

# Microsporidia IFAT

Indirekter Immunfluoreszenztest zur spezifischen Diagnose von Microsporidiose im menschlichen Darm  
2 x 50 Tests für die diagnostische in-vitro-Anwendung und im professionellen Laboreinsatz



Gebrauchsanweisung für Produkt N° 8100  
N° CE: H-CH/CA01/IVD/12173 - UDI-DI: 07640158218105



## Anwendungsgebiet:

Das Microsporidia IFAT-Kit von Bordier ist für den direkten qualitativen Nachweis von Sporen beider Arten im menschlichen Stuhl bestimmt. Dieser Test ermöglicht demnach eine Diagnose der Art.

## Hintergrund-Informationen:

Microsporidiose ist eine weltweite opportunistische Infektion, die durch *Microsporidien*, einer Gruppe von obligaten intrazellulären parasitären Pilzen, verursacht wird. *Enterocytozoon bieneusi* und *Encephalitozoon intestinalis* sind die beiden Arten, die für gastrointestinale Erkrankungen beim Menschen verantwortlich sind. Durch *E. intestinalis* verursachte Infektionen werden mit Albendazol behandelt, während sich Fumagillin für die Beseitigung von *E. bieneusi* als wirksam erwiesen hat. Daher ist es für die Bestimmung der geeigneten Behandlung wichtig, die Art zu identifizieren. Menschen können durch Verschlucken von *Microsporidia*-Sporen infiziert werden. Infektiöses Sporoplasma dringt in Wirtszellen ein, vervielfältigt sich und reift zu Sporen heran. Die Membran der Wirtszelle bricht auf und gibt die Sporen an die umliegenden Bereiche ab. Diese freien reifen Sporen können neue Zellen infizieren und so den Zyklus wiederholen. Infektionen treten bei stark immungeschwächten Personen auf. Das Haupt-Symptom ist Durchfall. Die Diagnose basiert auf einer mikroskopischen Untersuchung von Sporen in Stuhlproben, einem Immunfluoreszenztest oder der Erfassung von DNA mittels PCR.

## Testprinzip:

Das Kit enthält monoklonale Antikörper und das fluoreszierende Konjugat, das 2 x 50 Immunfluoreszenztests auf Objektträgern ermöglicht. Monoklonale Antikörper binden sich spezifisch an die Sporenproben, die in den Reaktionsfeldern der Objektträger fixiert wurden. Nicht fixierte Antikörper werden gewaschen. Das Vorhandensein von sporenspezifischen Antikörpern wird mit einem fluoreszierenden Anti-Maus-IgG-Konjugat nachgewiesen. Ein zweiter Waschschritt entfernt das ungebundene Konjugat. Nach dem Aufbringen zwischen Objektträger und Deckglas erfolgt das Auslesen mit einem Fluoreszenzmikroskop.

## Kitbestandteile (2 x 50 Tests):

<b>MAB1</b>	8100-01	Monoklonaler Antikörper anti- <i>E. bieneusi</i> gebrauchsfertig (roter Verschluss)	2 x 0,5 ml
<b>MAB2</b>	8100-02	Monoklonaler Antikörper anti- <i>E. intestinalis</i> gebrauchsfertig (grüner Verschluss)	2 x 0,5 ml
<b>CONJ</b>	8100-03	Gebrauchsfertiges fluoreszierendes (488nm) Anti-Maus-IgG-Konjugat mit Evans-Blau-Farbstoff	1 x 2 ml

## Verfallsdatum und Lagerung:

Lagern Sie das Kit bei 2 bis 8°C (Transport bei Raumtemperatur) und vermeiden Sie es, die Komponenten längere Zeit direktem Licht auszusetzen. Das Verfallsdatum und die Postennummer sind auf der Rückseite der Schachtel aufgedruckt. Nach dem ersten Öffnen bleiben alle Reagenzien bis zum Verfallsdatum stabil, sofern sie bei 2-8°C gelagert werden.

