
CERTEST

Clostridium difficile GDH+ Toxin A+B

ONE STEP

Clostridium difficile antigen GDH,
Toxin A and Toxin B
COMBO CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.



ENGLISH

INTENDED USE

CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B one step combo card test is a coloured chromatographic immunoassay for the simultaneous qualitative detection of *Clostridium difficile* Glutamate Dehydrogenase (GDH), Toxin A and Toxin B in stool samples.

CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B combo card test offers a simple and highly sensitive screening assay to make a presumptive diagnosis of *Clostridium difficile* infection.

INTRODUCTION

Clostridium difficile (*C. difficile*), a Gram-positive spore bearing anaerobic bacterium is the major aetiological agent of diarrhoea and colitis associated with antibiotics. *C. difficile* is the most common cause of health care-associated diarrhoea in developed countries and is a major source of nosocomial morbidity and mortality worldwide.

Disease due to *C. difficile* develops when the organism is allowed to proliferate in the colon, most commonly after antibiotic use has eliminated competing flora. *C. difficile* can release two high-molecular-weight toxins, toxin A and toxin B, which are responsible for the clinical manifestations, which range from mild, self-limited watery diarrhoea to fulminant pseudomembranous colitis, toxic megacolon, and death.

Clostridium difficile Glutamate Dehydrogenase (GDH) is an enzyme produced in large quantities by all toxigenic and non-toxigenic strains, making it an excellent marker for the organism.

The toxigenic culture (TC) is used as the gold standard technique to determine *Clostridium difficile* infection. This method consists in culture and isolation of *C. difficile* from faeces, followed by toxin testing of the isolate, a labour-intensive assay to obtain a result.

TEST PRINCIPLE

CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B is based on the principle of a qualitative immunochromatographic assay for the determination of *Clostridium difficile* Glutamate Dehydrogenase (GDH), Toxin A and Toxin B in stool samples.

Strip A consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against GDH and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-GDH) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming two coloured conjugate complexes.

Strip B consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against Toxin A and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-Toxin A) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming two coloured conjugate complexes.

Strip C consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against Toxin B and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-Toxin B) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming two coloured conjugate complexes.

If the sample is GDH positive, the antigen of the diluted sample reacts with the red-coloured conjugates complex (anti-GDH monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip A, if the sample is Toxin A positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugates complex (anti-Toxin A monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip B and if the sample is Toxin B positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugated complex (anti-Toxin B monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in strip C, which were previously pre-dried on the absorbent pad. The mixture then moves upward on the membrane by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the binding conjugate complexes migrate. The anti-GDH antibodies present on the membrane of strip A (test line), the anti-Toxin A antibodies present on the membrane of strip B (test line) and the anti-Toxin B antibodies present on the membrane of strip C (test line) capture the coloured conjugate and the red lines will be visible in the three strips. These bands are used to interpret the result.

If the sample is negative, there is no GDH, Toxin A and Toxin B presence and yet, the antigens may be present in a concentration lower than the detection limit value, for which the reaction will not take place with any red-coloured conjugate complex. The anti-GDH, the anti-Toxin A and the anti-Toxin B antibodies present on the membranes (test lines) will not capture the antigen-red-coloured conjugate complex (not formed), for which the red lines will not appear.

Whether the sample is positive or not, in the three strips, the mixture continues to move across the membranes to the immobilized specific antibodies placed in the control lines. The anti-specific protein antibodies present on three membranes will capture control green-conjugate complex and three control lines will always appear. The presence of these green lines serve as: 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. The test is stable until the expiration date marked on its sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

PRECAUTIONS

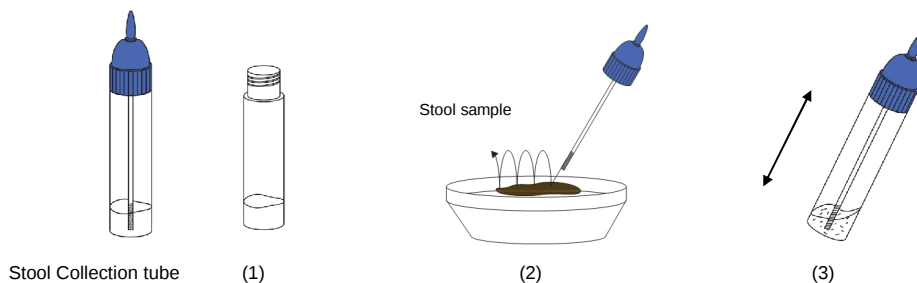
- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Reagents contain preservatives. Avoid any contact with skin or mucous membrane. Consult safety data sheet, available on request.
- Components provide in the kit are approved for use in the CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B combo card test. Do not use any other commercial kit component.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool samples should be collected in clean containers. The samples can be stored in the refrigerator (2-8°C) for 24 hours prior to testing. For longer storage, the specimen must be kept frozen at -20°C. Freezing and thawing cycles are not recommended. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenise stool sample as thoroughly as possible prior to preparation.

Specimen preparation (see illustration):

1. Take out the cap of the stool collection tube (1) and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Then, introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample (2), to collect faecal sample (approx. 125mg) and add it to the stool collection tube. For liquid samples, add approx. 125µL in the stool collection tube using a micropipette.
2. Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (3).



MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B combo card tests
- Instructions for use
- Stool collection tubes with diluent

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

TEST PROCEDURE

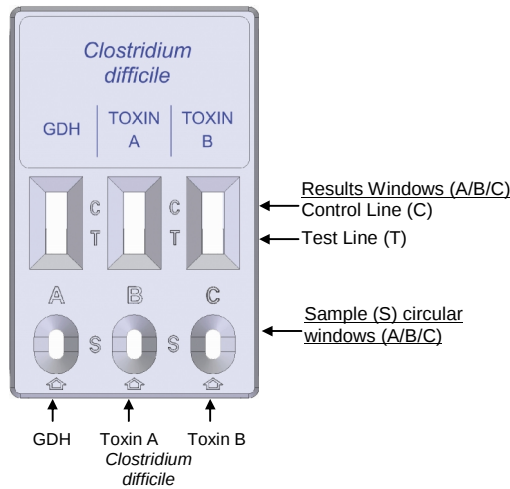
Allow tests, stool samples and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until the performance of the assay.

1. Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion.
2. Remove CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B combo card test from its sealed bag just before using it.
3. Take the stool collection tube, cut the end of the cap (4) and dispense 4 drops in the circular window marked with the letter A (5), 4 drops, using the same tube, in the circular window marked with the letter B (6), and 4 drops, using the same tube, in the circular window marked with the letter C (7). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes.

CERTEST Clostridium difficile GDH+Toxin A+B

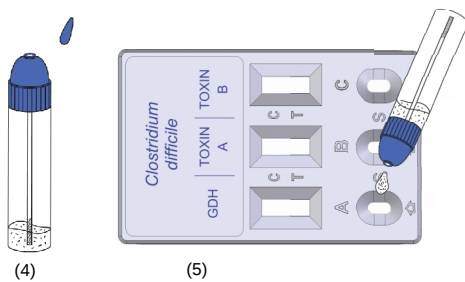
One Step test to detect Clostridium difficile antigen GDH, Toxin A and Toxin B in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno GDH de Clostridium difficile, Toxina A y Toxina B en formato cassette

If the test does not run due to solid particles, stir the sample added in the sample window (S) with the stick. If it doesn't work, dispense a drop of extraction diluent until seeing the liquid running through the reaction zone.



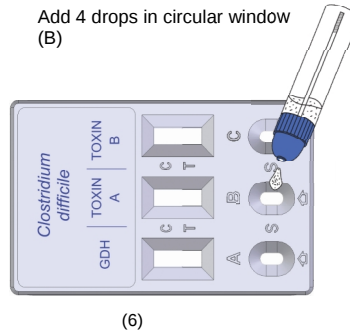
GDH Strip A-procedure

Add 4 drops in circular window (A)



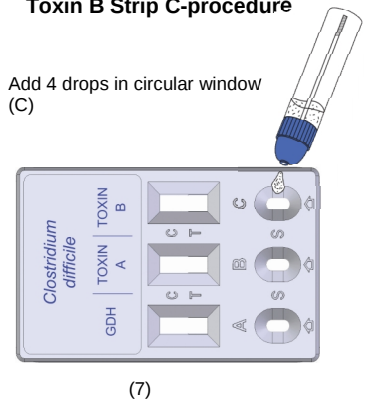
Toxin A Strip B-procedure

Add 4 drops in circular window (B)

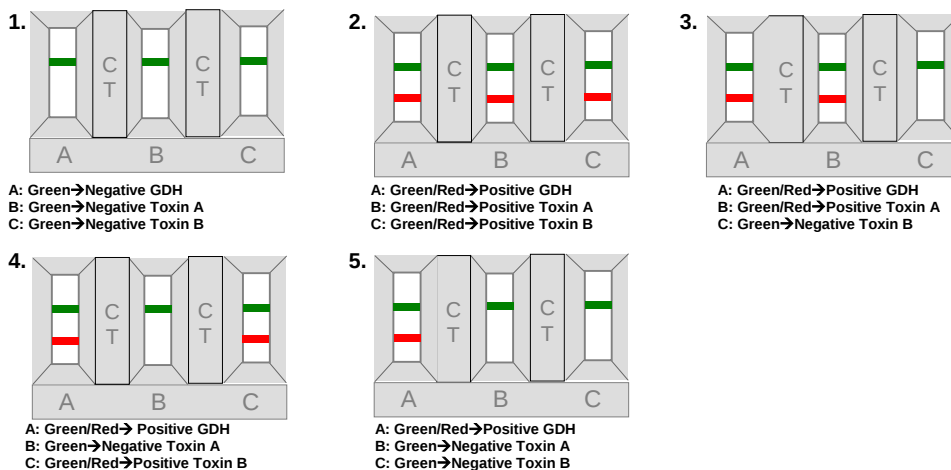


Toxin B Strip C-procedure

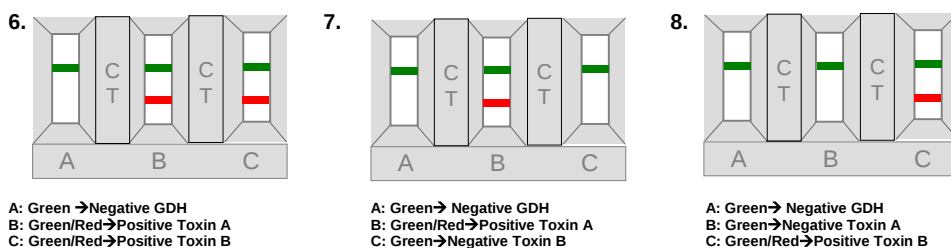
Add 4 drops in circular window (C)



