

# 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  
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):

<b>MAB1</b>	8100-01	Anticorpo monoclonal anti- <i>E. bieneusi</i> pronto a utilizar (cápsulas vermelhas)	2 x 0,5 ml
<b>MAB2</b>	8100-02	Anticorpo monoclonal anti- <i>E. intestinalis</i> pronto a utilizar (cápsulas verdes)	2 x 0,5 ml
<b>CONJ</b>	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°C e +8°C (transporte validado entre -20°C e +37°C por 21 dias), 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°C e +8°C.

Nota: depois de montadas e seladas, as lâminas mantêm-se estáveis durante 6 meses, se conservadas a uma temperatura compreendida entre +2°C e +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 entre +2°C e +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 (N <sub>3</sub> )	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 (8100-03) 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](http://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 amostras através de um filtro de 50 µm (de preferência) ou 100 µm.
- Centrifugar a amostra filtrada 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 à temperatura ambiente. 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. bienewisi* (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 controles de qualidade dos lotes atuais estão publicados no nosso sítio Web [www.bordier.ch](http://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. bienewisi*, nenhuma foi considerada positiva para *E. intestinalis*. Entre 6 amostras positivas com o dispositivo para *E. intestinalis*, nenhuma foi considerada positiva para *E. bienewisi*.

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.

### Atuações clínicas:

#### Especificidade e sensibilidade de diagnóstico:

Entre 72 amostras positivas para *E. bienewisi* 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. bienewisi*, 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. bienewisi*, sugerindo que a IFAT é mais específica do que a PCR, especialmente porque estas 6 amostras foram detectadas como positivas para *E. bienewisi* 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 bienewisi* 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 bienewisi* 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. bienewisi* 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 Parazitolojisi 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 bienewisi* and *Encephalitozoon intestinalis* in immunocompromised patients in Slovakia. Cent Eur J Public Health 2019 ; 27 : 330-334

Aydemir S., Halidi A.G., Ekici A. and Cengiz Z.T. Investigation of the presence of *Enterocytozoon bienewisi* and *Encephalitozoon intestinalis* in immunosuppressed patients with diarrhea by IFA and real time PCR methods. Indian J Med Microbiol. 2023, 44 : 100362.



**BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.**  
Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.  
+41 21 566 17 18    [cb@bordier.ch](mailto:cb@bordier.ch)    [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch)

