
CERTEST

Clostridium difficile Toxin A+B

ONE STEP *Clostridium difficile*
antigen Toxin A and Toxin B
COMBO CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.



ENGLISH**INTENDED USE**

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

CerTest *Clostridium difficile* 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.

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* Toxin A+B is based on the principle of a qualitative immunochromatographic assay for the determination of Toxin A and Toxin B of *Clostridium difficile* 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 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 B 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 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 A, 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 B 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-Toxin A antibodies present on the membrane of strip A (test line) and the anti-Toxin B antibodies present on the membrane of strip B (test line) capture the coloured conjugate and the red line will be visible in both strips. These bands are used to interpret the result.

If the sample is negative, there is no 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-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 both 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 both membranes will capture control green-conjugate complex and both 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

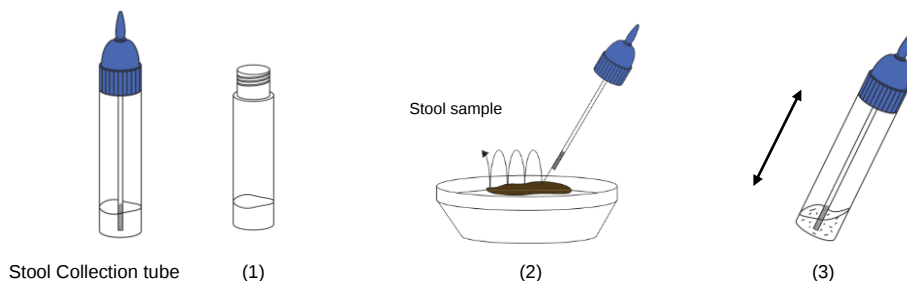
- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded 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 provided in the kit are approved for use in the CerTest *Clostridium difficile* Toxin A+B combo card test. Do not use any other commercial kit component.
- The presence of yellow lines in the results window (control line zone and test line zone), before using the test, is completely normal and does not imply failure of the test functionality.
- 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) making sure that, at each insertion, only the stick's screw is covered with the sample to take the appropriate amount of faecal sample and add it to the stool collection tube. Any additional sample that exceeds the stick's screw could cause wrong results. 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* 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

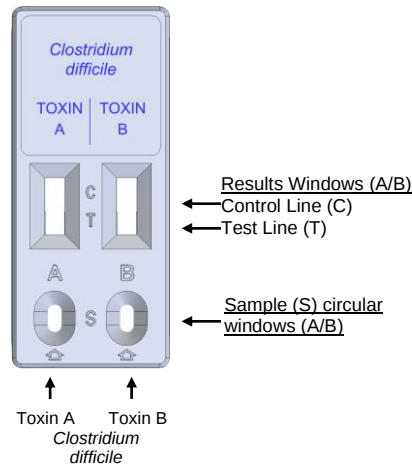
Allow tests, stool samples and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until the performance of the assay.

1. Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion.
2. Remove CerTest *Clostridium difficile* 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 3 drops in the circular window marked with the letter A (5) and 3 drops, using the same tube, in the circular window marked with the letter B (6). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes.

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.

CERTEST *Clostridium difficile* Toxin A+B

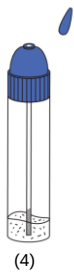
One Step test to detect *Clostridium difficile* antigen Toxin A and Toxin B in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno Toxina A y Toxina B de *Clostridium difficile* en formato cassette



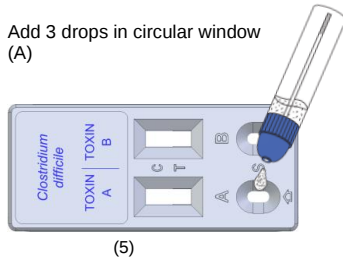
Results Windows (A/B)
Control Line (C)
Test Line (T)

Sample (S) circular windows (A/B)