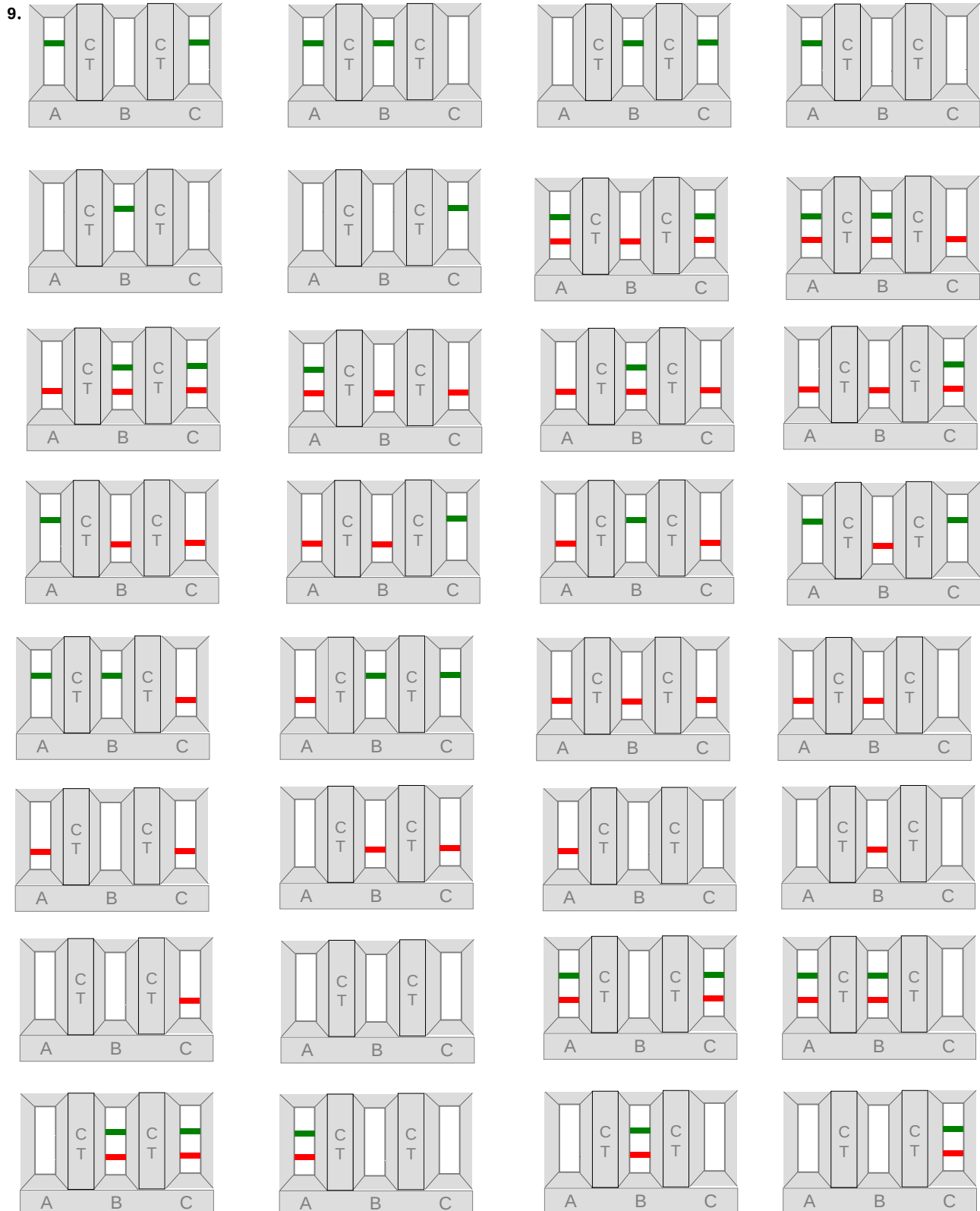
INTERPRETATION OF THE RESULTS (please refer to the illustration below)



OTHER RESULTS



INVALID RESULTS



	A (GDH)	B (Toxin A)	C (Toxin B)	Interpretation of the results
1.	-	-	-	There are no GDH, Toxin A and Toxin B of <i>Clostridium difficile</i> . No infection caused by <i>Clostridium difficile</i> .
	GREEN	GREEN	GREEN	
2.	+	+	+	There are GDH, Toxin A and Toxin B of <i>Clostridium difficile</i> presence. Infection caused by <i>Clostridium difficile</i> .
	GREEN-RED	GREEN-RED	GREEN-RED	
3.	+	+	-	There is GDH and Toxin A presence. Infection caused by <i>Clostridium difficile</i> .
	GREEN-RED	GREEN-RED	GREEN	
4.	+	-	+	There is GDH and Toxin B presence. Infection caused by <i>Clostridium difficile</i> .
	GREEN-RED	GREEN	GREEN-RED	
5.	+	-	-	There is GDH presence. Infection caused by <i>Clostridium difficile</i> .
	GREEN-RED	GREEN	GREEN	
6.	-	+	+	If this result appears it must be repeat the test using a fresh sample. If results are again positive for Toxin A and B and negative for GDH, the sample should be considered positive for Toxin A and B.
	GREEN	GREEN-RED	GREEN-RED	
7.	-	+	-	If this result appears it must be repeat the test using a fresh sample. If the result is again positive for Toxin A and negative for GDH, the sample should be considered positive for Toxin A.
	GREEN	GREEN-RED	GREEN	
8.	-	-	+	If this result appears it must be repeat the test using a fresh sample. If the result is again positive for Toxin B and negative for GDH, the sample should be considered positive for Toxin B.
	GREEN	GREEN	GREEN-RED	
9.	Any other result			Invalid result either A, B or C, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.

6, 7 and 8, a very low percentage of specimens might result negative for GDH but positive for toxins.

INVALID: Total absence of any control coloured line (GREEN) regardless the appearance or not of the test lines (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control lines failure. Review the procedure and repeat the assay with a new test. If the symptoms or situation still persists, discontinue using the test kit and contact your local distributor.

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

The intensity of the red coloured bands in the test lines (T) in the results windows will vary depending on the concentration of antigens present in the specimen. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in antigens can be determined by this qualitative test.

QUALITY CONTROL

Internal procedural controls are included in the test. The green lines appearing in the control lines (C) in the results windows are internal controls, which confirm sufficient specimen volume and correct procedural technique.

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours after opening the sealed bag.
2. An excess of sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the diluent and repeat the test.
3. The intensity of test line may vary from very strong at high antigens concentration to faint when the antigens concentration is close to the detection limit value of the test.
4. CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B should be used only with samples from human faeces. The use of other samples has not been established. The quality of the test depends on the quality of the sample; proper faecal specimens must be obtained.
5. Positive results determine the presence of GDH, Toxin A and Toxin B of *Clostridium difficile* in faecal samples. A positive result should be followed up with additional laboratory techniques (toxigenic culture) to determine the strain. A confirmed infection should only be made by a physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated and must be based in the correlation of the results with further clinical observations.
6. A negative result is not meaningful because of it is possible the antigens concentration in the stool samples is lower than the detection limit value. If the symptoms or situation still persist, a *Clostridium difficile* determination should be carried out on a sample from an enrichment culture.



