn die Probeabnahme vor der initialen Reaktion des Immunsystems erfolgte.

Dunkle Teststreifen: Manche Patientenserum können auf dem gesamten Nitrozellulose-Streifen eine dunkle, durchgängige oder gemusterte Färbung erzeugen (z.B. bei Seren von Patienten mit Milcheiweiß-Allergien). Hierfür sind unterschiedliche Faktoren aus dem jeweiligen Patientenserum

verantwortlich. Die Auswertung dieser Streifen ist in der Regel nur mit Einschränkungen möglich. So sind z.B. "inverse" Banden (weiße Banden auf dunklem Hintergrund) als negativ zu werten. Das entsprechende Serum sollte in jedem Fall mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

12. Klinische Ergebnisse

Zur Leistungsbewertung des *recomLine Campylobacter IgG/IgA* wurden Patientenproben unterschiedlicher Herkunft getestet. Die Ergebnisse wurden in den entsprechenden Tabellen dargestellt mit der zusätzlichen Information über die Häufigkeiten der positiven Reaktivitäten der einzelnen rekombinanten Antigene.

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

In dieser Studie wurden insgesamt 250 Serumproben von Patienten mit einer positiven Campylobacter Stuhlkultur untersucht. Die Blutabnahmen fanden nach 0 bis 40 Tagen nach der Stuhldiagnostik statt, der Krankheitsbeginn war nicht bekannt. Die IgG-Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst, die IgA-Ergebnisse in Tabelle 7.

Nach einer gesicherten Campylobacter-Infektion konnten bei 80% der Patientenproben IgG-Antikörper und bei 37% IgA-Antikörper nachgewiesen werden.

Bei Proben von Patienten mit positiver Campylobacter Stuhlkultur fällt auf, daß Ergebnisse mit hoher Punktzahl überwiegen (63 % \geq 10 Punkte). Im Gegensatz dazu werden bei Proben von Blutspendern nur selten Punktwerte \geq 10 gemessen. Ein hoher Punktwert, d.h. Nachweis mehrerer, unterschiedlicher Campylobacter-Antikörper, korreliert mit einer kürzlich zurückliegenden Infektion.

12.2 Blutspender

Weiterhin wurden 160 nicht selektierte Blutspenderplasmen untersucht.

Dabei wurde eine Seroprävalenz im IgG-Test von 14% und im IgA-Test von 2,5% gefunden, siehe Tabelle 6 (IgG) und Tabelle 7 (IgA).

12.3 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 *recomLine Campylobacter* durchgeführt, die noch kein Antigen P39 enthielt.

Bei diesem Probenkollektiv konnten 6,7fach häufiger IgA-Antikörper im Vergleich zu Blutspendern nachgewiesen werden, eine signifikante prozentuale Häufung der IgG-Antikörper wurde nicht beobachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 (IgG) und Tabelle 7 (IgA) dargestellt.

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

Proben von 56 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 2,8fach häufiger IgA-Antikörper und 1,6fach häufiger IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 (IgG) bzw. in Tabelle 7 (IgA) dargestellt.

Tabelle 6: recomLine Campylobacter IgG - Proben von Patienten mit positiver Campylobacter Stuhlkultur, Verdacht auf Guillain-Barré-Syndrom bzw. Reaktive Arthritis unklarer Ätiologie sowie Proben von Blutspendern

recomLine Campylobacter IgG	Häufigkeit der rekombinanten Antigene [%]						IgG-positives Testergebnis
	MOMP	PEB4	PEB2	PEB1	OMP18	P39	
C.jejuni/C.coli positive Stuhlkultur (n=250)	5	21	3	6	53	69	80%
GBS-Proben mit unklarer Ätiologie (n=30)	13	13	10	7	10	n. d.*	20%
ReA-Proben mit unklarer Ätiologie (n=56)	5	9	2	0	12	14	30%
Blutspender (n=160)	2	3	1	1	6	8	14%

* n. d.: nicht durchgeführt, getestet mit recomLine Campylobacter ohne P39

Tabelle 7: recomLine Campylobacter IgA - Proben von Patienten mit positiver Campylobacter Stuhlkultur, Verdacht auf Guillain-Barré-Syndrom bzw. Reaktive Arthritis unklarer Ätiologie sowie Proben von Blutspendern

recomLine Campylobacter IgA	Häufigkeit der rekombinanten Antigene [%]						IgA-positives Testergebnis
	MOMP	PEB4	PEB2	PEB1	OMP18	P39	
C.jejuni/C.coli positive Stuhlkultur (n=250)	2	2	0	1	18	26	37%
GBS-Proben mit unklarer Ätiologie (n=30)	7	7	0	0	3	n. d.*	10%
ReA-Proben mit unklarer Ätiologie (n=56)	2	2	0	2	4	2	7%
Blutspender (n=160)	1	1	0	1	1	1	2,5%

