

# NADAL<sup>®</sup> Malaria Pf/Pan Ag 4 Species Test (test cassette)

REF 472030N-25



### 1. Uso previsto

El test NADAL® Malaria Pf/Pan Ag 4 especies es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección y diferenciación simultánea del antígeno *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) y los antígenos *P. vivax*, *P. ovale* o *P. malariae* en muestras de sangre humana. Este test está destinado a su uso como prueba de detección y para servir de ayuda en el diagnóstico de una infección por *Plasmodium*. Sólo para el uso profesional. Las muestras que resulten reactivas con este test deben confirmarse utilizando métodos de prueba alternativos y teniendo en cuenta otros hallazgos clínicos.

### 2. Introducción

La malaria es una enfermedad febril hemolítica transmitida por mosquitos que cada año infecta alrededor de 200 millones de personas y provoca la muerte de más de un millón. Está causada por cuatro especies de *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, y *P. malariae*. Todos estos tipos de *Plasmodium* infectan y destruyen eritrocitos humanos, produciendo escalofríos, fiebre, anemia y esplenomegalia. La especie *P. falciparum* ocasiona problemáticas más severas que otras especies de *Plasmodium*, y es responsable de la mayor parte de las muertes por malaria. Las especies *P. falciparum* y *P. vivax* son los patógenos más comunes, aunque existen considerables variaciones en su distribución geográfica.

Habitualmente, se diagnostica la malaria por el hallazgo de estos organismos con tinciones de Giemsa en gotas de sangre periférica, y se distinguen las diferentes especies de *Plasmodium* por su aparición en eritrocitos infectados<sup>1</sup>. La técnica ofrece un diagnóstico preciso y fiable, pero sólo si la realizan microscopistas capacitados utilizando determinados protocolos<sup>2</sup>, lo que supone un gran obstáculo para las zonas más pobres y remotas del mundo.

El test NADAL® Malaria Pf/Pan Ag 4 especies está diseñado para superar estas limitaciones, ya que utiliza anticuerpos monoclonales y policlonales contra proteína II (pHRP-II), rica en histidina, una proteína específica de *P. falciparum* y contra la Plasmodium Lactato Deshidrogenasa (pLDH), una proteína producida por cuatro especies de la *Plasmodium* y que permite, por lo tanto, la detección y diferenciación simultánea de la infección por *P. falciparum* y/o alguno de los otros tres tipos de *Plasmodium*<sup>3-6</sup>. Este test puede ser utilizado por personal no cualificado y sin un equipo de laboratorio.

### 3. Principio del test

El test NADAL® Malaria Pf/Pan Ag 4 especies es un inmunoensayo cromatográfico rápido de flujo lateral. La tira de test contiene: 1) una almohadilla conjugada de color burdeos que contiene conjugados de oro coloidal con anticuerpos anti-pHRP-II de ratón (conjugado de oro con anti-pHRP-II), conjugados de oro coloidal con anticuerpos pLDH de ratón (conjugado de oro con anti-pLDH) y conjugados de oro coloidal con anticuerpos IgY de gallina; 2) una tira de membrana de nitrocelulosa con dos líneas de test separadas (Pf y Pan) y una línea de control (C). La línea de test "Pan" está revestida por anticuerpos monoclonales anti-pLDH, de tal modo que puede detectar una infección con cualquiera de los cuatro tipos de *Plasmodium*. La línea de test "Pf" está revestida por anticuerpos policlonales anti-pHRP II, para

detectar una infección por *P. falciparum*. La línea de control (C) está revestida con anticuerpos IgY anti-gallina de cabra.

Durante la realización del test se añade, por un lado, una cantidad suficiente de muestra al pocillo para la muestra (S) del casete de test y, por otro lado, se añade el tampón de lisis al pocillo de búfer (B). El tampón contiene un detergente que diluye las células rojas de la sangre y libera varios antígenos de *Plasmodium*, que migrarán por acción capilar a través de la tira de test.