CERTEST Clostridium difficile GDH+Toxin A+B

One Step test to detect Clostridium difficile antigen GDH, Toxin A and Toxin B in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno GDH de Clostridium difficile, Toxina A y Toxina B en formato cassette

EXPECTED VALUES

Clostridium difficile is associated with 95-100% cases of pseudomembranous colitis, 60-75% cases of antibiotic-associated colitis and 35% of cases of antibiotic-associated diarrhoea cases.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity (detection limit)

Detection limit values of CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B are 0,8ng/mL for GDH, 2ng/mL for Toxin A and 0,63ng/mL for Toxin B.

Clinical sensitivity and specificity (GDH)

An evaluation was performed comparing two immunochromatographic tests to detect *Clostridium difficile* infection (CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B, CerTest vs. *C. DIFF QUIK CHEK Complete*®, Techlab). The samples were directly taken from patients suffering diarrhoea. Positive samples were confirmed with ELISA assay. The results were as follows:

IC test: CerTest <i>Clostridium</i> <i>difficile</i> GDH+Toxin A+B (GDH)	IC test: <i>C. DIFF QUIK CHEK Complete</i> ®			
		+	-	Total
	+	26	0	26
	-	0	48	48
	Total	26	48	74

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest <i>Clostridium difficile</i> GDH+Toxin A+B (GDH) vs <i>C. DIFF QUIK CHEK Complete</i> ®	>99%	>99%	>99%	>99%

Another evaluation was performed using positive and negative samples comparing IC test (CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B, CerTest) to an ELISA assay (Wampole™ *C. Diff Chek*™-60, Techlab). The results were as follows:

IC test: CerTest <i>Clostridium</i> <i>difficile</i> GDH+Toxin A+B (GDH)	EIA test: Wampole™ <i>C. Diff Chek</i> ™-60			
		+	-	Total
	+	39	0	39
	-	2	47	49
	Total	41	47	88

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest <i>Clostridium difficile</i> GDH+Toxin A+B (GDH) vs Wampole™ <i>C. Diff Chek</i> ™-60	>95%	>99%	>99%	96%

Clinical sensitivity and specificity (Toxin A-B)

An evaluation was performed comparing two immunochromatographic tests to detect Toxin A and Toxin B of *Clostridium difficile* infection (CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B, CerTest vs. *C. DIFF QUIK CHEK Complete*®, Techlab). The samples were directly taken from patients suffering diarrhoea. Positive samples were confirmed with ELISA assay. The results were as follows:





CERTEST Clostridium difficile GDH+Toxin A+B

One Step test to detect Clostridium difficile antigen GDH, Toxin A and Toxin B in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno GDH de Clostridium difficile, Toxina A y Toxina B en formato cassette

		IC test: C. DIFF QUIK CHEK Complete®		
IC test: CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B (Toxin A-B)		+	-	Total
	+	6	0	6
	-	0	44	44
	Total	6	44	50

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B (Toxin A-B) vs C. DIFF QUIK CHEK Complete®	>99%	>99%	>99%	>99%

The results showed a high sensitivity and specificity to detect GDH, Toxin A and Toxin B of *Clostridium difficile* using CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B.

Cross reactivity

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B; no cross reactivity against gastrointestinal pathogens occasionally present in faeces:

<i>Campylobacter coli</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>E. coli O157:H7</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella boydii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>



ESPAÑOL**USO PREVISTO**

CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B combo card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de *Clostridium difficile* Glutamato Deshidrogenasa (GDH), de Toxina A y de Toxina B en muestras de heces.

CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B combo card test ofrece un ensayo de cribado sencillo y de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de infección por *Clostridium difficile*.

INTRODUCCIÓN

Clostridium difficile (*C. difficile*), bacteria Gram-positiva, formadora de esporas, anaeróbica, es el principal agente etiológico de la diarrea y la colitis relacionada con uso de antibióticos de origen desconocido. *C. difficile* es la principal causa de diarrea asociada al cuidado de la salud en países desarrollados y es el principal origen de morbilidad y mortalidad de enfermedad nosocomial en todo el mundo.

La enfermedad causada por *C. difficile* se origina cuando se permite que el microorganismo se multiplique en el colon, mayoritariamente a causa de la destrucción de la flora intestinal tras un tratamiento con antibióticos. Tras esta colonización, *C. difficile* puede liberar dos toxinas de alto peso molecular, toxina A y toxina B, siendo ambas las responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, que puede ser desde una diarrea acuosa auto-limitante no grave, una colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico hasta llegar a causar la muerte.

Clostridium difficile Glutamato Deshidrogenasa (GDH) es una enzima producida en grandes cantidades por cepas toxigénicas y no toxigénicas, lo que le hace ser un marcador excelente para determinar la presencia del microorganismo.

El cultivo toxigénico (TC) es la técnica usada de referencia para determinar la infección por *Clostridium difficile*. Este método consiste en cultivo y aislamiento de *C. difficile* a partir de muestra de heces, seguido de identificación de la toxina, lo que requiere un trabajo muy laborioso para obtener un resultado.

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección cualitativa de *Clostridium difficile* Glutamato Deshidrogenasa (GDH), Toxina A y Toxina B en muestras de heces.