Hinweis: Sobald Objektträger bestückt und versiegelt sind, bleiben sie 6 Monate lang stabil, wenn sie bei 2-8°C und vor direktem Licht geschützt aufbewahrt werden.

## Zusätzlich benötigte Materialien, nicht im Kit enthalten:

Pipetten (ml und µl). Kolben. Verdünnungsröhrchen. Destilliertes Wasser. Gerät zum manuellen oder automatischen Spülen der Reaktionsfelder auf den Objektträgern. Zentrifuge. Vortex-Mixer. Zeitschaltuhr. Methanol. PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung). Filter (am besten = 50µm oder 100µm). Epoxid-beschichtete Objektträger aus Glas (75 mm x 25 mm) mit 8 Unterteilungen und 5 mm Durchmesser oder Gleichwertiges. Deckglas (60 mm x 24 mm). Fluoreszenz-Eindeckmedium, das Ausbleichen verhindert. Immersionsöl. Fluoreszenzmikroskop (x1000).

## Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:

Alle Reagenzien im Kit sind gebrauchsfertig.

## Probenvorbereitung und -Lagerung:

Auf menschlichen Stuhl anwenden. Frische und unbehandelte Proben können 48 Stunden lang bei 2-8°C gelagert werden, ansonsten bei -20°C oder darunter lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden. Mit 10 % Formaldehyd behandelte Proben können 2 Monate bei Raumtemperatur gelagert werden.

## Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

Toxische Verbindungen werden in folgender Konzentration gefunden:

Komponente	Referenz	Natriumazid (N <sub>3</sub> N <sub>3</sub> )	Merthiolat	Evans Blue
Monoklonale Antikörper	8100-01 und -02	0,02 %	0,02 %	/
Fluoreszierendes Konjugat	8100-03	0,01 %	0,002 %	0,0002 %

Bei den verwendeten Konzentrationen haben Natriumazid und Merthiolat bei Kontakt mit Haut und Schleimhäuten kein toxikologisches Risiko.

- Die monoklonalen Antikörper (8100-01 und -02) stammen von einer Maus.
- Das Konjugat wurde aus Antikörpern einer Ziege hergestellt.
- Alle Reagenzien und Proben sind als potenziell infektiöses Material zu behandeln.
- Reagenzien verschiedener Chargen nicht vertauschen.
- Reagenzien anderer Hersteller nicht mit Reagenzien dieses Kits verwenden.
- Reagenzien nicht nach deren Verfallsdatum verwenden.
- Schließen Sie die Reagenzfläschchen unmittelbar nach Gebrauch fest zu und tauschen Sie die Schraubverschlüsse nicht aus, um eine Kontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie gesonderte und saubere Pipettenspitzen für jede Probe.
- Objektträger und Deckgläser nicht wiederverwenden.
- Die Beschreibungen der auf den Etiketten verwendeten Symbole finden Sie auf der Website [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

## Entsorgung:

Alle für diesen Test verwendeten Materialien gelten allgemein als gefährlicher Abfall. Beachten Sie die nationalen und regionalen Gesetze und Vorschriften für die Entsorgung gefährlicher Abfälle.