Si el antígeno pHRP II está presente en la muestra, se unirá entonces al conjugado de oro pHRP II. El inmunocomplejo se enlaza a los anticuerpos anti-pHRP-II que recubren la membrana, de manera que se crea una línea de color en la zona de test (Pf), indicando un resultado positivo para *P. falciparum*.

Si el antígeno pLDH está presente en la muestra, se unirá entonces al conjugado de pLDH con oro. El inmunocomplejo se enlaza a los anticuerpos anti-pLDH que recubren la membrana, de manera que se crea una línea de color burdeos en la zona de test (Pan), indicando un resultado positivo para *Plasmodium*.

La ausencia de la línea de test "Pf" indica un posible resultado positivo para los otros tres tipos de *Plasmodium*. Por otro lado, la ausencia de las líneas de test "Pf" y "Pan", indica un resultado negativo. El test contiene un método de control interno (línea C), que consiste en una línea de color burdeos, formada por el inmunocomplejo IgY de cabra anti-gallina/IgY de gallina y conjugado de oro, que aparece independientemente de la aparición de las líneas de test. Si esta línea de control no aparece, la prueba no será válida, y se deberá repetir el test con un nuevo dispositivo.

### 4. Reactivos y materiales provistos

- 25 casetes de test NADAL® Malaria Pf/Pan Ag 4 especies
- 25 tubos capilares (5 µl)
- 25 toallitas con alcohol
- 25 lancetas
- 1 bote de búfer de lisis (10 mL)
- 1 manual de instrucciones

### 5. Otros materiales necesarios

- Temporizador
- opcional: recipiente para las muestras
- opcional: dispositivo de punción
- NADAL® Malaria Ag kit de control kit (Ref. 472020)

### 6. Almacenamiento y conservación

Todos los reactivos se suministran listos para su uso. Almacene los casetes de test cerrados a temperatura entre 2-30 °C. No los exponga a temperaturas superiores a 40°C ni los congele. Si han estado almacenados a 2-8°C, asegúrese de llevar el kit a temperatura ambiente antes de abrirlo para su uso. El test se mantiene utilizable hasta la fecha de caducidad impresa en el envase sellado.

### 7. Advertencias y precauciones

- Sólo para uso profesional de diagnóstico *in-vitro*.
- Lea atentamente este manual antes de realizar la prueba.
- No use el test después de la fecha de caducidad indicada en el envase.

- No utilice el test si el envase está dañado.
- No reutilice los test.
- No añada la muestra en el área de reacción (área de resultados).
- Para eliminar la contaminación, no toque el área de reacción (área de resultados).
- Evite la contaminación cruzada de las muestras utilizando un nuevo recipiente para cada muestra.
- No sustituya o mezcle componentes de diferentes kits de test.
- No coma, beba ni fume en el área de tratamiento de las muestras o realización de la prueba.
- Utilice ropa y guantes de protección cuando manipule los reactivos y las muestras.
- Trate las muestras como si contuviesen agentes infecciosos. Observe las precauciones establecidas para riesgos microbiológicos durante todo el proceso, y siga las directrices estándar para la eliminación apropiada de las muestras.
- Este test contiene productos de origen animal. El conocimiento certificado del origen y/o estado sanitario de los animales, no garantiza completamente la ausencia de agentes patógenos transmisibles. Por este motivo, se recomienda tratar esos productos como potencialmente infecciosos, y tratarlos según las precauciones de seguridad habituales (e.g., no ingerir ni inhalar).
- Puede utilizar sangre hemolizada con este test.
- Lea los resultados a los 30 minutos de haber añadido la muestra y el búfer de lisis. Una lectura después de más de 30 minutos puede conducir a resultados erróneos.
- No realice la prueba en una habitación con fuertes corrientes de aire, como un ventilador eléctrico o aire acondicionado fuerte.

### 8. Toma de muestras y preparación

Trate todo material de origen humano como si fuera infeccioso y manipúlelo siguiendo los procedimientos estándar de bioseguridad.