Tira A consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a GDH en la línea de test (T), en la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos para la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a GDH) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Tira B consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a Toxina A en la línea de test (T), de la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos para la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a Toxina A) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Tira C consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a Toxina B en la línea de test (T), de la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos para la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a Toxina B) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Si la muestra es GDH positiva, el antígeno de la muestra diluida reacciona con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-GDH-microesferas rojas de látex) en la tira A, si la muestra es Toxina A positiva, los antígenos de la muestra diluida de heces reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-Toxina A-microesferas rojas de látex) en la tira B, y si la muestra es Toxina B positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-Toxina B-microesferas rojas de látex) en la tira C, los cuales fueron secados previamente en el material absorbente. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados. Los anticuerpos anti-GDH presentes en la membrana de la tira A (línea de test), los anticuerpos anti-Toxina A presentes en la membrana de la tira B (línea de test) y los anticuerpos anti-Toxina B presentes en la membrana de la tira C (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá en las tres tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de GDH, ni de Toxina A ni de Toxina B o los antígenos están presentes en una concentración inferior al límite de detección y no se produce reacción con ningún complejo coloreado rojo. Los anticuerpos anti-GDH, anti-Toxina A y anti-Toxina B presentes en las membranas (líneas de test) no capturarán el antígeno-complejo coloreado rojo (no formado) y no aparecerán las líneas rojas.

Independientemente de que la muestra sea positiva o no, en las tres tiras, la mezcla continuará moviéndose a través de las membranas hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en las líneas de control. Estos anticuerpos anti-proteína específica presentes en las tres membranas capturarán el complejo conjugado de control y las líneas de control verdes siempre aparecerán. La aparición de estas líneas se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente, 2) que el flujo ha sido apropiado y 3) como control interno de los reactivos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30°C en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

PRECAUCIONES

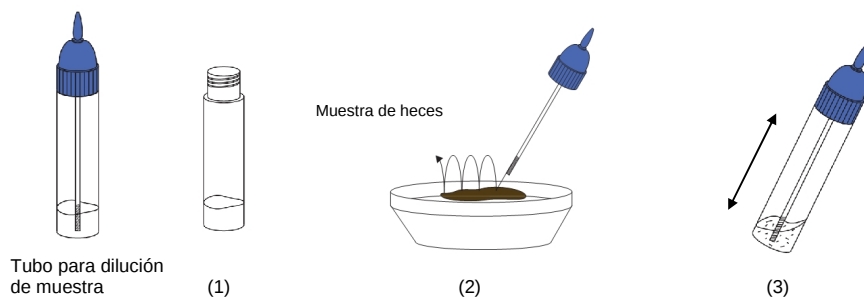
- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Un nuevo test deberá utilizarse para cada muestra para evitar errores de contaminación.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).
- Los reactivos contienen conservantes. Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consultar fichas de seguridad, disponibles bajo petición.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B combo card test. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No comer, ni beber o fumar en la zona de trabajo.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio. Las muestras se deben conservar en frío (2-8°C), durante 24 horas, hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado deben mantenerse congeladas a -20°C. No se recomiendan ciclos de congelación y descongelación. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. No congelar más de una vez. Homogeneizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Preparación de la muestra (ver dibujo):

1. Abrir el tubo para dilución de muestra (1) y con ayuda del palito tomar suficiente cantidad de muestra de las heces recogidas. Para ello se introducirá el palito una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra (2), tomando una cantidad de heces (aprox. 125mg) y posteriormente se introducirá la muestra en el tubo para dilución. Para muestras líquidas, añada aprox. 125µL en el tubo para dilución de muestra utilizando una micropipeta.
2. Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (3).



MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B combo card tests
- Instrucciones de uso
- Tubos para dilución de muestra con diluyente

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

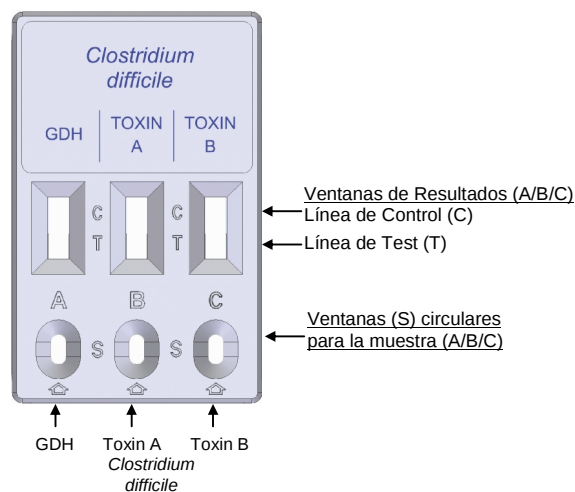
- Recipiente para recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro

PROCEDIMIENTO

Previamente los tests, las muestras de heces y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

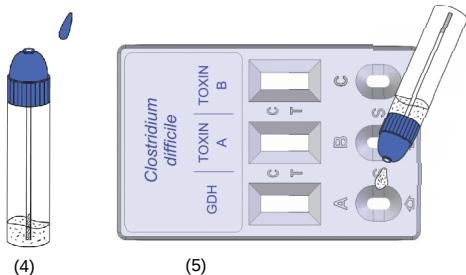
1. Agitar el tubo para dilución de muestra para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el test CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el tubo para dilución de muestra, cortar la punta del tapón (4), añadir 4 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (5), con el mismo tubo, añadir 4 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra B (6) y con el mismo tubo, añadir 4 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra C (7), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. **Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos.

Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas, agitar con el palito la muestra en la ventana (S). Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados.