* n. d.: nicht durchgeführt, getestet mit recomLine Campylobacter ohne P39

12.5 Mögliche Störseren

Insgesamt wurden 61 Patientenproben mit potentiell interferierenden Faktoren untersucht (lipämische, ikterische und hämolytische Proben sowie Proben von Patienten mit akuter EBV-Infektion, hohem Ig-Gehalt oder positivem Rheumafaktor).

Bei Proben von Patienten mit einem positiven Rheumafaktortest bzw. mit einem hohen Gesamtimmunglobulinspiegel wurden keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Testergebnisse gefunden.

Bei Vorliegen von lipämischen, ikterischen und hämolytischen Proben sowie Proben von Patienten mit einer infektiösen Mononukleose (EBV-Infektion) kann es dagegen zu falsch positiven Ergebnissen kommen.

12.6 Vergleich Serum und Plasma

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

13. Literatur

Die ausführliche Literaturliste finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation ab Seite 22.

Auf Anforderung senden 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 24.

recomLine Campylobacter IgG

recomLine Campylobacter IgA

Line immunoassay based on recombinant antigens for the determination of IgG and IgA antibodies against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in human serum and plasma.

1. General aspects, intended use

recomLine Testkit Campylobacter is a qualitative in-vitro-Test for the detection of IgG- and IgA-antibodies against protein antigens of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.

In cases of previous or persistent Campylobacter infection with primary diagnosis based on stool sample culturing, recomLine Campylobacter provides for identification of specific Campylobacter antibodies by means of separate lineups of different antigens produced by recombinant engineering for the purpose of clarifying post-infection complications (see Sequelae).

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.

The *recomLine Campylobacter* is based on recombinant *Campylobacter* antigens which contains the MOMP (major outer membrane protein), the PEB4 (cytoplasmic protein membrane protein), the PEB2 (periplasmic protein), the PEB1 (periplasmic protein, cell binding factor), OMP18 (outer membrane protein, peptidoglycan-associated lipoprotein) and P39 (putative ATP/GTP binding protein).

Recombinant Antigen	Abbreviation	Size of rec. Antigens [kDa]
Major outer membrane protein (porA)	MOMP	46
Cell-binding factor 2 (cbf2)	PEB4	31
Major antigenic peptide PEB2	PEB2	27
Major cell-binding factor (cbf1)	PEB1	28
Peptidoglycane associated lipoprotein	OMP18	18
Putative ATP/GTP binding protein	P39	39

The antigens used in this test facilitate the detection and identification of alternatively IgG resp. IgA antibodies specific to *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. This allows a view on the reactivities against the most important antigens in only one test run.

4. Test principle

The recombinant, highly purified proteins are applied to a nitrocellulose membrane. This matrix is then cut into strips.

To facilitate detection of Campylobacter specific antibodies, the strips are incubated with the diluted serum or plasma sample, whereby the antibodies bind to the antigens on the strips. Unbound antibodies are then flushed away and the strips are incubated in a second step with anti-human IgG or IgA coupled with horse radish peroxidase. Specifically bound antibodies are detected by means of a colour reaction catalysed by the peroxidase. If an antigen-antibody reaction has taken place, a dark band appears at the corresponding locus on the strip.

Four control bands are arranged side-by-side at the upper end of the test strip:

1. The reaction control band under the strip number, which must show a reaction to every serum.
2. Two conjugate control bands: IgG/IgA. These bands serve as controls for the antibody class detected in each case. For instance, if the test strip is used to detect IgG antibodies, the conjugate control band IgG shows a clearly defined band. This applies analogously to the conjugate band IgA.
3. "Cutoff control": For control of the coloration process and evaluation of the test strip. The intensity of this band provides a basis for evaluation of the antibody reactivity as positive, borderline or negative.

5. Package contents

The reagents in a pack are sufficient for 20 determinations.