Toxin A Strip A-procedure

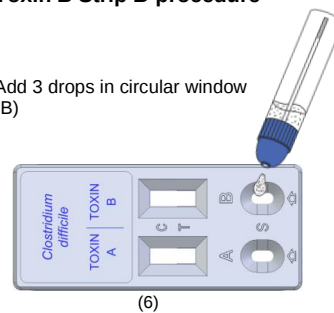


Add 3 drops in circular window (A)



Toxin B Strip B-procedure

Add 3 drops in circular window (B)



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

- A: Green→Negative Toxin A
B: Green→Negative Toxin B
- A: Green/Red→Positive Toxin A
B: Green/Red→Positive Toxin B
- A: Green/Red→Positive Toxin A
B: Green →Negative Toxin B
- A: Green→ Negative Toxin A
B: Green/Red→Positive Toxin B

INVALID RESULTS

-

CERTEST *Clostridium difficile* Toxin A+B

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

	A (Toxin A)	B (Toxin B)	Interpretation of the results
1.	-	-	There are no Toxin A and Toxin B of <i>Clostridium difficile</i> presence. No infection caused by <i>Clostridium difficile</i> .
	GREEN	GREEN	
2.	+	+	There are Toxin A and Toxin B of <i>Clostridium difficile</i> . Infection caused by <i>Clostridium difficile</i> .
	GREEN-RED	GREEN-RED	
3.	+	-	There is Toxin A of <i>Clostridium difficile</i> . Infection caused by <i>Clostridium difficile</i> .
	GREEN-RED	GREEN	
4.	-	+	There is Toxin B of <i>Clostridium difficile</i> . Infection caused by <i>Clostridium difficile</i> .
	GREEN	GREEN-RED	
5.	Any other result	Any other result	Invalid result either A or B, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.

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* 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 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.
7. Bloody stool samples can contain components that may cause non-specific reactions in the test. Every bloody stool sample whose result is positive should be followed up with other techniques of diagnosis to confirm the result.
8. Mucous stool samples may cause non-specific reactions in the test- Every mucous stool sample whose result is positive should be followed up with other techniques of diagnosis to confirm the result.

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* Toxin A+B (Toxin A strip) is: 2-0.25 ng/mL of *Clostridium difficile* Toxin A

Detection limit values of CerTest *Clostridium difficile* Toxin A+B (Toxin B strip) is: 3.12-0.19 ng/mL of *Clostridium difficile* Toxin B.

CERTEST *Clostridium difficile* Toxin A+B

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

Clinical sensitivity and specificity (Toxin A+B)

An evaluation, with faecal samples, was performed comparing the results obtained by an immunochromatographic test (CerTest *Clostridium difficile* Toxin A+B, CerTest) vs the Evaluation Criteria. Evaluation Criteria consisted on the evaluation in parallel of two rapid (CerTest *Clostridium difficile* Toxin A+B) vs other rapid test from the competitor; the discrepant results were confirmed by qPCR technique. The results were as follows:

IC test: CerTest <i>Clostridium difficile</i> Toxin A+B (Toxin A)		Evaluation Criteria (Toxin A)		
		+	-	Total
	+	28	0	28
	-	1	97	98
Total		29	97	126

CerTest <i>Clostridium difficile</i> Toxin A+B (Toxin A) vs Evaluation Criteria		
	Mean Value	95% confidence interval
Sensitivity	96.9%	92.2–99.9%
Specificity	100.0%	96.2–100.0%
PPV	100.0%	87.7–100.0%
NPV	99.0%	94.4–100.0%

IC test: CerTest <i>Clostridium difficile</i> Toxin A+B (Toxin B)		Evaluation Criteria (Toxin B)		
		+	-	Total
	+	36	1	37
	-	0	89	89
Total		36	90	126

CerTest <i>Clostridium difficile</i> Toxin A+B (Toxin B) vs Evaluation Criteria		
	Mean Value	95% confidence interval
Sensitivity	100.0%	90.3–100.0%
Specificity	98.9%	94.0–100.0%
PPV	97.3%	85.8–99.9%
NPV	100.0%	95.9–100.0%