## Durchführung:

- Filtrieren Sie die Probe mit einem 50 µm (bevorzugt) oder 100 µm Filter.
- Zentrifugieren Sie 15 Minuten lang bei 700g, scheiden Sie den Überstand ab und lösen Sie den Niederschlag erneut mit PBS (dreimalige Verdünnung) auf.
- Übertragen Sie 2 µl der zu testenden Stuhlsuspension auf einen Objektträger mit Reaktionsfeldern und lassen Sie die Probe für 1 Stunde trocknen. Rechnen Sie mit 2 Reaktionsfeldern für jede Probe: 1 für jeden monoklonalen Antikörper.
- Fixieren Sie die Probe mit Methanol und lassen Sie sie 5 Minuten lang trocknen.
- Fügen Sie 20 µl von jeder der beiden Antikörperlösungen in die Reaktionsfelder und inkubieren Sie den Objektträger für 30 min, bei Raumtemperatur, in einer feuchten Kammer.
- Waschen Sie die Probe im Anschluss an die Inkubation drei Mal mit einem Tropfen PBS. Saugen Sie überschüssiges PBS am Rand des Reaktionsfeldes vorsichtig ab.
- Fügen Sie jedem Reaktionsfeld 20 µl des (einsatzbereiten) anti-Maus-IgG-Konjugates hinzu und inkubieren Sie die Proben für 30 min im Dunkeln in einer feuchten Kammer.
- Saugen Sie das Konjugat vorsichtig ab und waschen Sie die Probe erneut mit einem Tropfen PBS, wie oben beschrieben. Tauchen Sie danach den Objektträger drei Mal in frische PBS.
- Entfernen Sie den PBS-Puffer vorsichtig vom Objektträger ohne dabei die Reaktionsfelder (Probe oder Antigen) zu berühren.
- Betten Sie die Reaktionsfelder in 2 Tropfen Einbettungsmedium (nicht im Kit enthalten) ein und decken Sie diese blasenfrei mit einem Deckglas (24x60 mm) ab.
- Die mikroskopische Auswertung wird mit einem Immunfluoreszenzmikroskop vorgenommen:

Dieses sollte mit einem Filter für Fluoreszein (488 nm) und einem Immersionsobjektiv (x1000) ausgestattet sein.

Hinweis: Bestückte Objektträger können zur langfristigen Lagerung (mögliches erneutes Auslesen) und für eine sichere Handhabung mit Lack versiegelt werden.

## Ergebnis-Auswertung:

Um die Spezifität der Markierung zu beurteilen, setzen Sie gleichzeitig mit der Analyse Ihrer Stuhlproben eine positive und eine negative Kontrolle (nicht inbegriffen) an. Die monoklonalen Antikörper reagieren ausschließlich mit der Sporenhülle von Mikrosporidien. Die Sporen von *E. bienewsi* (1,3x0,7µm) und *E. intestinalis* (1,7x1,0-1,1µm) zeigen eine Fluoreszenzmarkierung über die gesamte Oberfläche, akzentuiert in der Peripherie.

Qualitätskontrollen gängiger Chargen werden auf unserer Website [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch) als Bilder positiver Proben veröffentlicht.

Bei positiven oder unklaren Ergebnissen empfehlen wir die Durchführung eines DNA-Nachweistests mittels PCR, sofern ein solcher Test verfügbar oder aufgrund nationaler Vorschriften erforderlich ist.

## Analytische Leistungen:

### Analytische Spezifität:

Von den 67 positiven Proben, die mit dem Testkit auf *E. bienewsi* untersucht wurden, wies keine einen positiven Befund für *E. intestinalis* auf. Von den 6 positiven Proben, die mit dem Testkit auf *E. intestinalis* untersucht wurden, wies keine einen positiven Befund für *E. bienewsi* auf. Eine Fluoreszenz konnte bisweilen bei nicht identifizierten "verketteten" Bakterien mit dem anti-*E. intestinalis* monoklonalem Antikörper beobachtet werden. Jedoch ermöglichten die Größe und Form der Mikrosporidien-Sporen eine Unterscheidung dieser Bakterien. Es sind keine Interferenzen für Stuhlproben bekannt.

### Erläuterung:

Die Reproduzierbarkeit wurde bewertet, indem 2 menschliche Proben mit Sporen jeder Art, die in 8 Vertiefungen eines Objektträgers verteilt waren, in einem einzigen Verfahren getestet wurden. Die Reproduzierbarkeit wurde bewertet, indem die 2 Proben mit 3 verschiedenen Verfahren getestet wurden. In allen Fällen stimmten die erzielten Ergebnisse mit den erwarteten Ergebnissen überein.