Recolecte las muestras de sangre por punción venosa y deposítelas en un recipiente con anticoagulante (EDTA, citrato o heparina). También puede extraer la muestra de sangre por punción dactilar.

Almacene las muestras de sangre completa refrigeradas (2-8°C) si no las va a utilizar inmediatamente o en los próximos 3 días. Para periodos más largos de almacenamiento, congele las muestras a -20°C. Evite ciclos repetidos de congelación y descongelación.

### 9. Procedimiento del test

Lleve las muestras y los componentes del test a temperatura ambiente (15-25°C) antes de realizar la prueba. Después, mezcle bien la muestra, ya que la sangre estará hemolizada tras la descongelación.

1. Cuando tenga todo listo, abra el envase y retire el casete. Colóquelo sobre una superficie plana y limpia. Etiquete el test con el número de identificación de la muestra.
2. Llene el tubo capilar con la muestra de sangre sin sobrepasar la línea. El volumen de la muestra es de aproximadamente 5 µl.

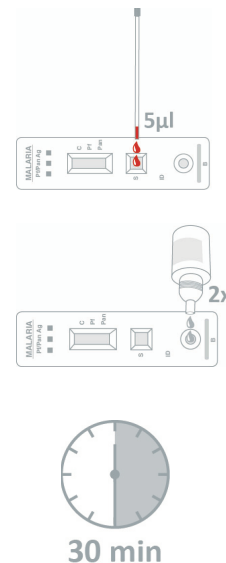
**Nota:** si no está familiarizado con el uso del tubo capilar, practique un par de veces antes de realizar la prueba. Para mayor precisión, transfiera la muestra con una pipeta que tenga una exactitud de 5 µl.

3. Mantenga el tubo de transferencia en vertical, y deposite la muestra en el centro del pocillo sin que haya burbujas de aire.

4. Inmediatamente después, añada 2 gotas (aprox. 50-100 µl) de tampón de lisis en el pocillo para el búfer (B).

5. Prepare el cronómetro. Puede leer los resultados a los 30 minutos. El fondo puede tardar más de 20 minutos en volverse más claro.

No lea los resultados pasados los 30 minutos. Para evitar la confusión, elimine el dispositivo de test una vez interpretado el resultado.



### 10. Interpretación de resultados

**Positivo para *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale***

Aparecen dos líneas de color: una en la zona de control (C) y otra en la zona de test (Pan). El test muestra la presencia de antígenos de pLDH. El resultado es positivo para *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*.



**Positivo para *P. falciparum***

Aparecen dos líneas de color: una en la zona de control (C) y otra en la zona de test (Pf). El test muestra la presencia de antígenos de pHRP-II. El resultado es positivo para *P. falciparum*.



**Positivo para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale***

Aparecen tres líneas de color: una en la zona de control (C) y una en cada zona de test (Pf y Pan). El test muestra la presencia de antígenos de pLDH y pHRP-II. El resultado es positivo para *P. falciparum* y *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale* (consulte el tercer punto de "Limitaciones").



**Nota:** las muestras con resultado positivo deben confirmarse con métodos alternativos de test y otros hallazgos clínicos, antes de considerar el resultado definitivamente positivo.

**Negativo**

Aparece una línea de color en la zona de control (C) pero no aparece ninguna en la zona de test (Pf y Pan). Esto indica que no se han detectado de antígenos de *Plasmodium*.



### No válido

No aparece la línea en la zona de control. Los resultados de test en los que no aparezca la línea de control en el tiempo de lectura especificado se deben eliminar. Si esto ocurre, revise el procedimiento y repita el test con un nuevo casete. Si el problema continúa, deje de utilizar el kit inmediatamente y contacte con su distribuidor local.



Las causas para que esto ocurra pueden ser un volumen de muestra insuficiente, un procedimiento incorrecto o el uso de test caducados.

