

Anticorps monoclonaux anti- ***Enterocytozoon bienewsi*** et ***Encephalitozoon intestinalis***.

Instructions d'utilisation pour l'article N° 8100, N° CE : H-CH/CA01/IVD/12173



Utilisations prévues des produits :

Examen coprologique de routine pour le diagnostic spécifique d'espèce des **microsporidies intestinales** par immunofluorescence indirecte sur lame.

Matériel contenu dans le kit (2 x 50 tests) :

MAB1	8100-01	Anticorps monoclonal anti- <i>E. bienewsi</i> prêt à l'usage (bouchons rouges)	2 x 0.5 ml
MAB2	8100-02	Anticorps monoclonal anti- <i>E. intestinalis</i> prêt à l'usage (bouchons verts)	2 x 0.5 ml
CONJ	8100-03	conjugué anti-IgG de souris couplé à l'Alexa Fluor 488, prêt à l'emploi et additionné de bleu d'Evans	1 x 2 ml

Méthode :

- Diluer les selles avec du PBS (Phosphate-buffered Saline) (1 vol de selles + 2 vol de PBS). Filtrer sur tamis de 50 (idéal) ou 100 µm.
- Déposer 2 µl de la suspension fécale à tester sur les puits de lames de verre et laisser sécher à l'air environ une heure.
- Fixer les lames au méthanol puis laisser sécher.
- Déposer 20 µl de l'anticorps monoclonal spécifique sur chaque puits et incuber 30 min à température ambiante en chambre humide.
- Rincer 3 fois avec une goutte de PBS en aspirant la goutte au niveau de la base.
- Déposer 20 µl du conjugué, prêt à l'emploi, par puits. Incuber 30 min à température ambiante en chambre humide et à l'obscurité.
- En semi-obscureté, aspirer le conjugué, rincer avec une goutte de PBS et aspirer à nouveau. Laver les lames séquentiellement dans trois bains de PBS.
- Sécher le dessous des lames puis aspirer sur le bord extérieur du puits, lame inclinée, l'excédent de PBS du dessus sans toucher l'antigène.
- Ajouter 2 gouttes de liquide de montage (anti-fading fluorescence mounting medium (non inclus)) et couvrir avec une lamelle (24 x 60). Vérifier l'absence de bulles.
- La lecture se fait sous objectif à immersion (grossissement x 1000) au microscope à fluorescence muni d'un filtre spécifique de la longueur d'onde de la fluorescéine. A l'abri de la lumière, les préparations sont stables plusieurs jours à + 4 °C.

Interprétation :

Afin de tester la spécificité du marquage, un témoin positif, un témoin négatif ainsi qu'un témoin sans premier anticorps (avec le conjugué seul) peuvent être testés en même temps que les échantillons de selles. Les anticorps monoclonaux réagissent exclusivement avec la paroi des spores. Les spores d' ***E. bienewsi*** (1.3 x 0.7 µm) et d' ***E. intestinalis*** (1.7 x 1.0 - 1.1 µm) marquées présentent une fluorescence sur toute la surface, accentuée à la périphérie.

Une sensibilité proche de 100% et une spécificité supérieure à celles des méthodes de colorations classiques (Weber et Uvitex 2B) ont été observées pour les tests par immunofluorescence indirecte sur lame avec les anticorps monoclonaux.

Références :

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

Hamamci B., Cetinkaya U., Berk V., Kaynar L., Kuk S., Yazar S. Prevalence of *Enterocytozoon bienewsi* and *Encephalitozoon intestinalis* in cancer patients under chemotherapy. Mikrobiyol Bul. 2015, **49** : 105-113.

Cetinkaya U., Hamamci B., Kaynar L., Kuk S., Sahin I., Yazar S. Investigation of the presence of *Enterocytozoon bienewsi* and *Encephalitozoon intestinalis* in bone marrow transplant patients by IFA-MABs method. Mikrobiyol Bul. 2015, **49** : 432-438.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA

Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland. Phone: + 41 21 633 31 67, www.bordier.ch

50905_04 8100 Mix 03.2016



Monoclonal antibodies anti- *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis*

Instructions for use for article N° 8100, N° CE : H-CH/CA01/IVD/12173



Intended use :

Routine stool examination for species specific diagnosis of **intestinal Microsporidia** by indirect immunofluorescent antibody assay (IFA) .

Material contained in the kit (2 x 50 assays) :

MAB1	8100-01	Monoclonal antibody anti- <i>E. bienersi</i> ready to use (red caps)	2 x 0.5 ml
MAB2	8100-02	Monoclonal antibody anti- <i>E. intestinalis</i> ready to use (green caps)	2 x 0.5 ml
CONJ	8100-03	Ready to use Alexa fluor 488 labeled anti-mouse IgG conjugate containing Evans blue	1 x 2 ml

Method :

-Dilute feces with PBS (Phosphate-buffered Saline) (1 volume feces + 2 volumes PBS). Filter through 50 µm (best) or 100 µm filter.

-Put 2 µl of the fecal sample suspension to be tested on well slides and dry for one hour.

-Fix the slides with methanol, let dry.

-Add 20 µl of either of the monoclonal antibodies on the wells and incubate for 30 min at room temperature in a humid atmosphere.

- Wash 3 times with a drop of PBS, aspirating the PBS on the side of the wells.

-Add 20 µl of ready to use conjugate to each well. Incubate for 30 min at room temperature in a humid atmosphere, in the dark.

-Aspirate the conjugate, wash with a drop of PBS as specified above. Dip the slides in 3 changes of PBS.

-Drain the buffer from the slides. Dry the slides underneath and carefully around the samples, without touching the antigen.

-Add 2 drops of anti-fading fluorescence mounting medium (not included), place a coverslip (24 x 60 mm) on the wells, avoiding the formation of air bubbles.

-Observe with a fluorescence microscope, equipped with the appropriate fluoresceine filter and an immersion objective (x 1000).The slides are stable several days at +4 °C in the dark.

Interpretation :

To assess the specificity of the labeling, a positive and a negative sample as well as a sample without primary antibody (with the conjugate alone) could be processed in parallel with the stool samples.

The monoclonal antibodies react exclusively with the spore walls of Microsporidia. *E. bienersi* spores (1.3 x 0.7 µm) and *E. intestinalis* spores (1.7 x 1.0 - 1.1 µm) are surface labeled with a marked peripheral fluorescence.

A sensibility close to 100% and a specificity better than those of specific staining methods (Weber and Uvitex 2B) were observed using the monoclonal antibodies and IFA.

References:

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.

Hamamci B., Cetinkaya U., Berk V., Kaynar L., Kuk S., Yazar S. Prevalence of *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* in cancer patients under chemotherapy. Mikrobiyol Bul. 2015, 49 : 105-113.

Cetinkaya U., Hamamci B., Kaynar L., Kuk S., Sahin I., Yazar S. Investigation of the presence of *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* in bone marrow transplant patients by IFA-MAbs method. Mikrobiyol Bul. 2015, 49 : 432-438.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA

Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland. Phone: + 41 21 633 31 67, www.bordier.ch

50905_04 8100 Mix 03.2016

