

Microsporidia IFAT

Nepriamy imunofluorescenčný test na špecifickú diagnostiku črevnej mikrosporidíózy u človeka

2 x 50 testov na diagnostické použitie in vitro a na profesionálne laboratórne použitie



Návod na použitie pre výrobok č. 8100
č. CE: H-CH/CA01/IVD/12173 - UDI-DI: 07640158218105



Plánované použitie:

Sada Bordier Microsporidia IFAT je určená na priamu kvalitatívnu detekciu obidvoch druhov spór v ľudskej stolici. Tento test tak umožňuje diagnostiku druhov.

Pozadie:

Mikrosporidóza je celosvetová oportúnna infekcia, ktorú spôsobuje *Microsporidia*, skupina obligatórných intracelulárnych parazitických húb. *Enterocytozoon bienersi* a *Encephalitozoon intestinalis* sú dva druhy zodpovedné za gastrointestinálne ochorenia ľudí. Infekcie, ktoré spôsobuje *E. intestinalis*, sú liečené albendazolom, zatiaľ čo fumagilín je účinný pri eradikácii *E. bienersi*. Preto je identifikácia druhu dôležitá pre definovanie vhodnej liečby. Ľudia môžu byť infikovaní požitím spór *Microsporidia*. Infekčná sporoplazma napadne hostiteľské bunky, množí sa a dozrieva do spór. Membrána hostiteľskej bunky je narušená a uvoľňuje spóry do okolia. Tieto voľné vyspelé spóry môžu infikovať nové bunky, a tak pokračovať v cykle. Infekcia sa vyskytuje u imunokompromitovaných osôb. Najdôležitejším príznakom je hnačka. Diagnostika je založená na mikroskopickom vyšetrení spór vo vzorkách stolice, imunofluorescenčnom teste alebo detekcii DNA pomocou PCR.

Princíp a prezentácia:

Sada obsahuje monoklonálne protilátky a fluorescenčný konjugát, ktoré umožňujú 2 x 50 imunofluorescenčných testov na podložných mikroskopických sklíčkach. Monoklonálne protilátky sa budú špecificky viazať na spóry vzoriek pripojené k jamkám podložného sklíčka. Nefixované protilátky sa odplavia. Prítomnosť protilátok špecifických pre spóry sa deteguje fluorescenčným anti-mouse IgG konjugátom. Druhý premývací krok odstráni nenaviazaný konjugát. Po uložení medzi podložným a krycím sklíčkom sa odčítanie uskutočňuje pomocou fluorescenčného mikroskopu.

Materiál obsiahnutý v sade (2 x 50 testov):

MAB1	8100-01	Monoklonálna protilátka proti <i>E. bienersi</i> pripravená na použitie (červené uzávery)	2 x 0.5 ml
MAB2	8100-02	Monoklonálna protilátka proti <i>E. intestinalis</i> pripravená na použitie (zelené uzávery)	2 x 0.5 ml
CONJ	8100-03	Fluorescenčný (488 nm) anti-mouse IgG konjugát s Evansovou modrou pripravený na použitie	1 x 2 ml

Trvanlivosť a uskladnenie:

Sadu uchovávať pri teplote 2 až 8°C (preprava pri teplote okolia), zabráňte dlhodobému vystaveniu komponentov priamemu svetlu. Dátum expirácie a číslo šarže sady sú vytláčené na zadnej strane balenia. Po počiatočnom otvorení sú všetky činidlá stabilné až do dátumu expirácie, pokiaľ sú skladované pri teplote 2-8°C.

Po namontovaní a uzatvorení sklíčok sú pri skladovaní pri teplote 2-8°C stabilné 6 mesiacov a chránené pred priamym svetlom.

Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml a µl). Banky. Zriedňovacie skúmavky. Destilovaná voda. Manuálne alebo automatické zariadenia na oplachovanie jamiek podložného sklíčka. Odstredivka. Vŕivý mixér. Časovač. Metanol. PBS (fosfátom tlmený soľný roztok). Filtre (najlepšie = 50 µm alebo 100 µm). Sklenené podložné sklíčka (75 mm x 25 mm) s 8 priehradkami s priemerom 5 mm potiahnuté epoxidovou živicom alebo ich ekvivalent. Krycie sklíčko (60 mm x 24 mm). Krycie fluorescenčné montovacie médium. Imerzný olej. Fluorescenčný mikroskop (x1000).

