

Microsporidia IFAT

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.º CE: H-CH/CA01/IVD/12173 - UDI-DI: 07640158218105



Utilização prevista:

O kit Bordier Microsporidia IFAT 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 bieneusi* 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. bieneusi*. 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. bieneusi</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 (NaN 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.
- As descrições dos símbolos utilizados nas etiquetas podem ser encontradas no site www.bordier.ch.

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. bienersi* (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. Em caso de resultado positivo ou duvidoso, recomendamos a realização de um teste de detecção de DNA por PCR, se o mesmo estiver disponível ou se for exigido pelos regulamentos nacionais.

Desempenho analítico:

Especificidade analítica:

Entre 67 amostras positivas com o dispositivo para *E. bienersi*, nenhuma foi considerada positiva para *E. intestinalis*. Entre 6 amostras positivas com o dispositivo para *E. intestinalis*, nenhuma foi considerada positiva para *E. bienersi*.

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.

Não há interferências conhecidas em amostras de fezes.

Precisão:

A repetibilidade foi avaliada através do teste de 2 amostras humanas contendo esporos de cada espécie, separados em 8 poços de uma lâmina num único ensaio. A reprodutibilidade foi avaliada testando as 2 amostras em 3 ensaios diferentes. Em todos os casos, os resultados obtidos foram consistentes com os resultados esperados.

Os seguintes desempenhos não podem ser avaliados porque este teste é qualitativo: sensibilidade analítica (limites de detecção e quantificação), precisão, veracidade, faixa de medição, linearidade, valores esperados em populações normais e afetadas.

Atuações clínicas:

Especificidade e sensibilidade de diagnóstico:

Entre 72 amostras positivas para *E. bienersi* por PCR e/ou Microsporidia IFAT, 52 são positivas com ambas as técnicas, 3 apenas por PCR e 15 apenas por IFAT. O controlo por microscópio eletrónico de transmissão (TEM) mostra que estas 15 amostras são positivas para *E. bienersi*, sugerindo que a IFAT é mais sensível do que a PCR.

Entre as 12 amostras positivas para *E. intestinalis* por PCR e/ou Microsporidia IFAT, 6 são positivas com ambas as técnicas e 6 apenas por PCR. Um controlo por TEM mostra que estas 6 amostras são positivas para *E. bienersi*, sugerindo que a IFAT é mais específica do que a PCR, especialmente porque estas 6 amostras foram detectadas como positivas para *E. bienersi* por IFAT.

Num estudo prospetivo de 1237 amostras de fezes, 11 amostras foram consideradas positivas por Microsporidia IFAT e por PCR. 7 amostras foram consideradas duvidosas no Trichrome e 98 no Uvitex 2B, nenhuma foi considerada positiva por PCR e IFAT.

Incidentes:

Qualquer incidente grave relacionado com o dispositivo deve ser notificado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-Membro em que o utilizador e/ou o paciente se encontra.

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 bienersi* 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 bienersi* 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. bienersi* 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 bienersi* 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.
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