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



CERTEST *Clostridium difficile* Toxin A+B

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

Cross reactivity

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of CerTest *Clostridium difficile* Toxin A+B; no cross reactivity against gastrointestinal pathogens, other organism, substances and/or faecal occasionally present in faeces:

For Strip A: *Clostridium difficile* Toxin A

<i>Adenovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O111	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O26	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Bovine Haemoglobin</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Norovirus GI</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Giardia</i>	<i>Norovirus GII</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Pig Haemoglobin</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH	<i>Human Calprotectin</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
<i>Clostridium difficile</i> Toxin B	<i>Human Haemoglobin</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Human Lactoferrin</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:3
<i>Entamoeba dispar</i>	<i>Human Transferrin</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:9
<i>Entamoeba histolytica</i>			

For Strip B: *Clostridium difficile* Toxin B

<i>Adenovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O111	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O26	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Bovine Haemoglobin</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Pig Haemoglobin</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Giardia</i>	<i>Norovirus GI</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Norovirus GII</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH	<i>Human Calprotectin</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
<i>Clostridium difficile</i> Toxin A	<i>Human Haemoglobin</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Human Lactoferrin</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:3
<i>Entamoeba dispar</i>	<i>Human Transferrin</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:9
<i>Entamoeba histolytica</i>			



ESPAÑOL**USO PREVISTO**

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

CerTest *Clostridium difficile* 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.

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* Toxin A+B es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección cualitativa de Toxina A y Toxina B de *Clostridium difficile* en muestras de heces.

Tira A 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 B 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 Toxina A positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-Toxina A-microesferas rojas de látex) en la tira A, 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 B, 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-Toxina A presentes en la membrana de la tira A (línea de test) y los anticuerpos anti-Toxina B presentes en la membrana de la tira B (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá en ambas tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de Toxina A ni de Toxina B o los antígenos están presentes en una concentración inferior al límite de detección y no se producirá reacción con ningún complejo coloreado rojo. Los anticuerpos 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 ambas 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 ambas 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* Toxin A+B combo card test. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.
- La presencia de líneas amarillentas en la ventana de resultados (zona línea de control y zona línea de test), antes de utilizar el test, es completamente normal y no supone fallo de funcionalidad del test.
- 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.

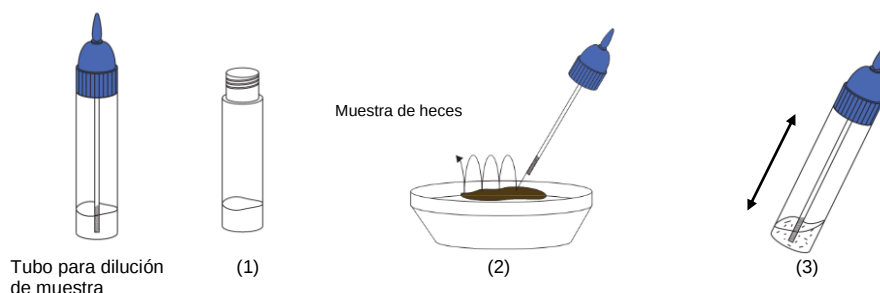
RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Muestras de heces

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), asegurándose de que, en cada inserción, la hélice del palito se cubra con la muestra para tomar la cantidad adecuada de heces y posteriormente se introducirá la muestra en el tubo para dilución de muestra. Si se añade cantidad de muestra adicional que sobrepase la hélice del palito se podrían originar resultados erróneos. Para muestras líquidas, añadir aprox. 125µL en el tubo para dilución 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* 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.

