

CerTest Rapid Test

CerTest
BIOTEC

CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH

ONE STEP CLOSTRIDIUM DIFFICILE CARD TEST

CE IVD

The test should be used by professional in IVD devices

These instructions for use apply to the following references:

GD820001V; GD820001VC; GD820001VCC

Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

GD820001V; GD820001VC; GD820001VCC

Initial part of the Instructions for use is common for all the references/

La parte inicial de las instrucciones de uso es común para todas las referencias.

Specific parts for each of the references are described in the corresponding annexes (see tables below)/

Las partes específicas de cada referencia se describen en los correspondientes anexos (ver tablas siguientes).

KIT 20 CARD CLOSTRIDIUM DIFFICILE ANTIGEN GDH (SEE ANNEX 1) /

KIT DE 20 CARCASAS DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE ANTIGEN GDH (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH Card (20 tests kit with stool vials)	GD820001V

Table A 1. Reference for kit 20 card of CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH / Referencia para kit de 20 carcassas de CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH.

KIT 20 CARD CLOSTRIDIUM DIFFICILE ANTIGEN GDH WITH POSITIVE CONTROL (SEE ANNEX 2) /

KIT DE 20 CARCASAS DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE ANTIGEN GDH CON CONTROL POSITIVO (VER ANEXO 2)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH Card (20 tests kit with stool vials + PC)	GD820001VC

Table A 2. Reference for kit 20 card of CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH with positive control / Referencia para kit de 20 carcassas de CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH con control positivo.

KIT 20 CARD CLOSTRIDIUM DIFFICILE ANTIGEN GDH WITH POSITIVE AND NEGATIVE CONTROL (SEE ANNEX 3) /

KIT DE 20 CARCASAS DE CLOSTRIDIUM DIFFICILE ANTIGEN GDH CON CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVO (VER ANEXO 3)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH Card (20 tests kit with stool vials + PC + NC)	GD820001VCC

Table A 3. Reference for Kit 20 card of CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH with positive and negative control / Referencia para kit de 20 carcassas de CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH con controles positivo y negativo.

1. Quick Guide/Guía rápida

Quick Guide

CerTest Clostridium difficile antigen GDH



1

Ref. GD820001V (x20) Ref. GD820001VC (x20) Ref. GD820001VCC (x20)

GDH C+ C- 88:88:88

2

3

4

88:10:00 10'

C T C T

- +

5

Content/ Contenido

ENGLISH/ESPAÑOL

1. Quick Guide/Guía rápida	3
----------------------------------	---

ENGLISH

2. Intended use	7
3. Summary and Explanation	7
4. Test principle	8
5. Storage and stability	8
6. Precautions for users	8
7. Specimen collection and preparation	10
8. Limitations of the test	10
9. Expected values	11
10. Performance characteristics	11
A. Analytical sensitivity (detection limit)	11
B. Clinical sensitivity and specificity	12
C. Hook Effect	13
D. Cross Reactivity	14
E. Interferences	15
F. Repeatability and Reproducibility	16
ANNEX 1	17
I. Materials	17
II. Test procedures (samples)	17
III. Interpretation of results	18
IV. Quality Control	19
ANNEX 2	20
I. Materials	20
II. Test procedures (samples)	20
III. Interpretation of results	21
IV. Quality Control	22
A. External control. CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control	22
A.1 Positive control procedure	22
A.1.1 Interpretation positive control procedure	23
ANNEX 3	24

I.	Materials.....	24
II.	Test procedures (samples)	24
III.	Interpretation of results	25
IV.	Quality Control	26
	A. External positive control. CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control	26
A.1	Positive control procedure.....	26
A.1.1	Interpretation positive control procedure	27
	B. External negative control. CerTest Negative Control.....	28
B.1	Negative control procedure	28
B.1.1.	Interpretation negative control procedure	29

ESPAÑOL

2.	Uso previsto.....	30
3.	Introducción y explicación	30
4.	Fundamento del test	31
5.	Condiciones de almacenamiento.....	31
6.	Precauciones para el usuario	32
7.	Recogida de muestras y preparación.....	33
8.	Limitaciones del test.....	34
9.	Valores esperados.....	34
10.	Características del test	35
A.	Sensibilidad analítica (límite de detección)	35
B.	Sensibilidad y especificidad clínica	35
C.	Efecto Hook	36
D.	Reacciones cruzadas.....	37
E.	Interferencias.....	38
F.	Repetibilidad y Reproducibilidad	39
	ANEXO 1	40
I.	Materiales	40
II.	Procedimiento (muestras)	40
III.	Interpretación de los resultados	41
IV.	Control de Calidad.....	42
	ANEXO 2	43
I.	Materiales	43
II.	Procedimiento (muestras)	44