### 11. Control de calidad

El test cuenta con un proceso de control interno: en la zona de control (C) aparece una línea coloreada, lo que confirmará un volumen suficiente de muestra, una respuesta adecuada de la membrana y un procedimiento de test adecuado.

Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) recomiendan el uso de materiales de control para asegurar el buen funcionamiento del test.

### 12. Limitaciones

- A fin de evitar resultados incorrectos, siga detenidamente las indicaciones de los apartados “Procedimiento de test” e “Interpretación de resultados” durante el análisis de sangre completa para detectar la presencia de antígenos de protozoos de *Plasmodium*. Si no sigue el procedimiento se pueden producir resultados incorrectos.
- El test NADAL® Malaria Pf/Pan Ag 4 especies está indicado para la detección cualitativa de antígenos en sangre. La intensidad de la línea no tiene ninguna correlación con la concentración del antígeno en la muestra.
- En caso de una coinfección con *P. falciparum*, y/o una coinfección con *P. falciparum* y uno de los otros tres *Plasmodium*, aparecerán ambas líneas de test (“Pf” y “Pan”). Por este motivo, en caso de que aparezcan ambas líneas de test, debe interpretar los resultados con cautela.
- Un resultado negativo indica la ausencia detectable del antígeno de *Plasmodium*, pero no excluye la posibilidad de exposición o infección con protozoos *Plasmodium*.
- Puede producirse un resultado negativo indica si la concentración de antígenos de *Plasmodium* detectables en la muestra es inferior al punto de corte del ensayo, o si el antígeno todavía no estaba presente en la etapa en que se tomó la muestra.
- Un estudio reciente ha demostrado que, debido a su diversidad genética, algunas cepas aisladas de *P. falciparum* recogidas en el Amazonas peruano, carecen del gen HRP2. Por eso, un resultado negativo para *P. falciparum* pero positivo para “Pan” no tiene por qué significar infección con *P. falciparum* en este área.
- Algunas muestras con concentraciones inusualmente altas de anticuerpos heterófilos o factor reumatoide, pueden afectar a los resultados.
- Los resultados obtenidos con este test sólo se deben interpretar junto con otros métodos alternativos de diagnóstico y todos los hallazgos clínicos.

### 13. Características de rendimiento

#### Rendimiento clínico

Se recogieron un total de 200 muestras de sangre en un área endémica de malaria, Matiranga, en el distrito Khagrachhari, en Bangladés y se analizaron con el test NADAL® Malaria Pf/Pan Ag 4 especies y con la técnica de gota gruesa (frotis). En la siguiente tabla se presentan los resultados:

	P.f.		Pan	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Frotis	94	106	101	99
Test NADAL® Malaria Pf/Pan Ag 4 Especies	87	113	96	104

Registro de *P. falciparum*: sensibilidad: 92,6%, especificidad: 100%

Registro de Malaria “Pan”: sensibilidad: 95%, especificidad: 100%

Índice kappa: 0,92

#### Reacciones cruzadas

##### Reacciones cruzadas para *P. vivax* y *P. falciparum*:

Se añadieron antígenos recombinantes Pv LDH, P.f. LDH y pHRP II a una muestra de sangre negativa y se analizó con el test NADAL® Malaria Pf/Pan Ag 4 especies. Se observó que el sistema de detección de *P. vivax* con antígenos de *P. falciparum* no provocaba reacción cruzada, y viceversa.