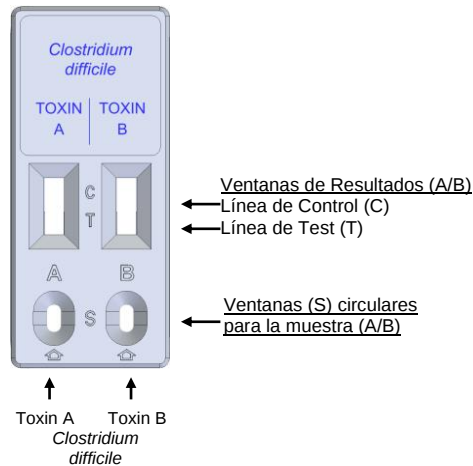
1. Agitar el tubo para dilución de muestra para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el test CerTest *Clostridium difficile* Toxin A+B de su envase antes de utilizarlo.

CERTEST *Clostridium difficile* Toxin A+B

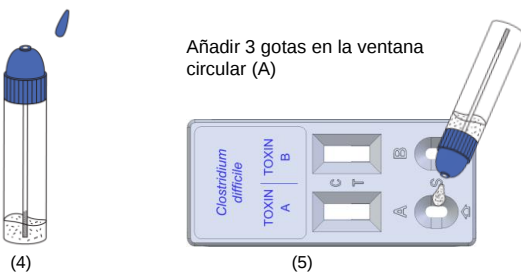
*One Step test to detect Toxin A and Toxin B antigen of Clostridium difficile in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno de Toxina A y Toxina B de Clostridium difficile en formato cassette*

- Tomar el tubo para dilución de muestra, cortar la punta del tapón (4) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (5), y con el mismo tubo, añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra B (6), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
- Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos.

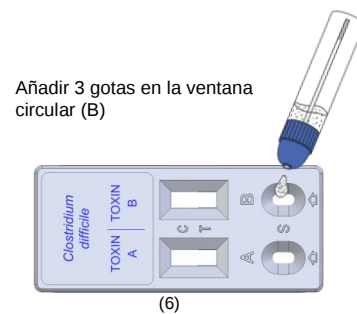
Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas, agitar con el palito la muestra en la ventana (S). Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados.



Procedimiento para la tira A de Toxina A



Procedimiento para la tira B de Toxina B



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

- A: Verde → Negativo Toxina A
B: Verde → Negativo Toxina B
- A: Verde/Rojo → Positivo Toxina A
B: Verde/Rojo → Positivo Toxina B
- A: Verde/Rojo → Positivo Toxina A
B: Verde → Negativo Toxina B
- A: Verde → Negativo Toxina A
B: Verde/Rojo → Positivo Toxina B

RESULTADOS INVÁLIDOS

-

CERTEST *Clostridium difficile* Toxin A+B

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

	A (Toxina A)	B (Toxina B)	Interpretación de los resultados
1.	- VERDE	- VERDE	No hay presencia de Toxina A y/o Toxina B. No hay infección causada por <i>Clostridium difficile</i> .
2.	+ VERDE-ROJO	+ VERDE-ROJO	Hay presencia de Toxina A y Toxina B. Infección por <i>Clostridium difficile</i> .
3.	+ VERDE-ROJO	- VERDE	Hay presencia de Toxina A de <i>Clostridium difficile</i> . Infección por <i>Clostridium difficile</i> .
4.	- VERDE	+ VERDE-ROJO	Hay presencia de Toxina B de <i>Clostridium difficile</i> . Infección por <i>Clostridium difficile</i> .
5.	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado	Cualquier resultado inválido en A o en B: se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

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.

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

- Una vez abierto, el test no debe usarse después de 2 horas.
- 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.
- 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.
- CerTest *Clostridium difficile* 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.
- Los resultados positivos determinan la presencia de Toxina A y de Toxina B en muestras de heces humanas. 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.
- 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.
- Las muestras de heces sanguinolentas contienen componentes que podrían causar reacciones inespecíficas en el test. Toda muestra sanguinolenta cuyo resultado es positivo debe confirmarse con otras técnicas.
- Muestra de heces mucosas podrían provocar reacciones inespecíficas en el test. Toda muestra de heces mucosas cuyo resultado sea positivo debería ser contrastado con otras técnicas diagnósticas para confirmar el resultado.