III.	Interpretación de los resultados	44
IV.	Control de Calidad.....	45
	A. Control Externo. CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control (hisopo control positivo).....	46
A.1	Procedimiento de uso del Control Positivo	46
A.1.1	Interpretación del procedimiento del control positivo	47
	ANEXO 3	48
I.	Materiales	48
II.	Procedimiento (muestras)	49
III.	Interpretación de los resultados	49
IV.	Control de Calidad.....	50
	A. Control positivo externo. CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control	51
A.1	Procedimiento de uso del Control Positivo	51
A.1.1	Interpretación del procedimiento del control positivo	52
	B. Control negativo externo. CerTest Negative Control.....	52
B.1	Procedimiento de uso del Control Negativo.....	52
B.1.1.	Interpretación del procedimiento del control negativo	53
 ENGLISH/ESPAÑOL		
11.	Reference/Bibliografía.....	54
12.	Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro	54

ENGLISH

2. Intended use

CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH one step card test is a coloured chromatographic immunoassay for the qualitative detection of *Clostridium difficile* Glutamate Dehydrogenase (GDH) in stool samples.

CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH card test offers a simple and highly sensitive screening assay to make a presumptive diagnosis of *Clostridium difficile* infection.

3. Summary and Explanation

Clostridium difficile (*C. difficile*), a Gram-positive spore bearing anaerobic bacterium is the major aetiological agent of diarrhoea and colitis associated with antibiotics (1).

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. Although traditionally considered an infection affecting patients in health care facilities, in the last 10-20 years *C. difficile* infection is increasingly identified in the community among people with no recent hospitalizations and without prior antibiotic exposure (2–4).

Disease due to *C. difficile* develops when the bacteria is allowed to proliferate in the colon, most commonly after antibiotic use has resulted in sufficient disturbance of the intestinal microflora. Overall, the use of antibiotics is associated with a three-fold increased risk of community-associated *C. difficile* infection (CA-CDI). However, the risk of CA-CDI is largely dependent on the class of antibiotic use (1,3).

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 microorganism (2,5).

The use of a direct faecal GDH screen, together with a faecal Toxin AB test, could improve the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Patients with a positive faecal GDH but negative toxin can be monitored closely while awaiting the result of a toxigenic culture (TC), that is used as the gold standard technique to determine *Clostridium difficile* infection (5).

Preventing *C. difficile* infection offers a potentially significant improvement in patient's outcomes, as well as a reduction in hospital costs and resource expenditures. Careful use of antibiotics remains a prominent public health strategy to reduce *C. difficile* infection cases (1,3).

4. Test principle

CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH is based on the principle of a qualitative immunochromatographic assay for qualitative detection of *Clostridium difficile* Glutamate Dehydrogenase (GDH) in human stool samples from patients suspected of *Clostridium difficile* antigen GDH infection.

The strip 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 coloured conjugate complexes.

If the sample is positive, the antigen of the diluted sample reacts with the red-coloured conjugate complex (anti-GDH monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) which was 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 (test line) capture the coloured conjugate and the red line will be visible. This band is used to interpret the result.

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

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

5. Storage and stability

The kits should be stored at 2-30°C, in these conditions can be used until the expiration date which is stated on the kit label. All the kit components are for only one use and should remain in its primary packaging until use. Do not freeze.

6. Precautions for users

- **For professional *in vitro* diagnostic use only.**
- Read the instructions for use carefully before use the kit.
- Do not use after expiration date.

- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use product if the protective external box or the protective aluminium pouches are opened or damaged upon arrival.
- Do not use the test (and positive/negative controls if the final reference contains them) if desiccant material is not present or broken inside the aluminium pouch.
- Components provided in the kit are approved for use in **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**. Do not mix or use with components from other product kit or lots. Do not use with other commercial kit components (from another supplier).
- All the components of the kit are for single use. Do not reuse.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves or other personal protective equipment such as goggles and mask that will be considered necessary. Do not eat, drink or smoke in the working area.
- All the specimens should be considered potentially hazardous, as well as all the materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the local or national safety regulations. Must be handled in the same manner as an infectious agent. Use proper infection control practices. These practices should include, but are not limited to, personal protective equipment (PPE), such as laboratory coat, surgical or appropriate mask, or face shield, disposable gloves, and eye protection. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of the samples. Each sample must be correctly and unequivocally identified, in order to guarantee the correct traceability of the samples.
- A new test must be used for each sample to avoid contaminations errors.
- Clean up spills thoroughly using an appropriate disinfectant.
- Reagents contain preservatives (<0.1% sodium azide). Avoid any contact with skin or mucous membrane. In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP) or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration. Material Safety Data Sheet are not included with this device, nevertheless it could be consulted upon request to CerTest Biotec.
- The certificate of analysis is not included with the device, however, it could be requested to Certest Biotec in case of need.
- 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.
- Visual interpretation of the results by coloured lines, interpretation of the results must be done by professional user without problems in colour interpretation.
- The tests (vials, devices, positive/negative control if any) should be discarded in a proper biohazard container after testing. These containers should be discarded in accordance with local or national laws or regulations.

7. Specimen collection and preparation

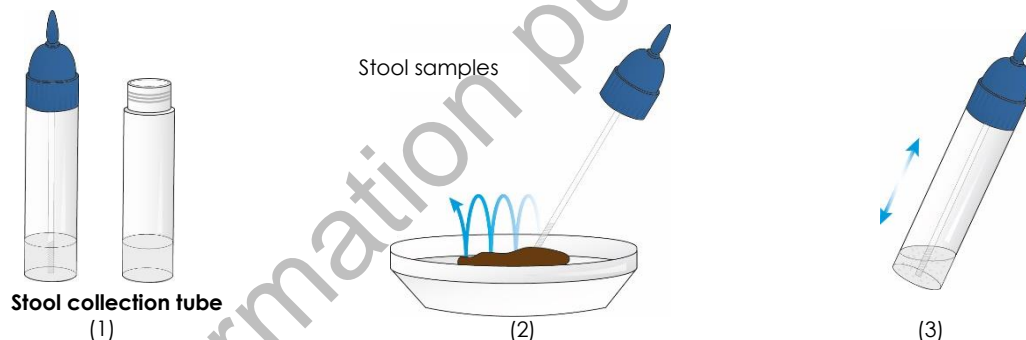
Samples should be collected in a clean container and processed as soon as possible after collection. Follow proper infection control practices.

Samples can be preserved at room temperature if they are going to be analysed into the same day after taking them. The recommendation is processed the sample immediately after collection.

If this is not possible, stool samples could be stored in the refrigerator (2-8°C) for a maximum of 7 days. For longer storage, maximum 1 year, the specimen must be kept frozen (-20°C). In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Ensure only the amount needed is thawed because of freezing and defrosting cycles are not recommended. Homogenise stool samples 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. 50 mg) and add it to the **stool collection tube**. For liquid samples, add approx. 125 µL in the **stool collection tube** using a micropipette.
2. Close the **stool collection tube**. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (3).



Continue immediately with the test procedure. See Annexes. Each sample vial (containing the sample) and cassette with which will be tested that sample, should be perfectly recognizable including patient's identification.

8. Limitations of the test

- 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 antigen GDH** 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 *Clostridium difficile* in faecal samples; nevertheless, it can be due to toxigenic or non-toxigenic strains of *Clostridium difficile*. 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 sample is lower than the detection limit value. If the symptoms or situation 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.

9. 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. In addition, nearly 223.900 people in the United States required hospital care for *C. difficile* and at least 12.800 people died in 2017. Although U.S. outpatient antibiotic prescription rate decreased from 2011 to 2016, at least 30% of outpatient antibiotic prescription are estimated to be unnecessary, which highlights the need to improve outpatient prescribing (4–6).

While the development of new treatments is one of these key actions, such investments must be coupled with dedicated efforts toward preventing infections in the first place, slowing the development of resistance through better antibiotic use, and stopping the spread of resistance (6).

10. Performance characteristics

A. Analytical sensitivity (detection limit)

Detection limit value (LoD) of **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** is 0.39 ng/mL of *Clostridium difficile* antigen GDH. There is not any external standard approved as a general and reference standard. The internal standard used for validation of this CerTest product is Glutamate dehydrogenase recombinant protein.

B. Clinical sensitivity and specificity

An external retrospective evaluation (Hospital Clínico Lozano Blesa, Zaragoza) with frozen stool samples was performed using **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** versus another immunochromatographic (IC) test. Discordant results between the tests were analyzed by qPCR. This is the evaluation criteria. The results were as follows:

IC test: CerTest Clostridium difficile antigen GDH	Evaluation criteria		
	+	-	Total
+	86	1	87
-	3	160	163
Total	89	161	250

Table 1 CerTest Clostridium difficile antigen GDH performance versus evaluation criteria.

