

Microsporidia IFAT

Test di immunofluorescenza indiretta per la diagnosi specifica della microsporidiosi intestinale umana

2 x 50 test per uso diagnostico in vitro e per uso professionale in laboratorio



Istruzioni per l'uso per l'articolo N° 8100
N° CE: H-CH/CA01/IVD/12173- UDI-DI: 07640158218105



Uso previsto del prodotto:

Il kit Bordier Microsporidia IFAT è destinato al rilevamento qualitativo diretto delle spore di entrambe le specie nelle feci umane. Questo test consente quindi una diagnosi della specie.

Contesto:

La microsporidiosi è un'infezione opportunistica diffusa a livello mondiale causata da *Microsporidia*, un gruppo di funghi parassitari intracellulari obbligati. L'*Enterocytosoon bienewsi* e l'*Encephalitozoon intestinalis* sono le due specie responsabili della malattia gastrointestinale nell'uomo. Le infezioni causate da *E. intestinalis* sono trattate con albendazolo, mentre la fumagillina si è dimostrata efficace per sradicare *E. bienewsi*. Pertanto, l'identificazione delle specie è importante per definire il trattamento appropriato. Gli esseri umani possono essere infettati ingerendo spore di *Microsporidia*. Lo sporoplasma infettivo invade le cellule ospiti, si moltiplica e matura in spore. La membrana della cellula ospite si rompe e rilascia le spore nell'ambiente circostante. Queste spore libere mature possono infettare nuove cellule, continuando così il ciclo. L'infezione si verifica in persone gravemente immunocompromesse. Il sintomo più importante è la diarrea. La diagnosi si basa sull'esame microscopico delle spore nei campioni fecali, su un test di immunofluorescenza o sulla rilevazione del DNA mediante PCR.

Principio del test e presentazione:

Il kit contiene anticorpi monoclonali e il coniugato fluorescente che permette di effettuare 2 x 50 test di immunofluorescenza su vetrini da microscopio. Gli anticorpi monoclonali si legheranno specificamente alle spore dei campioni attaccati ai pozzetti dei vetrini. Gli anticorpi non fissati saranno lavati via. La presenza di anticorpi specifici per le spore viene rilevata con un coniugato IgG anti-topo fluorescente. Una seconda fase di lavaggio rimuoverà il coniugato non legato. Dopo il montaggio tra il vetrino e il coprivetrino, la lettura viene eseguita con un microscopio a fluorescenza.

Materiale contenuto nel kit (2 x 50 test):

MAB1	8100-01	Anticorpo monoclonale anti- <i>E. bienewsi</i> pronto per l'uso (tappi rossi)	2 x 0,5 ml
MAB2	8100-02	Anticorpo monoclonale anti- <i>E. intestinalis</i> pronto per l'uso (tappi verdi)	2 x 0,5 ml
CONJ	8100-03	Coniugato IgG anti-topo fluorescente (488 nm) pronto per l'uso, contenente blu di Evans	1 x 2 ml

Conservazione:

Conservare il kit a una temperatura compresa tra 2-8°C (trasporto a temperatura ambiente), evitando l'esposizione a lungo termine dei componenti alla luce diretta. La data di scadenza e il numero di lotto del kit sono stampati sul retro della scatola. Dopo l'apertura iniziale, tutti i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati a 2-8°C.

Nota: una volta montati e sigillati, i vetrini sono stabili per 6 mesi se conservati a 2-8°C e protetti dalla luce diretta.

Materiale necessario non presente nel kit:

Pipette (ml e µl). Flacons. Tubi di diluizione. Acqua distillata. Attrezzatura manuale o automatica per il risciacquo dei pozzetti dei vetrini. Centrifuga. Miscelatore a vortice. Timer. Metanolo. PBS (soluzione salina tamponata al fosfato). Filtri (misura migliore = 50 µm o 100 µm). Vetrini in vetro rivestito di epossidico (75 mm x 25 mm) con 8 scomparti di 5 mm di diametro o equivalente. Coprivetrino (60 mm x 24 mm). Soluzione di fissaggio contro lo sbiadimento della fluorescenza. Olio a immersione. Microscopio a fluorescenza (x1000).

Preparazione dei reagenti prima dell'uso:

Tutti i reagenti nel kit sono pronti per l'uso.

Raccolta di campioni e preparazione:

Utilizzare feci umane. I campioni freschi e non trattati possono essere conservati per 48 ore a 2-8°C, altrimenti conservare a -20°C o temperatura inferiore. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. I campioni trattati con formaldeide al 10% possono essere conservati per 2 mesi a temperatura ambiente.

Avvertimenti e precauzioni:

I composti tossici si trovano nelle seguenti concentrazioni:

Componente	Riferimento	Azoturo di sodio (NaN ₃)	Mertiolato	Blu di Evans
Anticorpi monoclonali	8100-01 e -02	0,02%	0,02%	/
Coniugato fluorescente	8100-03	0,01%	0,002%	0,0002%

Alle concentrazioni utilizzate, l'azoturo di sodio e il mertiolato non presentano rischi tossicologici al contatto con la pelle e le mucose.

- Gli anticorpi monoclonali (8100-01 e -02) provengono dal topo.
- Il coniugato è realizzato con anticorpi di capra.
- Trattare tutti i reagenti e i campioni come materiale potenzialmente infettivo.
- Non scambiare reagenti di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori con i reagenti di questo kit.
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.
- Chiudere le fiale dei reagenti immediatamente dopo l'uso e non scambiare i tappi a vite per evitare contaminazioni.
- Utilizzare puntali per pipette separati e puliti per ogni campione.
- Non riutilizzare vetrini e coprivetrini.
- Le descrizioni dei simboli utilizzati sulle etichette sono disponibili sul sito web www.bordier.ch.