Each reagent set contains:

WASHBUF A 10 X	100 ml	Wash buffer A (ten times the concentration) contains phosphate buffer, NaCl, KCl, detergent and preservatives MIT (0,1%) and Oxypyron (0,2%)
SUBS TMB	40 ml	Substrate Solution Tetramethylbenzidin (TMB, ready-to-use)
MILKPOW	5 g	Skim milk powder
INSTRU	1	Instructions for use
EVALFORM	1	Evaluation form

5.1 recomLine Campylobacter IgG

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

TESTSTR	2 pieces	Test tubes with 10 consecutively numbered test strips, coated with recombinant Campylobacter -antigens
CONJ IgG	500 µl	Anti-human IgG conjugate (green screw cap, hundred times the concentration) from rabbit, contains NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,1%), Chloracetamide (<0,1%)

5.2 recomLine Campylobacter IgA

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

TESTSTR	2 pieces	Test tubes with 10 consecutively numbered test strips, coated with recombinant Campylobacter -antigens
CONJ IgA	500 µl	Anti-human IgA conjugate (colourless screw cap, hundred times the concentration) from rabbit, contains NaN ₃ (<0,1%), MIT (<0,1%), Chloracetamide (<0,1%)

6. Additional reagents and accessory equipment required

Deionised water (high quality), vacuum extraction system with disinfection trap, micro pipettes, plastic forceps, shaker, metric cylinder with graduations, scales.

Incubation trays (can be obtained from MIKROGEN GmbH)

7. Information on test and reagents

7.1 Precautions

- ☞ Suitable single-use gloves must be worn during the entire test procedure.
- ☞ The conjugates contain sodium azide, MIT (methylisothiazolone) and Chloracetamide. Avoid 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.
- ☞ Use incubation trays only once.
- ☞ Handle strips carefully with a plastic forceps.

7.2 Handling information

Store reagents before and after use at 2°C - 8°C, **do not freeze**. Temper all components before starting the test for at least 30 minutes to 18°C - 25°C (room temperature). Both the test and incubation procedures are carried out at room temperature.

Identical reagents (according to the printed symbols) in all *recomLine*-, *recomBlot* and *ImmunoBlot*-tests can be used irrespective of parameter or lot. Please mind the expire date of the components.

Mix the concentrated conjugates well before use. Mix the patient sera well before use as well.

Do not open the tube containing the test strips until just before use to avoid condensation of water. The remaining strips must be left in the tube and stored further at 2°C - 8°C (re-close tube tightly, test strips must not become moist before testing!).

The strips are consecutively numbered and marked with the shortcut of the respective test.

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

Please protect all kit components from direct sun light.

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

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 solutions

7.3.1 Preparation of ready-to-use wash buffer A

This buffer is used for both serum and conjugate dilution as well as for the washing steps.

Prior to dilution, the volume of wash buffer A required for the corresponding number of tests must be determined.

The skim milk powder is first dissolved in wash buffer A concentrate. This mixture is then filled up with deionised water to the final volume (dilution: 1 + 9). See Table 1 for the amounts required. Volumes for numbers of test strips not listed in the table have to be determined by calculation.

Ready-to-use wash buffer A can be stored at 2°C - 8°C for four weeks. Ready-to-use wash buffer A is slightly turbid and scentless.

Table 1: Wash buffer A per test strip used

Test strips used	Skim milk powder	Wash buffer A concentrate	Deionised water	Ready-to-use wash buffer A
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
15	1,5 g	30 ml	270 ml	300 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml
25	2,5g	50 ml	450 ml	500 ml
50	5 g	100 ml	900 ml	1000 ml

7.3.2 Preparation of conjugate solutions

The conjugate solution is to be prepared immediately before use. It is not possible to store the ready-to-use conjugate solution.

One part of IgG resp. IgA conjugate concentrate is diluted with 100 parts of ready-to-use wash buffer A (1 + 100).

See Table 2 for the amounts required. Volumes for numbers of test strips not listed in the table have to be determined by calculation.

Table 2: Volumes for anti-human IgG resp. IgA conjugate dilution

Test strips used *	IgG resp. IgA conjugate concentrate	Ready-to-use wash buffer A
1	20 µl	2 ml
2	40 µl	4 ml
3	60 µl	6 ml
5	100 µl	10 ml
10	200 µl	20 ml
15	300 µl	30 ml
20	400 µl	40 ml
25	500 µl	50 ml

* The volumes have been calculated without dead volume. Depending on handling (manually or by machine processing) please prepare conjugate solution for additional 1 to 3 strips.

7.3.3 Substrate solution

The substrate is ready for use! Bring to room temperature (18°C - 25°C) before starting the colour reaction.

Avoid contamination of the unused substrate solution by nonsterile pipette tips, etc. at all costs since this may affect test sensitivity.