CerTest Clostridium difficile antigen GDH vs Evaluation criteria		
	Mean Value	95% confidence interval
Sensitivity	96.6%	90.5-99.3%
Specificity	99.4%	96.6-100.0%
PPV	98.9%	93.8-100.0%
NPV	98.2%	94.7-99.6%

Table 2 CerTest Clostridium difficile antigen GDH clinical results.

The most recent external retrospective evaluation performed to the test (with frozen stool samples) showed the following results: sensitivity 96.6% (95% confidence interval: 90.5-99.3%) and specificity: 99.4% (95% confidence interval: 96.6-100.0%).

The results showed a high sensitivity and specificity to detect *Clostridium difficile* using **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**.

The following tables provide information about the evaluations **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** has undergone.

Nº	Site	Sample type	Reference	Target
1	Hospital Clínico Lozano Blesa (Zaragoza, Spain) April-May 2021	Human stool samples	(17.1.1)	<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH
2	Hospital Clínico Lozano Blesa (Zaragoza, Spain) April-June 2017	Human stool samples	(17.1.2)	<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH
3	Louvain, (Belgium) January- December 2016	Human stool samples	(17.1.3)	<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH
4	ECCMID April 2016, Amsterdam	Human stool samples	(17.1.4)	<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH

Table 3 Resume of Clinical evaluations. Site, sample type, target.

N°	TP	FP	FN	TN	N	Sens. (%) CI (%)	Spec. (%) CI (%)	PPV (%) CI (%)	NPV (%) CI (%)
1	86	1	3	160	250	96.6 (90.5-99.3)	99.4 (96.6-100.0)	98.9 (93.8-100.0)	98.2 (94.7-99.6)
2	51	0	0	75	126	100.0 (93.0-100.0)	100.0 (95.2-100.0)	100.0 (93.0-100.0)	100.0 (95.2-100.0)
3	130	8	8	332	478	94.2 (88.9-97.5)	97.6 (95.4-99.0)	94.2 (88.9-97.5)	97.6 (95.4-99.0)
4	27	8	6	117	158	81.8 (64.5-93.0)	93.6 (87.8-97.2)	77.1 (59.9-89.6)	95.1 (89.7-98.2)
Total	294	17	17	684	1012	94.5 (91.4-96.8)	97.6 (96.1-98.6)	94.5 (91.4-96.8)	97.6 (96.1-98.6)

Table 4 Clinical evaluations and global results. True positive (TP), false positive (FP), false negative (FN), true negative values (TN), and total samples (N). Sensitivity (Sens), specificity (Spec), Predictive Positive Values (PPV), Predictive Negative Values (NPV), 95% interval of confidence (CI) for CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH.

C. Hook Effect

CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH does not show full inhibitory hook effect at concentration higher than $10^5 \times \text{LoD}$.

D. Cross Reactivity

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** no cross reactivity against organism, pathogens, substances that could cause infections:

Cross reactivity										
Virus	Adenovirus	-	Coronavirus	-	Influenza B	-	Norovirus GII	-	Rotavirus	-
	Astrovirus	-	Influenza A	-	Norovirus GI	-	Respiratory Syncytial Virus	-		
Bacteria	Campylobacter coli	-	Clostridium Haemolyticum	-	Helicobacter pylori	-	Salmonella typhimurium	-	Streptococcus pyogenes	-
	Campylobacter jejuni	-	Clostridium Novyi	-	Legionella pneumophila	-	Shigella boydii	-	Yersinia enterocolitica O:3	-
	Clostridium difficile Toxin A	-	Clostridium Tetani	-	Listeria monocytogenes	-	Shigella dysenteriae	-	Yersinia enterocolitica O:9	-
	Clostridium difficile Toxin B	-	Clostridium Septicum	-	Peptostreptococcus anaerobius	-	Shigella flexneri	-		
	Clostridium perfringens	-	Escherichia coli O:157	-	Salmonella enteritidis	-	Shigella sonnei	-		
	Clostridium bifementans	-	Escherichia coli O:026	-	Salmonella paratyphi	-	Staphylococcus aureus	-		
	Clostridium Butyricum	-	Escherichia coli O:111	-	Salmonella typhi	-	Streptococcus pneumococcal	-		
Parasites	Cryptosporidium Parvum	-	Entamoeba histolytica	-	Giardia lamblia	-				
Others	Pig haemoglobin	-	Bovine haemoglobin		Bovine Lactoferrin	-	Bovine Transferrin	-		

Table 5 Cross reactivity results.