Príprava reagentov pred použitím:

Všetky činidlá v súprave sú pripravené na použitie.

Odber a príprava vzoriek:

Použite ľudskú stolicu. Čerstvé a neošetrené vzorky je možné uchovávať 48 hodín pri teplote 2-8°C, inak ich uchovávať pri teplote -20°C alebo nižšej. Vyhnite sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu. Vzorky ošetrené 10 % formaldehydom sa môžu skladovať 2 mesiace pri izbovej teplote.

Upozornenie a prevencia:

Toxické zlúčeniny sa nachádzajú v nasledujúcej koncentrácii:

Zložka	Referencia	Azid sodný (N ₃)	Merthiolát	Evansova modrá
Monoklonálne protilátky	8100-01 a -02	0.02 %	0.02 %	/
Fluorescenčný konjugát	8100-03	0.01 %	0.002 %	0.0002 %

Azid sodný a merthiolát nespôsobujú pri použitých koncentráciách pri styku s kožou a sliznicami žiadne toxikologické riziko.

- Monoklonálne protilátky (8100-01 a -02) sú z myši.
- Konjugát sa pripravuje s protilátkami z kôz.
- Všetky činidlá a vzorky sa považujú za potenciálne infekčné látky.
- Nezamieňajte činidlá rôznych dávok.
- Nepoužívajte činidlá od iných výrobcov s činidlami tejto sady.
- Nepoužívajte činidlá po dátume expirácie.
- Bezprostredne po použití ihneď zatvorte činidlá v liekovkách a nezameňte ich závitové uzávery, aby ste zabránili kontaminácii.
- Na každú vzorku použite samostatné a čisté špičky pipiet.
- Nepoužívajte opakovane podložné a krycie sklíčka.
- Popisy symbolov použitých na etiketách nájdete na webovej stránke www.bordier.ch.

Pokyny pre likvidáciu:

Všetky materiály použité na tento test sa vo všeobecnosti považujú za nebezpečný odpad. Pozrite si národné a regionálne zákony a nariadenia na likvidáciu nebezpečného odpadu.

Postup:

- Filtrujte cez 50 µm (odporúčané) alebo 100 µm filter.
- Odstreďte 15 minút pri 700 g, vylúčte supernatant a resuspendujte peletu (3krát riedenie) pomocou PBS.
- Dajte 2 µl suspenzie vzorky výkalu, ktorá sa má testovať, na podložné sklíčka s jamkami a sušte jednu hodinu. Počítajte s 2 jamkami na vzorku: 1 pre každú monoklonálnu protilátku.
- Fixujte sklíčka metanolom, nechajte ich sušiť 5 minút.
- Pridajte 20 µl jednej z monoklonálnych protilátok do jamiek a inkubujte 30 minút pri izbovej teplote vo vlhkom prostredí.
- 3-krát premyte kvapkou PBS, pričom odsajte PBS na strane jamiek bez toho, aby ste sa dotkli vzorky.
- Do každej jamky pridajte 20 µl konjugátu. Inkubujte 30 minút pri izbovej teplote vo vlhkom a tmavom prostredí.
- Konjugát odsajte a premyte kvapkou PBS, ako je uvedené vyššie. Ponorte sklíčka do 3 vymenených PBS.
- Vypustite tmavý roztok z podložných sklíčok. Vysušte spodok podložných sklíčok a opatrne okolo vzoriek bez toho, aby ste sa dotkli vzorky.
- Pridajte 2 kvapky krycieho fluorescenčného montovacieho média, umiestnite krycie sklíčko na jamky, aby sa zabránilo tvorbe vzduchových bublín.

Odčítanie sa vykonáva fluorescenčným mikroskopom vybaveným príslušným fluorescenčným filtrom (488 nm) a ponorným objektívom (x 1000).

Poznámka: namontované sklíčka môžu byť utesnené lakom kóli dlhodobému uskladneniu (možné opakované odčítanie) a bezpečnejšej manipulácii.