Concentración de antígenos	Reacción de P.f.	Reacción de Pan
1,0 mg/mL pHRP-II	Positivo	Negativo
1,0 mg/mL Pv-LDH	Negativo	Positivo
1,0 mg/mL P.f.-LDH	Negativo	Positivo

##### Reacciones cruzadas con antígenos microbianos

Se añadieron antígenos microbianos habituales a una muestra de sangre negativa y se analizó con un método estándar. Se observó que el test NADAL® Malaria Pf/Pan Ag 4 especies no provoca reacción cruzada con los siguientes antígenos en la concentración analizada:

Antígeno (Ag)	Concentración	Reacción de P.f.	Reacción de Pan
HIV-1 P24 Ag	1,0 mg/mL	Negativo	Negativo
HBsAg	1,0 mg/mL	Negativo	Negativo
Virus Dengue NS1 Ag(I, II, III, IV)	1,0 mg/mL	Negativo	Negativo
Virus Chikungunya Ag	1,0 mg/mL	Negativo	Negativo

**Reacción cruzada con muestras de otras enfermedades infecciosas:**

Muestra	Tamaño de la muestra	Reacción de P.f.	Reacción de Pan
Dengue	10	Negativo	Negativo
HBsAg	10	Negativo	Negativo
Suero VHA	10	Negativo	Negativo
SueroVHC	10	Negativo	Negativo
Suero VIH	10	Negativo	Negativo
Suero sífilis	10	Negativo	Negativo
Suero TB	10	Negativo	Negativo
H. pylori	10	Negativo	Negativo
Suero ANA	8	Negativo	Negativo
HAMA	19	Negativo	Negativo
RF (≤2,500 UI/ml)	10	Negativo	Negativo

**Interferencias:**

Se estudió la interferencia de sustancias habituales (como analgésicos, medicamentos para bajar la fiebre y los componentes sanguíneos) con el funcionamiento del test NADAL® Malaria Pf/Pan Ag 4 añadiendo estas tres sustancias a los tres niveles de control estándar de pLDH y pHRP-II. Los resultados presentados en la siguiente tabla muestran que las sustancias analizadas no afectan al rendimiento de este test.

**Nota: - : negativo; +: positivo débil; +++: positivo fuerte**

Sustancias con interferencia potencial	Reacción de P.f.			Reacción de Pan		
	Negativo	Positivo débil	Positivo fuerte	Negativo	Positivo débil	Positivo fuerte
Control	-	+	+++	-	+	+++
Bilirrubina 20 mg/dL	-	+	+++	-	+	+++
Creatinina 442 µmol/L	-	+	+++	-	+	+++
Glucosa 55 mmol/L	-	+	+++	-	+	+++
Albúmina 60 g/L	-	+	+++	-	+	+++
Ácido salicílico 3,34 mmol/L	-	+	+++	-	+	+++
Heparina 3.000 U/L	-	+	+++	-	+	+++
EDTA 3,4 µmol/L	-	+	+++	-	+	+++
IgG 150 humano mg/dL	-	+	+++	-	+	+++

**14. Referencias**

1. Malaria, p. 421-424. Chapter 9. Infectious and Parasitic Diseases. Rubin E., Farber JL: Pathology, ed. 1994. J.B. Lippincott, Philadelphia.
2. Cooke AH, Chiodini PL, Doherty T, et al, Am J Trop Med. Hyp, 1999, Feb: 60(2):173-2.

3. Guthmann JP, et al: Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002, 96(3):254-7.
4. Kar I, Eapen A, Adak T, Sharma VP, Indian J Malariol. 1998, 35(3):160-2.
5. Mills CD, Burgess DC, Taylor HJ, Kain KC. Bull World Health Organ. 1999;77(7):553-9.
6. Cloonan N, Fischer K, Cheng Q, Saul A. Mol Biochem Parasitol. 113(2):327-30.
7. Gamboa D, Ho M.F., Bendeu J. et al PLOS One, 2010, 5(1), e8091.

Rev. 0, 2015-08-07 MP

Symbol	Español
	Conformidad europea
	Consúltense las instrucciones de uso
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Límites de temperatura
	Código de lote
	No reutilizar
	Fecha de caducidad
	Número de catálogo
	Fabricante
	Suficiente para <n> utilizaciones



nal von minden GmbH  
 Carl-Zeiss-Strasse 12 • 47445 Moers • Germany  
 www.nal-vonminden.com • info@nal-vonminden.com  
 Fon: +49 2841 99820-0 • Fax: +49 2841 99820-1