

Microsporidia: *Enterocytozoon bienersi* e *Encephalitozoon intestinalis*

Ensaio de imunofluorescência indireta para o diagnóstico específico de microsporidiose intestinal humana

2 x 50 testes para uso em diagnóstico in vitro e para uso laboratorial profissional

Instruções de utilização referentes ao artigo n.º 8100, n.ºCE: H-CH/CA01/IVD/12173



Utilização prevista:

O kit IFAT Bordier Microsporidia destina-se a deteção qualitativa direta de esporos de ambas as espécies nas fezes humanas. Este teste permite assim um diagnóstico com discriminação da espécie.

Contexto:

A microsporidiose é uma infeção oportunista mundial causada por *Microsporidia*, um grupo de fungos parasitas intracelulares obrigatórios. *Enterocytozoon bienersi* e *Encephalitozoon intestinalis* são as duas espécies responsáveis pela doença gastrointestinal em humanos. As infeções causadas pelo *E. intestinalis* são tratadas com albendazol, enquanto a fumagilina se revelou eficaz na erradicação do *E. bienersi*. Assim, a identificação da espécie é importante para determinar o tratamento adequado. Os humanos podem ser infetados através da ingestão de esporos de *Microsporidia*. O esporoplasma infeccioso invade as células hospedeiras, multiplica-se, amadurece e gera esporos. Rasga a membrana da célula hospedeira e os esporos são libertados. Estes esporos maduros que são libertados podem infetar novas células e reiniciar o ciclo. A infeção ocorre em pessoas gravemente imunodeprimidas. O sintoma mais importante é diarreia. O diagnóstico é efetuado com base no exame microscópico dos esporos em amostras de fezes, por ensaio de imunofluorescência ou por deteção de ADN por PCR.

Princípio e apresentação:

O kit contém anticorpos monoclonais e conjugado fluorescente para 2 x 50 ensaios de imunofluorescência em lâmina de microscópio. Os anticorpos monoclonais irão associar-se especificamente a amostras de esporos fixadas às concavidades da lâmina. Os anticorpos que não estiverem fixados serão removidos. A presença de anticorpos específicos dos esporos é detetada com um conjugado IgG antirrato fluorescente. Uma segunda lavagem irá remover o conjugado livre. Depois de colocado na lâmina e coberto com uma lamela, procede-se à leitura com um microscópio de fluorescência.

Material incluído no kit (2 x 50 ensaios):

MAB1	8100-01	Anticorpo monoclonal anti- <i>E. bienersi</i> pronto a utilizar (cápsulas vermelhas)	2 x 0,5 ml
MAB2	8100-02	Anticorpo monoclonal anti- <i>E. intestinalis</i> pronto a utilizar (cápsulas verdes)	2 x 0,5 ml
CONJ	8100-03	Conjugado de IgG antirrato fluorescente (488nm), pronto a utilizar e contendo azul de Evans	1 x 2 ml

Tempo de conservação e armazenamento:

Conserve o kit a uma temperatura compreendida entre 2-8°C (transporte a temperatura ambiente), evite a exposição dos componentes a luz solar direta durante períodos prolongados. A data do termo do período de validade e o número do lote do kit estão impressos no verso da embalagem. Após abertura, todos os reagentes se mantêm estáveis até ao termo do período de validade, se conservados a uma temperatura compreendida entre 2-8°C.

Nota: depois de montadas e seladas, as lâminas mantêm-se estáveis durante 6 meses, se conservadas a uma temperatura compreendida entre 2-8°C e protegidas de luz direta.

Equipamento necessário, mas não incluído no kit:

Pipetas (ml e µl). Frascos. Tubos de diluição. Água destilada. Equipamento manual ou automático para lavar as concavidades das lâminas. Centrifugador. Agitador vórtex. Temporizador. Metanol. PBS (solução-tampão de fosfato). Filtros (ideal = 50 µm ou 100 µm). Lâminas de vidro revestido a epóxi (75 mm x 25 mm) com 8 compartimentos com 5 mm de diâmetro ou equivalente. Lamela de cobertura (60 mm x 24 mm). Meio de montagem que evite a perda de fluorescência. Óleo de imersão. Microscópio de fluorescência (x1000).

Preparação de reagentes antes da sua utilização:

Todos os reagentes do kit estão prontos a ser utilizados.

Recolha e preparação de amostras:

Utilize fezes humanas. As amostras frescas e não tratadas podem ser conservadas durante 48 horas a 2-8°C; por períodos mais longos, conservar, no mínimo a -20°C. Evite congelar e descongelar repetidamente. As amostras tratadas com 10 % de formaldeído podem ser conservadas durante 2 meses à temperatura ambiente.