Die folgenden Leistungen können nicht bewertet werden, da dieser Test qualitativ ist: Analytische Empfindlichkeit (Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen), Genauigkeit, Richtigkeit, Messbereich, Linearität, Erwartete Werte in normalen und betroffenen Populationen.

## Klinische Leistungen:

### Diagnostische Sensitivität und Spezifität:

Von den 72 Proben, die mittels dem PCR- und/oder dem Microsporidien IFAT-Verfahren positiv auf *E. bienewsi* getestet wurden, sind 52 mit beiden Verfahren positiv, 3 nur mit PCR und 15 nur mit IFAT. Die Kontrolluntersuchung mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) zeigt, dass diese 15 Proben positiv für *E. bienewsi* sind, was darauf hindeutet, dass das IFAT-Verfahren eine höhere Sensitivität aufweist als PCR. Von 12 positiven Proben für *E. intestinalis* durch das PCR- und/oder Microsporidien IFAT-Verfahren sind 6 bei beiden Methoden positiv und 6 nur bei PCR. Eine TEM-Kontrolle zeigt, dass diese 6 Proben positiv für *E. bienewsi* sind, was darauf hindeutet, dass das IFAT-Verfahren spezifischer ist als PCR, insbesondere da diese 6 Proben mittels des IFAT-Verfahrens positiv für *E. bienewsi* nachgewiesen wurden.

In einer prospektiven Studie an 1.237 Stuhlproben wurden 11 Proben durch das IFAT- und PCR-Verfahren positiv auf Mikrosporidien getestet. 7 Proben wurden mittels der Trichrom-Färbung und 98 mittels Uvitex 2B als zweifelhaft eingestuft. Keine wurde durch das PCR- und IFAT-Verfahren als positiv befunden.

### Zwischenfälle:

Alle schwerwiegenden Zwischenfälle im Zusammenhang mit dem Produkt sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist, zu melden.

## Referenzen:

Cisse O.A., Ouattara A., Thellier M., Accoceberry I., Biligui S., Minta D., Doumbo O., Desportes-Livage I., Thera M.A., Danis M. and Datry A. Evaluation of an immunofluorescent-antibody test using monoclonal antibodies directed against *Enterocytozoon bienewsi* and *Encephalitozoon intestinalis* for diagnosis of intestinal microsporidiosis in Bamako. J. Clin. Microbiol., 2002, 40 : 1715-1718.

Raccurt C.P., Fouché B., Agnamey P., Menotti J., Chouaki T., Totet A. and Pape J.W. Short report: presence of *Enterocytozoon bienewsi* associated with intestinal coccidia in patients with chronic diarrhea in HIV center in Haiti. Am. J. Trop. Med. Hyg., 2008, 79 : 579-580.

Ghoshal U., Khanduja S., Pant P. and Ghoshal U.C. Evaluation of Immunofluorescence antibody assay for the detection of *E. bienewsi* and *E. intestinalis*. Parasitol. Res. 2016, 115 : 3709-13.

Kaya F., Inkaya A.C., Aksoy S., Abbasoğlu O., Ertenli A. I., Büyükaşık Y., Akdağlı S. A., Akyön Y. and Ergüven S. Investigation of Intestinal Protozoan Prevalence in Immunocompromised Patients at a University Hospital. Türkiye Parazitoloj Derg. 2021, 45 : 39-44.

Halánová M., Valenčáková A., Jarčuška P., Halán M., Danišová O., Babinská I., Dedinská K. and Čisláková L. Screening of opportunistic *Enterocytozoon bienewsi* and *Encephalitozoon intestinalis* in immunocompromised patients in Slovakia. Cent Eur J Public Health 2019 ; 27 : 330-334

## BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA

Bâtiment Biokema, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.

Tel.: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch)