7.4 Storage and stability

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

Ready-to-use wash buffer A can be stored at 2°C - 8°C for four weeks.

The conjugate solution is to be prepared always freshly.

8. Sample material

The sample material can be serum or plasma that is separated from the coagulum as soon as possible after sampling. A microbial contamination of the sample has to be avoided at all costs. Insoluble substances are to be removed from the sample prior to incubation by means of centrifugation.

Use of lipaemic, haemolytic or turbid samples may result in a dark background in the *recomLine* Campylobacter IgG/IgA.

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 colder. Repeated freezing and thawing of the samples is not recommended because this may affect the quality of the results.

9. Test procedure

9.1 General

The reproducibility of the results depends to a great extent on consistent washing of the strips. The washing frequencies described under 9.3. and 9.5 should therefore always be maintained.

9.2 Incubation of samples

1. One well in the incubation tray (see 6) is required per sample to be tested. **2 ml** of ready-to-use wash buffer A is pipetted into each well. Then one test strip is carefully dipped into each of the wells filled with ready-to-use wash buffer A using a plastic forceps. The strip number must face upwards.

Important!

The strip must be completely wet and immersed in the ready-to-use wash buffer A.

Record the tube and strip numbers used on the evaluation sheet.

2. Adding the samples

IgG/IgA test procedure: **20 µl** of an undiluted sample (human serum or plasma) is pipetted into the proper wells (**dilution 1 + 100**).

Please be sure to add the sample at one end of the immersed strips into the wash buffer A and mix as soon as possible by shaking the tray carefully.

Record the sample numbers and the immunoglobulin class (IgG, IgA) on the evaluation sheet.

Cover the incubation tray with the plastic lid and incubate for **1 hour** at room temperature while shaking gently.

Important!

Make sure the incubation solutions are not carried over into other wells; be particularly careful to avoid splashing when opening and closing the lid.

9.3 Washing

1. Following incubation, the plastic lids are carefully removed from the incubation trays.
2. The serum dilution is carefully aspirated from the individual wells.

Important!

When the solutions have been aspirated from a well, the pipette tip has to be changed or rinsed well with deionised water after each aspiration procedure to prevent cross-contamination.

In the case of machine processing the references of the equipment manufacturer have to be considered.

3. Then place **2 ml** of the ready-to-use wash buffer A in each well and wash on the shaker while shaking gently for **5 minutes**. The wash buffer A is aspirated after the washing procedure.
4. Carry out the washing step under 3. a total of **three times**.

9.4 Incubation with peroxidase conjugate

After washing the strips, place **2 ml** of the appropriately prepared **conjugate solution** (see Table 2) into each well and incubate for **45 minutes** while shaking gently at room temperature, whereby the incubation tray is covered with the plastic lid.

9.5 Washing

The conjugate solutions are aspirated from the wells and the strips are washed again (see 9.3).

9.6 Substrate reaction

1. Add **1.5 ml substrate solution** into each well and incubate for **5 - 10 minutes**, shaking gently and under observation, at room temperature.
2. You should terminate the reaction as soon as the cutoff control band can be seen.

9.7 Stopping the reaction

1. After the solution is aspirated, wash the strips briefly **three times with deionised water**.
2. Use a plastic forceps to remove the strips carefully from the water and place them between 2 layers of absorbent paper to dry for about 2 hours. The strips may be adhesively attached to the enclosed evaluation sheet and the results may be recorded.
3. The strips should be stored protected from exposure to light.

9.8 Test procedure of avidity determination

The avidity test procedure is described in detail in the instructions for use for the avidity reagent (Article No.: 11010).

10. Summary of the test procedure

1.	bring all reagents to room temperature
2.	deposit the strips in 2 ml ready-to-use wash buffer A and take care that they are completely immersed in the ready-to-use wash buffer A
3.	pipette 20 µl of the sample
4.	incubate for 1 hour at room temperature while shaking gently
5.	wash on the shaker three times with 2 ml of ready-to-use wash buffer A for 5 minutes each time
6.	add 2 ml appropriately prepared conjugate solution
7.	incubate at room temperature for 45 minutes while shaking gently
8.	wash on the shaker three times with 2 ml of ready-to-use wash buffer A for 5 minutes each time
9.	add 1.5 ml of the substrate solution, incubate while shaking at room temperature for 5 - 10 minutes
10.	wash the strips at least three times with deionised water
11.	dry the strips between 2 layers of absorbent paper for 2 hours and read off the result

11. Evaluation

11.1 Evaluation of band intensity

1. On the enclosed evaluation sheet, record the date, lot and tube number along with the antibody class detected.
2. Enter the sample identification number on the protocol sheet.
3. Now attach the corresponding test strips with a glue stick into the corresponding fields of the evaluation sheet. To do this, place the test strips with the reaction control band on the marking lines. Then use clear adhesive tape to attach the test strips left from the marking line. Complete sticking of the test strip with glue or adhesive tape may lead to aberrations of the colouring.
4. Now identify the bands of the developed test strips based on the printed control strip on the evaluation sheet and record them in the protocol sheet (Table 3). Identify the bands on the test strips separately for the respective immunoglobulin classes.