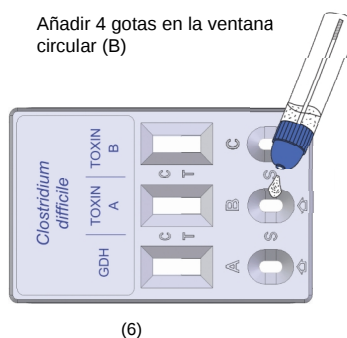
Procedimiento para la tira A de GDH

Añadir 4 gotas en la ventana circular (A)



Procedimiento para la tira B de Toxina A

Añadir 4 gotas en la ventana circular (B)



Procedimiento para la tira C de Toxina B

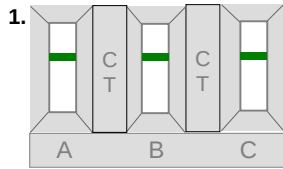
Añadir 4 gotas en la ventana circular (C)



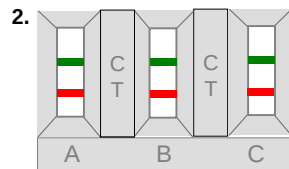
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)

CERTEST Clostridium difficile GDH+Toxin A+B

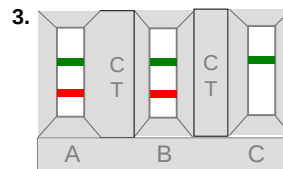
One Step test to detect Clostridium difficile antigen GDH, Toxin A and Toxin B in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno GDH de Clostridium difficile, Toxina A y Toxina B en formato cassette



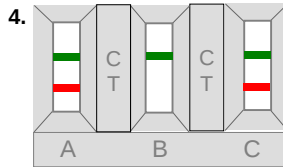
A: Verde→Negativo GDH
B: Verde→Negativo Toxina A
C: Verde→Negativo Toxina B



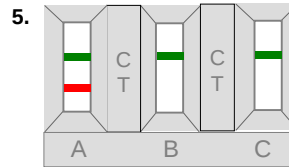
A: Verde/Rojo→Positivo GDH
B: Verde/Rojo→Positivo Toxina A
C: Verde/Rojo→Positivo Toxina B



A: Verde/Rojo→Positivo GDH
B: Verde/Rojo→Positivo Toxina A
C: Verde→Negativo Toxina B

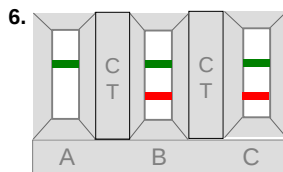


A: Verde/Rojo→Positivo GDH
B: Verde→Negativo Toxina A
C: Verde/Rojo→Positivo Toxina B

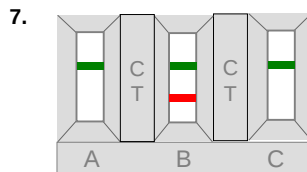


A: Verde/Rojo→Positivo GDH
B: Verde→Negativo Toxina A
C: Verde→Negativo Toxina B

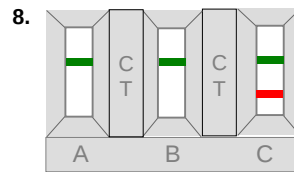
OTROS RESULTADOS



A: Verde→Negativo GDH
B: Verde/Rojo→Positivo Toxina A
C: Verde/Rojo→Positivo Toxina B