Advertências e precauções:

Encontram-se componentes tóxicas na seguinte concentração:

Componente	Referência	Azida de sódio (N _a N ₃)	Mertiolato	Azul de Evans
Anticorpos monoclonais	8100-01 e -02	0.02 %	0.02 %	/
Conjugado fluorescente	8100-03	0.01 %	0.002 %	0.0002 %

Nas concentrações utilizadas, a azida de sódio e o mertiolato não comportam qualquer risco toxicológico no contato com a pele e com as membranas mucosas.

- Os anticorpos monoclonais (8100-01 e -02) são de rato.
- O conjugado é feito de anticorpos de cabra.
- Trate todos os reagentes e amostras como material potencialmente infeccioso.
- Não troque reagentes de diferentes lotes.
- Não use reagentes de outros fabricantes com reagentes deste kit.
- Não use reagentes após o termo do respetivo período de validade.
- Feche bem os frascos dos reagentes imediatamente após a utilização e não troque as tampas, para evitar contaminação.
- Use pipetas diferentes e limpas para cada amostra.
- Não reutilize lâminas e lamelas de cobertura.

Considerações sobre eliminação:

Todos os materiais utilizados para este teste são, normalmente, considerados resíduos perigosos. Respeite a legislação nacional e regional relativa à eliminação de resíduos perigosos.

Procedimento:

- Filtrar através de um filtro de 50 µm (de preferência) ou 100 µm.
- Centrifugar a 700 g durante 15 minutos, desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento (diluição 3 vezes) com PBS.
- Colocar 2 µl da suspensão da amostra fecal a ser testada nas lâminas de poços e deixar secar durante uma hora. Contar 2 concavidades por amostra: 1 para cada anticorpo monoclonal.
- Fixar as lâminas com metanol e deixar secar por 5 minutos.
- Adicionar 20 µl dos anticorpos monoclonais nos poços e incubar durante 30 min. à temperatura ambiente num ambiente húmido.
- Lavar 3 vezes com uma gota de PBS, aspirando o PBS do lado dos poços.
- Adicionar 20 µl de conjugado pronto a utilizar a cada poço. Incubar durante 30 min. à temperatura ambiente num ambiente húmido, no escuro.
- Aspirar o conjugado e lavar com uma gota de PBS conforme especificado acima. Mergulhar as lâminas em 3 alterações de PBS.
- Drenar o tampão das lâminas. Secar as lâminas por baixo e em torno das amostras de forma cuidadosa, sem tocar no antígeno.
- Adicionar 2 gotas de meio de montagem de fluorescência antidescoloração (não incluído) e colocar uma lamela (24 x 60 mm) nos poços, evitando a formação de bolhas de ar.

Observar com um microscópio de fluorescência, equipado com o filtro de fluoresceína apropriado e uma objetiva de imersão (x 1000). Nota: as lâminas montadas podem ser seladas com verniz para conservação a longo prazo (eventual releitura) e maior segurança de manipulação.

Interpretação:

Para avaliar a especificidade da rotulagem, uma amostra positiva e uma negativa (não incluída) poderiam ser processadas em paralelo com as amostras de fezes.

Os anticorpos monoclonais reagem exclusivamente com as paredes de esporos de Microsporidia. Os esporos de *E. bienewisi* (1,3 x 0,7 µm) e *E. intestinalis* (1,7 x 1,0 - 1,1 µm) são identificados à superfície com uma fluorescência periférica marcada. Os controlos de qualidade dos lotes atuais estão publicados no nosso sítio Web www.bordier.ch como imagens de amostras positivas.

Sensibilidade e especificidade:

Foi observada uma sensibilidade de quase 100 % e uma especificidade melhor do que a observada em métodos de coloração específicos (Weber e Uvitex 2B).

Interferências:

Não há interferências conhecidas em amostras de fezes.

Precisão:

Este teste qualitativo não permite medir o seu rigor.

Limitações:

Por vezes, com o anticorpo monoclonal do anti-*E. intestinalis* pode ser observada fluorescência com bactérias "encadeadas" não identificadas. Contudo, o tamanho e a forma dos esporos da microsporidia permitem diferenciá-los destas bactérias.

Referências:

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 bienewisi* 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 bienewisi* 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. bienewisi* and *E. intestinalis*. Parasitol. Res. 2016, **115** : 3709-13.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA
Bâtiment Biokema, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