11.2 Control results

The test can be evaluated if the following criteria are met:

- Reaction control band (upper line) pronounced colour, dark band
- Antibody class (second and third band): The corresponding conjugate control band must show a clear colour reaction. The other conjugate control band may develop a weak, non-specific colouring.
- Cutoff control (fourth band): weak, but clearly evident colouring.

Table 3: Intensity of bands in relation to the cutoff band

Bands	Intensity
No reaction	-
Intensity weaker than the cutoff band	±
Same intensity as the cutoff band	+
Strong intensity (stronger than the cutoff band)	++
Very strong intensity	+++

Important!

The band patterns in *recomLine* Campylobacter IgG and IgA detection tests may show varying intensities. It is possible that the IgG *recomLine* will show more intense and darker bands than the IgA *recomLine*. The intensity of the protein bands depends on the concentration of the Campylobacter-specific antibodies.

11.3 Test results and test interpretation

On the basis of clinical testing and a mathematical analysis a point evaluation of Campylobacter antigens in **recomLine Campylobacter** was carried out for safe and easy test evaluation. According to this, the test result can be obtained by adding up the points and subsequent evaluation.

The test result is obtained by the addition of the point values of the separate bands, that are determined as +, ++ or +++ (Table 4). The resulting total of points is entered into the column, marked with the sum symbol. Finally the positive, borderline or negative result are determined on the basis of the point value and recorded into the column "interpretation".

Table 4: Point evaluation of Campylobacter antigens in *recomLine* Campylobacter

Antigen	Points in IgG	Points in IgA
MOMP	3	3
PEB4	5	5
PEB2	1	1
PEB1	2	2
OMP18	5	5
P39	5	5

Table 5: Testevaluation in *recomLine* Campylobacter

Sum of points	Evaluation
≤ 3	negative
4	borderline
≥ 5	positive

Test stripe interpretation software: *recomScan*

The *recomScan* software is designed for support of the interpretation for ***recomLine* Campylobacter** test strips.

You will receive further information on request from MIKROGEN.

Warning:

Please do not use the automated interpretation without taking into account „Directions for Interpretation“ mentioned below.

11.4 Notes on interpretation of the results

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

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

In all test interpretations, especially of weak positive results, 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.

A negative 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.

Dark test strips: Some patient sera may cause a dark, continuous or patterned coloration on the entire nitrocellulose strip (e.g. sera from patients with milk protein allergies). Various different factors in each patient serum are responsible for this effect. Evaluation of these strips is usually feasible in a restricted sense only. For instance, "inverse" bands (white bands on a dark background) must be evaluated as negative. The corresponding serum should in any case be tested using other serological methods.

12. Clinical results

Patient samples from different sources were tested to assess the performance capability of *recomLine* Campylobacter IgG/IgA. The results are listed in the corresponding tables, correlated with additional data on the frequency of positive reactivity for the individual recombinant antigens.

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

This study considered a total of 250 serum samples from patients with positive Campylobacter stool cultures. Blood samples were taken 0 to 40 days after the stool diagnostics, the beginning of the disease was unknown. The IgG results are shown in Table 6 and the IgA results in Table 7.

Following confirmed Campylobacter infections, 80% of patient samples were found to contain IgG antibodies and 37% IgA antibodies.

In the case of samples from patients with positive Campylobacter stool culture it is obvious that results with higher points scores predominate (63 % \geq 10 points). Samples from blood donors, on the other hand, result in points \geq 10 only rarely. A high points score, meaning detection of several, different Campylobacter antibodies, correlates with a recent infection.

12.2 Blood donors

160 non-selected blood donor plasma samples were tested.

The results were a seroprevalence in the IgG test of 14% and in the IgA test of 2.5%, see Table 6 (IgG) and Table 7 (IgA).

12.3 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 *recomLine* Campylobacter test version of the year 2005 that contains no antigen P39.