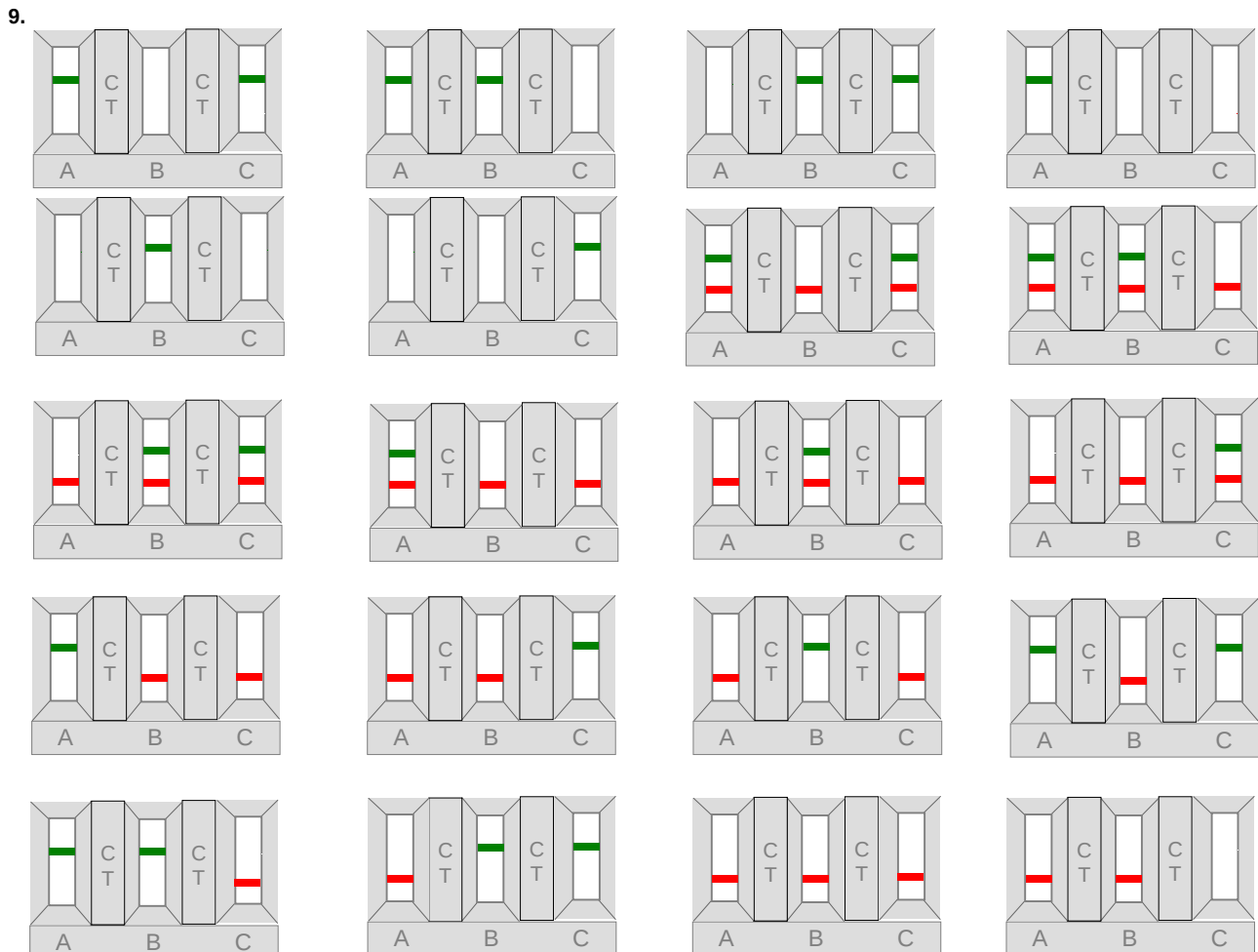


A: Verde→Negativo GDH
B: Verde/Rojo→Positivo Toxina A
C: Verde→Negativo Toxina B



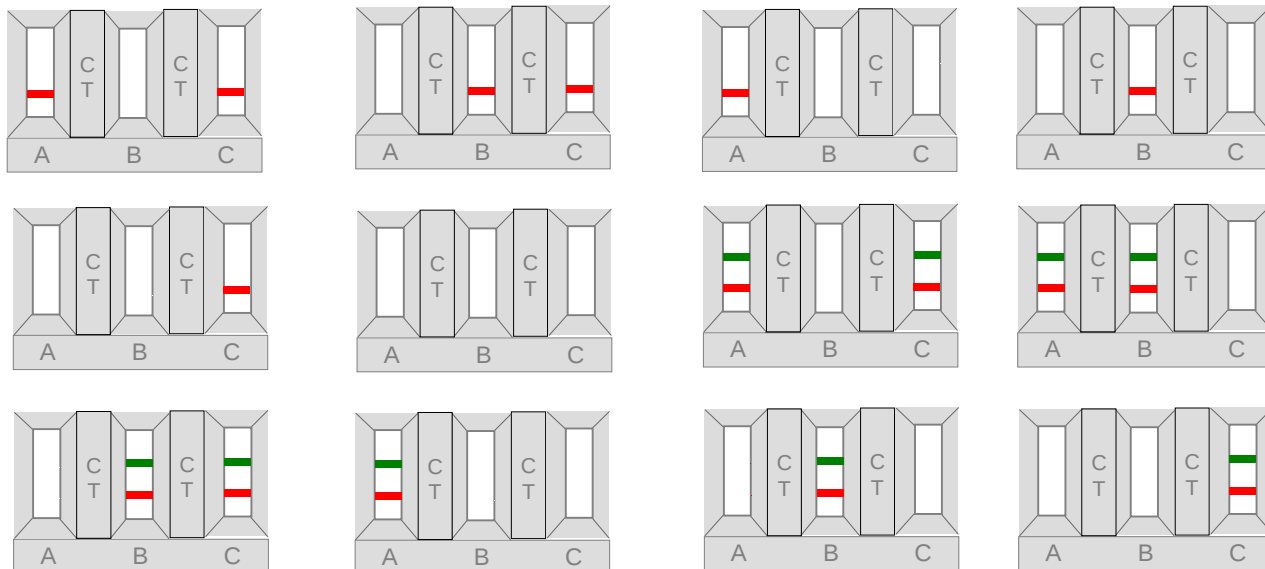
A: Verde→Negativo GDH
B: Verde→Negativo Toxina A
C: Verde/Rojo→Positivo Toxina B

RESULTADOS INVÁLIDOS



CERTEST Clostridium difficile GDH+Toxin A+B

One Step test to detect Clostridium difficile antigen GDH, Toxin A and Toxin B in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno GDH de Clostridium difficile, Toxina A y Toxina B en formato cassette



	A (GDH)	B (Toxina A)	C (Toxina C)	Interpretación de los resultados
1.	- VERDE	- VERDE	- VERDE	No hay presencia de GDH, de Toxina A ni de Toxina B. No hay infección causada por <i>Clostridium difficile</i> .
2.	+ VERDE-ROJO	+ VERDE-ROJO	+ VERDE-ROJO	Hay presencia de GDH, de Toxina A y de Toxina B. Infección por <i>Clostridium difficile</i> .
3.	+ VERDE-ROJO	+ VERDE-ROJO	- VERDE	Hay presencia de GDH y de Toxina A. Infección por <i>Clostridium difficile</i> .
4.	+ VERDE-ROJO	- VERDE	+ VERDE-ROJO	Hay presencia de GDH y de Toxina B. Infección por <i>Clostridium difficile</i> .
5.	+ VERDE-ROJO	- VERDE	- VERDE	Hay presencia de GDH. Infección por <i>Clostridium difficile</i> .
6.	- VERDE	+ VERDE-ROJO	+ VERDE-ROJO	Si aparece este resultado se debe repetir el test utilizando una muestra fresca. Si los resultados son otra vez positivos para Toxina A y B y negativo para GDH, la muestra se debe considerar positiva para Toxina A y B.
7.	- VERDE	+ VERDE-ROJO	- VERDE	Si aparece este resultado se debe repetir el test utilizando una muestra fresca. Si el resultado es otra vez positivo para Toxina A y negativo para GDH, la muestra se debe considerar positiva para Toxina A.
8.	- VERDE	- VERDE	+ VERDE-ROJO	Si aparece este resultado se debe repetir el test utilizando una muestra fresca. Si el resultado es otra vez positivo para Toxina B y negativo para GDH, la muestra se debe considerar positiva para Toxina B.
9.	Cualquier otro resultado			Cualquier resultado inválido en A, en B o en C: se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

6, 7 y 8: existe la posibilidad de que un porcentaje muy bajo de muestras de negativo para GDH y positivo para toxinas.

INVÁLIDO: Cuando alguna línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezcan o no las líneas de test (ROJA). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: un volumen insuficiente de muestra, una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisar el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si los síntomas o la situación persisten, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor.

OBSERVACIONES

La intensidad de las líneas de color rojo en las líneas de test (T) en las ventanas de resultados variará dependiendo de la concentración de antígenos presentes en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de antígenos pueden ser determinados por la misma.



