

Microsporidies: *Enterocytozoon bienewsi* et *Encephalitozoon intestinalis*

Test d'immunofluorescence indirecte pour le diagnostic spécifique de microsporidiose intestinale humaine

2 x 50 tests pour utilisation diagnostique in vitro par des laboratoires professionnels

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



Utilisations prévues des produits:

Le kit IFI Bordier Microsporidies est destiné à la détection qualitative directe des spores des deux espèces dans les selles humaines. Ce test permet ainsi un diagnostic d'espèce.

Contexte:

La microsporidiose est une infection opportuniste mondiale causée par des Microsporidies, un groupe de champignons parasites intracellulaires obligatoires. *Enterocytozoon bienewsi* et *Encephalitozoon intestinalis* sont les deux espèces responsables des maladies gastro-intestinales chez l'homme. Les infections causées par *E. intestinalis* sont traitées à l'albendazole, tandis que la fumagilline s'est avérée efficace pour éradiquer *E. bienewsi*. Ainsi, l'identification des espèces est importante pour définir le traitement approprié. Les humains peuvent être infectés en ingérant des spores de Microsporidies. Le sporoplasme infectieux envahit les cellules hôtes, se multiplie et mûrit en spores. La membrane de la cellule hôte est perturbée et libère les spores dans l'environnement. Ces spores matures libres peuvent infecter de nouvelles cellules, poursuivant ainsi le cycle. L'infection survient chez les personnes gravement immunodéprimées. Le symptôme le plus important est la diarrhée. Le diagnostic est basé sur l'examen microscopique des spores dans les selles, un test d'immunofluorescence ou la détection de l'ADN par PCR.

Principe et présentation:

La trousse contient les anticorps monoclonaux et le conjugué fluorescent permettant d'effectuer 2 fois 50 tests d'immunofluorescence sur des lames de verre pour microscopie. Les anticorps monoclonaux se lient spécifiquement aux spores des échantillons fixés sur les puits de la lame. Les anticorps non fixés seront éliminés par lavage. La présence d'anticorps spécifiques vis-à-vis des spores est détectée avec un conjugué fluorescent anti-IgG de souris. Une deuxième étape de lavage éliminera le conjugué non lié. Après montage entre lame et lamelle, la lecture est effectuée avec un microscope à fluorescence.

Matériel contenu dans la trousse (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 fluorescent (488nm) anti-IgG de souris, prêt à l'emploi et additionné de bleu d'Evans	1 x 2 ml

Durée de vie et conservation:

Conserver la trousse entre 2 et 8°C (transport à température ambiante), éviter l'exposition prolongée des composants à la lumière directe. La date de péremption et le numéro de lot sont imprimés sur le derrière de la boîte. Après ouverture initiale, tous les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration lorsqu'ils sont conservés entre 2 et 8°C. Remarque : une fois les lames montées et scellées, celles-ci sont stables 6 mois si stockées entre 2 et 8°C à l'abri de la lumière directe.

Equipement nécessaire ne se trouvant pas dans la trousse:

Pipettes (µl et ml). Récipients. Tubes de dilution. Eau distillée. Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits des lames. Centrifugeuse. Vortex. Minuteur. Méthanol. PBS (Phosphate-Buffered Saline). Filtres (idéal = 50 µm ou 100 µm). Lames en verre revêtement époxy (75 mm x 25 mm) de 8 compartiments de 5 mm de diamètre ou équivalent. Lamelles (60 mm x 24 mm). Milieu de montage (anti-fading fluorescence mounting medium). Huile à immersion. Microscope à fluorescence (grossissement x1000).

Préparation des réactifs avant usage:

Tous les réactifs de la trousse sont prêts à l'emploi.

Collecte et préparation des échantillons:

Utiliser des selles humaines. Les échantillons frais et non traités peuvent être conservés pendant 48 heures à 2-8°C, sinon les conserver à -20°C ou moins. Éviter les cycles de congélation/décongélation. Les échantillons traités avec 10% de formaldéhyde peuvent être conservés 2 mois à température ambiante.

Avertissements et précautions d'utilisation:

Les composés toxiques sont trouvés dans les concentrations suivantes:

Composant	Référence	Azide de sodium (NaN ₃)	Merthiolate	Bleu de Evans
Anticorps monoclonaux	8100-01 et -02	0.02 %	0.02 %	/
Conjugué fluorescent	8100-03	0.01 %	0.002 %	0.0002 %

Aux concentrations utilisées, l'azide de sodium et le merthiolate ne présentent aucun risque toxicologique au contact de la peau et des muqueuses.

- Les anticorps monoclonaux (8100-01 et -02) proviennent de souris.

- Le conjugué est fabriqué avec des anticorps provenant de chèvre.
- Traiter tous les réactifs et les échantillons comme des matières potentiellement infectieuses.
- Ne pas intervertir les réactifs de différents lots IFI Bordier.
- Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants avec ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.
- Fermer les flacons de réactif immédiatement après utilisation et ne pas intervertir les bouchons à vis pour éviter toute contamination.
- Utiliser des pointes de pipettes séparées et propres pour chaque échantillon.
- Ne pas réutiliser les lames et lamelles de microscopie.

Informations d'élimination:

Tous les matériaux utilisés pour ce test sont généralement considérés comme des déchets dangereux. Se reporter aux lois et règlements nationaux et régionaux pour l'élimination des déchets dangereux.

Méthode:

- Filtrer sur tamis de 50 (idéal) ou 100 µm.
- Centrifuger à 700g pendant 15 minutes, jeter le surnageant et remettre le culot en suspension (dilution 3 fois) avec du PBS.
- Déposer 2 µl de la suspension fécale à tester sur les puits d'une lame de verre et laisser sécher à l'air pendant une heure. Compter 2 puits par échantillon : 1 pour chaque anticorps monoclonal.
- Fixer les lames au méthanol puis laisser sécher 5 minutes.
- Déposer 20 µl des anticorps monoclonaux spécifiques directement sur les puits des lames et incuber 30 minutes à température ambiante en chambre humide.
- Rincer 3 fois avec une goutte de PBS en aspirant la goutte au niveau de la base sans toucher l'échantillon.
- Déposer 20 µl du conjugué par puits. Incuber 30 minutes à température ambiante en chambre humide et à l'obscurité.
- En semi-obscurité, aspirer le conjugué, rincer avec une goutte de PBS et aspirer à nouveau. Rincer 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'échantillon.
- Ajouter 2 gouttes de liquide de montage et couvrir avec une lamelle. 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 (488 nm).

Remarque : le montage peut être scellé avec du vernis pour un stockage à long terme (relecture éventuelle) et une manipulation plus sûre.

Interprétation:

Afin de tester la spécificité du marquage, un témoin positif et un témoin négatif (non fournis) peuvent être testés en même temps que les échantillons. 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.

Les contrôles de qualité des lots actuels sont publiés sur notre site internet www.bordier.ch sous forme de photographies d'échantillons positifs.

Sensibilité et spécificité du test:

Une sensibilité proche de 100% et une spécificité supérieure à celles des méthodes de coloration classiques (Weber et Uvitex 2B) ont été observées.

Interférences:

Il n'y a pas d'interférences connues dans les échantillons de selles.

Précision:

Ce test qualitatif ne permet pas la mesure de sa précision.

Limitations:

Une fluorescence pourrait être parfois observée avec des bactéries non identifiées d'aspect "en chaînette" avec l'anticorps monoclonal anti-*E. intestinalis*. Cependant, la taille et la forme des spores de microsporidie permettent de les différencier de ces bactéries.

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 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.



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