Vyhodnotenie:

Z dôvodu posúdenia špecifickosti označovania by mohla byť pozitívna a negatívna vzorka (nezahrnutá) spracovaná paralelne so vzorkami stolice.

Monoklonálne protilátky reagujú výhradne so stenami spórov Microsporidia. Spóry *E. bienewsi* (1,3 x 0,7 µm) a spóry *E. intestinalis* (1,7 x 1,0 - 1,1 µm) sú povrchovo označené s vyznačenou periférnou fluorescenciou.

Kontroly kvality súčasných šarží sú uverejnené na našej webovej stránke: www.bordier.ch ako obrázky pozitívnych vzoriek.

V prípade pozitívneho alebo pochybného výsledku odporúčame vykonať test detekcie DNA pomocou PCR, ak je takýto test dostupný alebo je vyžadovaný vnútroštatnými predpismi.

Analytické výkony:

Analytická špecifickosť:

Žiadna zo 67 pozitívnych vzoriek na *E. bienewsi*, ktoré boli odobraté pomôckou, nebola označená ako pozitívna na *E. bienewsi*. Žiadna zo 6 pozitívnych vzoriek na *E. intestinalis*, ktoré boli odobraté pomôckou, nebola označená ako pozitívna na *E. bienewsi*.

Fluorescencia môže byť niekedy pozorovaná s neidentifikovanými „retazcovými“ baktériami s monoklonálnou protilátkou proti *E. intestinalis*. Avšak veľkosť a tvar spór microsporidia ich umožňuje odlišiť od týchto baktérií.

Nie je známa žiadna interferencia vo vzorkách stolice.

Preciznosť:

Opakovateľnosť bola hodnotená v jednom rozboře testovaním 2 ľudských vzoriek obsahujúcich spóry každej vzorky, ktoré boli rozdelené do 8 jamiek sklíčka. Opakovateľnosť bola hodnotená testovaním 2 vzoriek v 3 rôznych rozbořoch. Vo všetkých prípadoch boli získané výsledky konzistentné s očakávanými výsledkami.

Tieto výkony nemožno hodnotiť, pretože tento test je kvalitatívny: analytická citlivosť (limity detekcie a kvantifikácie), presnosť, pravdivosť, rozsah merania, linearita, očakávané hodnoty u normálnej a postihnutej populácie.

Klinické výkony:

Diagnostická citlivosť a špecifickosť:

Zo 72 pozitívnych vzoriek na *E. bienewsi*, ktoré boli odobraté prostredníctvom PCR alebo Microsporidia IFAT, bolo označených ako pozitívne 52, ktoré boli odobraté oboma spôsobmi, iba 3 prostredníctvom PCR a iba 15 prostredníctvom IFAT. Kontrola transmisným elektrónovým mikroskopom ukazuje, že týchto 15 vzoriek je pozitívnych na *E. bienewsi*, čo naznačuje, že IFAT je citlivejší ako PCR.

Z 12 pozitívnych vzoriek na *E. intestinalis*, ktoré boli odobraté prostredníctvom PCR alebo Microsporidia IFAT, je pozitívnych 6, ktoré boli odobraté oboma spôsobmi, a iba 6 prostredníctvom PCR. Kontrola TEM ukazuje, že týchto 6 vzoriek je pozitívnych na *E. bienewsi*, čo naznačuje, že IFAT je presnejší ako PCR, najmä keď týchto 6 vzoriek bolo detegovaných prostredníctvom IFAT ako pozitívne.

V prospektívnej štúdii s 1237 vzorkami stolice bolo 11 vzoriek, ktoré boli odobraté prostredníctvom Microsporidia IFAT a PCR, pozitívnych, 7 vzoriek podozrivých pri trichómovom farbení a 98 pri použití Uvitex 2B. Žiadna vzorka nebola označená ako pozitívna pri použití PCR a IFAT.

Incidenty:

Každý vážny incident, ktorý sa vyskytne v súvislosti s pomôckou, sa oznámi výrobcovi a príslušnému orgánu členského štátu, v ktorom má používateľ alebo pacient sídlo.

Referencie:

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