CERTEST *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B

One Step test to detect *Clostridium difficile* antigen GDH, Toxin A and Toxin B in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno GDH de *Clostridium difficile*, Toxina A y Toxina B en formato cassette

CONTROL DE CALIDAD

Los controles internos de funcionamiento vienen incluidos en la prueba. Las líneas verdes que aparecen en las líneas de control (C) en las ventanas de resultados son los controles internos del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

LIMITACIONES

1. Una vez abierto, el test no debe usarse después de 2 horas.
2. Un exceso de muestra de heces puede dar resultados erróneos, dando líneas no muy definidas de color pardo, que no tienen ningún valor diagnóstico. Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
3. La intensidad de la línea del test puede variar desde muy fuerte a alta concentración de antígenos a débil cuando la concentración de antígenos está cerca del valor del límite de detección del test.
4. CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B debería utilizarse sólo con muestras de heces humanas. El uso de otras muestras no ha sido determinado. La calidad del test depende de la calidad de la muestra; por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras fecales.
5. Los resultados positivos determinan la presencia de GDH, Toxina A y Toxina B en muestras. Un resultado positivo debe ser objeto de seguimiento con técnicas de laboratorio adicionales (cultivo toxigénico) para determinar la cepa. La confirmación de una infección sólo debe ser realizada por un médico después de que todos los hallazgos clínicos y de laboratorio hayan sido evaluados y debe basarse en la correlación de los resultados con otras observaciones clínicas.
6. Un resultado negativo no se puede considerar como concluyente, puede darse que la concentración de antígenos en muestras fecales sea inferior al valor del límite de detección. Si los síntomas o la situación persisten, para la determinación de *Clostridium difficile* se debería repetir la prueba con la muestra previamente sometida a enriquecimiento.

VALORES ESPERADOS

Clostridium difficile está asociado con el 95-100% de los casos de colitis pseudomembranosa, con el 60-75% de los casos de colitis asociada a uso de antibióticos y con el 35% de los casos de diarrea asociada a uso de antibióticos.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad analítica (límite de detección)

Los límites de detección de CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B son 0,8ng/mL para GDH, 2ng/mL para Toxina A y 0,63ng/mL para Toxina B.

Sensibilidad y especificidad clínica (GDH)

Se llevó a cabo una evaluación clínica con dos tests inmunocromatográficos (CerTest *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B, CerTest vs. C. DIFF QUIK CHEK Complete®, Techlab) para detectar infección causada por *Clostridium difficile*. Las muestras provenían de pacientes con diarrea. Todas las muestras positivas fueron confirmadas con una prueba ELISA. Los resultados se muestran a continuación:

IC test: CerTest <i>Clostridium difficile</i> GDH+Toxin A+B (GDH)		IC test: C. DIFF QUIK CHEK Complete ®		
		+	-	Total
	+	26	0	26
	-	0	48	48
	Total	26	48	74



CERTEST Clostridium difficile GDH+Toxin A+B

One Step test to detect Clostridium difficile antigen GDH, Toxin A and Toxin B in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno GDH de Clostridium difficile, Toxina A y Toxina B en formato cassette

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B vs C. DIFF QUIK CHEK Complete®	>99%	>99%	>99%	>99%

Otra evaluación se realizó usando muestras positivas y negativas evaluadas por IC test (CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B, CerTest) y comparadas con un ensayo ELISA (WAMPOLE™ C. DIFF CHEK™-60, Techlab). Los resultados se muestran a continuación:

IC test: CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B (GDH)	EIA test: Wampole™ C. Diff Chek™-60			
		+	-	Total
	+	39	0	39
	-	2	47	49
	Total	41	47	88

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B vs Wampole™ C. Diff Chek™-60	>95%	>99%	>99%	96%

Sensibilidad y especificidad clínica (Toxina A-B)

Se llevó a cabo una evaluación clínica con dos tests inmunocromatográficos (CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B, CerTest vs. C. DIFF QUIK CHEK Complete®, Techlab) para detectar infección causada por Clostridium difficile. Las muestras provenían de pacientes con diarrea. Todas las muestras positivas fueron confirmadas con una prueba ELISA. Los resultados se muestran a continuación:

IC test: CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B (Toxina A-B)	IC test: C. DIFF QUIK CHEK Complete®			
		+	-	Total
	+	6	0	6
	-	0	44	44
	Total	6	44	50

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B vs C. DIFF QUIK CHEK Complete®	>99%	>99%	>99%	>99%

Los resultados mostraron que CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B presentan una alta sensibilidad y especificidad para detectar Clostridium difficile antígeno GDH, Toxina A y Toxina B.

Reacciones cruzadas

Se realizó una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas de test CerTest Clostridium difficile GDH+Toxin A+B; no se detectó reacción cruzada con patógenos gastrointestinales ocasionalmente presentes en las heces:

Campylobacter coli	Salmonella enteritidis	Shigella dysenteriae
Campylobacter jejuni	Salmonella paratyphi	Shigella flexneri
E. coli O157:H7	Salmonella typhi	Shigella sonnei
H. pylori	Salmonella typhimurium	Staphylococcus aureus
Listeria monocytogenes	Shigella boydii	Yersinia enterocolitica



CERTEST *Clostridium difficile* GDH+Toxin A+B

One Step test to detect *Clostridium difficile* antigen GDH, Toxin A and Toxin B in combo card format /
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno GDH de *Clostridium difficile*, Toxina A y Toxina B en formato cassette

REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

1. WREN, M.W.D, et al. "Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. An evaluation of tests for faecal toxin, glutamate dehydrogenase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory". British Journal of Biomedical Science, 66 (1), 2009.
2. VAISHNAVI, Ch., "Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases". Indican J. Med. Res. 131, April 2010, pp 487-499.

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS/SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante	 LOT	Batch code Número de lote
 i	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL	Sample diluent Diluyente de muestra	 REF	Catalogue number Número de referencia





CerTest
BIOTEC S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