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)

Límite de detección de CerTest *Clostridium difficile* Toxin A+B (tira Toxin A) es: 2-0.25 ng/mL de *Clostridium difficile* Toxin A

Límite de detección de CerTest *Clostridium difficile* Toxin A+B (tira Toxin B) es: 3.12-0.19 ng/mL de *Clostridium difficile* Toxin B

Sensibilidad y especificidad clínica (Toxina A+B)

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras de heces, comparando los resultados obtenidos con un test inmunocromatográfico (CerTest *Clostridium difficile* Toxin A+B, CerTest) vs el criterio de Evaluación. El criterio de evaluación consistió en la evaluación en paralelo de dos test rápidos (*Clostridium difficile* Toxin A+B, CerTest) vs otro test rápido de la competencia, los resultados discrepantes fueron confirmados mediante la técnica qPCR.

Los resultados se muestran a continuación:

		Criterio evaluación (Toxin A)		
IC test: CerTest <i>Clostridium difficile</i> Toxin A+B (Toxin A)		+	-	Total
	+	28	0	28
	-	1	97	98
	Total	29	97	126

CerTest <i>Clostridium difficile</i> Toxin A+B (Toxin A) vs Criterio evaluación		
	Mean Value	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	96.9%	92.2–99.9%
Especificidad	100.0%	96.2–100.0%
VPP	100.0%	87.7–100.0%
VPN	99.0%	94.4–100.0%

		Criterio evaluación (Toxin B)		
IC test: CerTest <i>Clostridium difficile</i> Toxin A+B (Toxin B)		+	-	Total
	+	36	1	37
	-	0	89	89
	Total	36	90	126

CerTest <i>Clostridium difficile</i> Toxin A+B (Toxin B) vs Criterio evaluación		
	Mean Value	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	100.0%	90.3–100.0%
Especificidad	98.9%	94.0–100.0%
VPP	97.3%	85.8–99.9%
VPN	100.0%	95.9–100.0%

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



CERTEST *Clostridium difficile* Toxin A+B

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

Reacciones cruzadas

Se realizó una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas de test CerTest *Clostridium difficile* Toxin A+B, no se detectó reacción cruzada con patógenos gastrointestinales, otros organismos, sustancias y/o marcadores fecales ocasionalmente presentes en las heces:

Para la tira A: *Clostridium difficile* Toxin A

Adenovirus	<i>Escherichia coli</i> O111	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Shigella boydii</i>
Astrovirus	<i>Escherichia coli</i> O26	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
Calprotectina humana	<i>Escherichia coli</i> O157	Norovirus GI	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Giardia</i>	Norovirus GII	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	Rotavirus	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH	Hemoglobina bovina	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium difficile</i> Toxin B	Hemoglobina de cerdo	<i>Salmonella paratyphi</i> A	Transferrina humana
<i>Clostridium perfringens</i>	Hemoglobina humana	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:3
<i>Entamoeba dispar</i>	Lactoferrina humana	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:9
<i>Entamoeba histolytica</i>			

Para la tira B: *Clostridium difficile* Toxin B

Adenovirus	<i>Escherichia coli</i> O111	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Shigella boydii</i>
Astrovirus	<i>Escherichia coli</i> O26	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
Calprotectina humana	<i>Escherichia coli</i> O157	Norovirus GI	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Giardia</i>	Norovirus GII	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	Rotavirus	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH	Hemoglobina bovina	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Clostridium difficile</i> Toxin A	Hemoglobina de cerdo	<i>Salmonella paratyphi</i> A	Transferrina humana
<i>Clostridium perfringens</i>	Hemoglobina humana	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:3
<i>Entamoeba dispar</i>	Lactoferrina humana	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:9
<i>Entamoeba histolytica</i>			

REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- VAISHNAVI, Ch., "Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases". Indian 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 In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico in vitro	Keep dry Almacenar en lugar seco	Use by Fecha de caducidad	Manufacturer Fabricante	LOT Batch code Número de lote
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
Do not re-use No reutilizar	CE CE marking/ Marcado CE			





CerTest
BIOTEC S.L.

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