Considerazioni sullo smaltimento:

Tutti i materiali utilizzati per questo test sono generalmente considerati rifiuti pericolosi. Fare riferimento alle leggi e ai regolamenti nazionali e regionali per lo smaltimento dei rifiuti pericolosi.

Procedura:

- Filtrare attraverso un filtro da 50 µm (opzione migliore) o 100 µm.
- Centrifugare a 700g per 15 minuti, scartare il supernatante e risospendere il pellet (diluizione 3 volte) con PBS.
- Mettere 2 µl di sospensione del campione fecale da testare su vetrini a pozzetto e asciugare per un'ora. Contare 2 pozzetti per campione: 1 per ogni anticorpo monoclonale.
- Fissare i vetrini con metanolo, lasciare asciugare 5 minuti.
- Aggiungere 20 µl di uno degli anticorpi monoclonali nei pozzetti e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente in atmosfera umida.
- Lavare 3 volte con una goccia di PBS, aspirando il PBS sul lato dei pozzetti senza toccare il campione.
- Aggiungere 20 µl di coniugato a ciascun pozzetto. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente in atmosfera umida, al buio.
- Aspirare il coniugato, lavare con una goccia di PBS come sopra specificato. Immergere i vetrini in 3 cambi di PBS.
- Drenare la soluzione tampone dai vetrini. Asciugare i vetrini sotto e attentamente intorno ai campioni, senza toccare il campione.
- Aggiungere 2 gocce di soluzione di fissaggio contro lo sbiadimento della fluorescenza, posizionare un coprivetrino sui pozzetti, evitando la formazione di bolle d'aria.

La lettura viene effettuata con un microscopio a fluorescenza, dotato dell'apposito filtro per fluoresceina (488 nm) e di un obiettivo a immersione (x 1000).

Nota: i vetrini montati possono essere sigillati con vernice per una conservazione a lungo termine (possibile rilettura) e una manipolazione più sicura.

Interpretazione:

Per valutare la specificità dell'etichettatura, un campione positivo e negativo (non incluso) può essere trattato in parallelo con i campioni fecali.

Gli anticorpi monoclonali reagiscono esclusivamente con le pareti delle spore di *Microsporidia*. Le spore di *E. bienersi* (1,3 x 0,7 µm) e le spore di *E. intestinalis* (1,7 x 1,0 - 1,1 µm) sono contrassegnate in superficie da una fluorescenza periferica marcata.

I controlli di qualità degli attuali lotti sono pubblicati sul nostro sito web: vedere www.bordier.ch per immagini di campioni positivi.

In caso di esito positivo o di risultato dubbioso, si consiglia di eseguire un test di rilevamento del DNA mediante PCR a condizione che tale test sia disponibile o richiesto dalle normative nazionali.

Prestazioni analitiche:

Specificità analitica:

Tra i 67 campioni positivi analizzati con il dispositivo per rilevare l'*E. bienersi*, nessuno è risultato positivo all'*E. intestinalis*. Tra i 6 campioni positivi analizzati con il dispositivo per rilevare l'*E. intestinalis*, nessuno è risultato positivo all'*E. bienersi*.

La fluorescenza può essere a volte osservata con batteri "concatenati" non identificati con l'anticorpo monoclonale anti-*E. intestinalis*. Tuttavia, le dimensioni e la forma delle spore di *microsporidia* permettono di differenziarle da questi batteri.

Non sono note interferenze nei campioni fecali.

Precisione:

La ripetibilità è stata valutata testando 2 campioni umani contenenti spore di ciascuna specie separate in 8 pozzetti di un vetrino in un singolo test. La riproducibilità è stata valutata analizzando i 2 campioni in 3 diversi test. In tutti i casi, i risultati ottenuti sono stati coerenti con quelli attesi.

Le seguenti prestazioni non possono essere valutate perché questo test è qualitativo: sensibilità analitica (limiti di rilevazione e quantificazione), precisione, esattezza, campo di misura, linearità, valori attesi nelle popolazioni normali e affette.

Prestazioni cliniche:

Sensibilità e Specificità diagnostica:

Tra i 72 campioni positivi all'*E. bienersi* mediante PCR e/o *Microsporidia* IFAT, 52 sono risultati positivi con entrambe le tecniche, 3 solo con PCR e 15 solo con IFAT. Il controllo al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) mostra che questi 15 campioni sono positivi all'*E. bienersi*, suggerendo che IFAT è più sensibile della PCR.

Tra i 12 campioni positivi all'*E. intestinalis* mediante PCR e/o *Microsporidia* IFAT, 6 sono positivi con entrambe le tecniche e 6 solo con PCR. Un controllo mediante TEM mostra che questi 6 campioni sono positivi all'*E. bienersi*, suggerendo che IFAT è più specifico della PCR, soprattutto perché questi 6 campioni sono risultati positivi all'*E. bienersi* mediante IFAT.

In uno studio prospettico su 1237 campioni di feci, 11 campioni sono risultati positivi all'IFAT e alla PCR per *Microsporidia*. 7 campioni sono risultati dubbi con Trichrome e 98 con Uvitex 2B. Nessuno è risultato positivo alla PCR e all'IFAT.

Incidenti:

È necessario notificare al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utente e/o il paziente qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo.

Bibliografia:

Cisse O.A., Ouattara A., Thellier M., Accoceberry I., Biligui S., Minta D., Doumbo O., Desportes-Livage I., Thera M.A., Danis M. and 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