IgA antibodies were detected 6.7 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 6 (IgG) and Table 7 (IgA).

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

Samples from 56 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 antibodies were detected in this collective 2.8 times more frequently than in the blood donor collective. The frequency percentiles of IgG antibodies were 1.6 times higher compared to blood donor samples. The results are presented in Table 6 (IgG) and Table 7 (IgA).

Table 6: *recomLine* Campylobacter IgG – Samples from patients with positive *C.jejuni* / *C.coli* stool culture, suspected Guillain-Barré-Syndrom resp. Reactive Arthritis of unclarified aetiology and blood donor samples

recomLine Campylobacter IgG	frequency of the recombinant antigens [%]						IgG-positive results
	MOMP	PEB4	PEB2	PEB1	OMP18	P39	
<i>C.jejuni/C.coli</i> positive stool culture (n=250)	5	21	3	6	53	69	80%
GBS-samples with unclarified aetiology (n=30)	13	13	10	7	10	n. d.*	20%
ReA-samples with unclarified aetiology (n=56)	5	9	2	0	12	14	30%
Blood donors (n=160)	2	3	1	1	6	8	14%

* n. d.: not determined

Table 7: recomLine Campylobacter IgA – Samples from patients with positive *C.jejuni* / *C.coli* stool culture, suspected Guillain-Barré-Syndrom resp. Reactive Arthritis of unclarified aetiology and blood donor samples

recomLine Campylobacter IgA	frequency of the recombinant antigens [%]						IgA-positive results
	MOMP	PEB4	PEB2	PEB1	OMP18	P39	
<i>C.jejuni/C.coli</i> positive stool culture (n=250)	2	2	0	1	18	26	37%
GBS-samples with unclarified aetiology (n=30)	7	7	0	0	3	n. d.*	10%
ReA-samples with unclarified aetiology (n=56)	2	2	0	2	4	2	7%
Blood donors (n=160)	1	1	0	1	1	1	2,5%

* n. d.: not determined

12.5 Potentially falsifying sera

A total of 61 patient samples with potentially interfering factors were tested (lipaemic, icteric and haemolytic samples as well as samples from patients with infectious mononucleosis (EBV infection), high total immunoglobulin levels or positive rheumatism factor).

Investigations of potential interference factors revealed no evidence that test results were affected in cases of samples from patients that were positive for rheumatism factor or showed high total immunoglobulin levels.

False positive results may occur with lipaemic, icteric and haemolytic samples or samples from patients with infectious mononucleosis (EBV infection).

12.6 Serum-plasma comparison

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

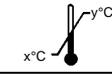
13. Literature

- (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, Aspinall 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) Heintschel 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.

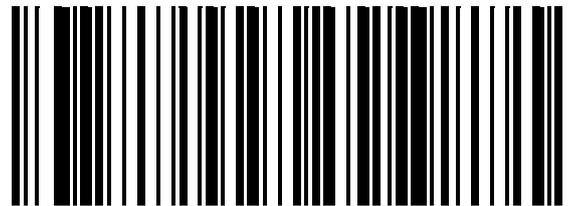
- (16) Burnens A., Stucki U., Nicolet J., Frey J. (1995), Identification and Characterization of an Immunogenic Outer Membrane Protein of *Campylobacter jejuni*, J Clin Microbiol 33/11 2826-2832.
- (17) Pei Z., Ellison R. T., Blaser M. J. (1991), Identification, Purification, and Characterization of 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 *Campylobacter* diagnostics at your request.

14. Explanations of the symbols

	Contains sufficient for < n > tests amount of tests	Inhalt ist ausreichend für < n > Ansätze Anzahl der Ansätze
EVALFORM	Evaluation form	Auswertebogen
INSTRU	Instructions for use	Gebrauchsinformation
	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 Mindesthaltbarkeitsdatum
	Temperature limitation Store between x°C and y°C	Lagerung bei x°C bis y°C

recomLine Campylobacter IgG	Artikel-Nr./ Article No.:	6272
recomLine Campylobacter IgA	Artikel-Nr./ Article No.:	6273
Gebrauchsinformation/ Instructions for use:		GIRLCJ006DE
gültig ab/ valid from:		2023-03
MIKROGEN GmbH	Tel: +49 (0)89 54 80 1-0	
Anna-Sigmund-Str. 10	Fax: +49 (0)89 54 80 1-100	
82061 Neuried		
Germany		
www.mikrogen.de	mikrogen@mikrogen.de	
		



GIRLCJ006