A specificity assay was performed for **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**. This concluded that the test, could detects the following antigens: *C. sporogenes* (CECT 485) and *C. botulinium* (CECT 551).

In this specificity assay, *Clostridium sordellii* (ATCC 9714) was evaluated and no cross reactivity was found. In few intercomparison studies **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** have a positive signal with this pathogen, but the nature of this positive result could not be established.

E. Interferences

An evaluation was performed to determine the possible interferences of **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**; no interferences against the substances tested were detected:

	Potencial interfering substance	Concentration	Results	Potencial interfering substance	Concentration	Results
Exogenous	Metronidazole	3.0 mg/mL	No interference	Loperamide hydrochloride (Fortasec)	0.15 mg/mL	No interference
	Ampicillin	3.0 mg/mL	No interference	Heparin (Hibar)	350.0 IU/mL	No interference
	Oseltamivir	0.3 mg/mL	No interference	Almagato (Almax)	3.0 mg/mL	No interference
	Amantadine	0.3 mg/mL	No interference	Fosfamycin (Monurol)	$3.0 \cdot 10^{-3}$ mg/mL	No interference
	Ribavirin	3.0 mg/mL	No interference	Acetylcysteine (Fluimucil)	3.0 mg/mL	No interference
	Codeine (Toseina)	0.2 mg/mL	No interference	Dexketoprofen trometamol (Enantyum)	0.3 mg/mL	No interference
	Benzocaine (Angileptol)	0.3 mg/mL	No interference	Levofloxacin	3.0 mg/mL	No interference
	Cloperastine (Flutox)	0.3 mg/mL	No interference	Ciprofloxacin	0.3 mg/mL	No interference
	Carbocisteine mucolítico (Iniston)	3.0 mg/mL	No interference	Rifampicin (Rifaldin)	0.3 mg/mL	No interference
	Loratadine	0.3 mg/mL	No interference	Phenoxymethylpenicillin potassium	3.0 mg/mL	No interference
	Dexchlorpheniramine (Polaramine)	0.3 mg/mL	No interference	Ambroxol hydrochloride (Mucosan)	0.3 mg/mL	No interference
	Ebastine (Ebastel)	3.0 mg/mL	No interference	Macrogol 3350 (Movicol)	3.0 mg/mL	No interference
	Acetyl Salicylic (Adiro)	0.3 mg/mL	No interference	Lysine Carbocysteinatate (Pectox)	$3.0 \cdot 10^{-2}$ mg/mL	No interference
	Ibuprofen (Espidifen)	3.0 mg/mL	No interference	Hydroxyzine dihydrochloride	0.3 mg/mL	No interference
	Paracetamol (Dolocartil)	5.0 mg/mL	No interference	Lorazepam	$3.0 \cdot 10^{-3}$ mg/mL	No interference
	Metamizole (Nolofil)	5.0 mg/mL	No interference	Amoxicillin	3.0 mg/mL	No interference
	Prednisone	0.3 mg/mL	No interference	Mercaptopurine	0.3 mg/mL	No interference
	Omeprazole	$2.0 \cdot 10^{-3}$ mg/mL	No interference	Biotine	100.0 µg/mL	No interference
	Naso GEL	0.9 mg/mL	No interference	Sore Throat Phenol spray	0.5 mg/mL	No interference
	CVS Nasal Spray (Cromolyn)	4 mg/mL	No interference	Tobramycin	0.3 mg/mL	No interference
Afrin (Oxymetazoline)	$5.0 \cdot 10^{-2}$ mg/mL	No interference	Mupirocin	$2.5 \cdot 10^{-2}$ mg/mL	No interference	
CVS Nasal Drops (Phenylephrine)	10.0 mg/mL	No interference	Fluticasone Propionate	$5.0 \cdot 10^{-2}$ mg/mL	No interference	
ZICAM	1.0 mg/mL	No interference	Homeopathic	DIL 1/10	No interference	

	Potencial interfering substance	Concentration	Results	Potencial interfering substance	Concentration	Results
	Phenylpropanolamine	0.3 mg/mL	No interference			
Endogenous	Human haemoglobin	5.0 µg/mL	No interference	Human lactoferrin	5.0 µg/mL	No interference
	Human transferrin	0.5 µg/mL	No interference	Mucine	0.5 %	No interference
	Human calprotectin	5.0 µg/mL	No interference	Human blood	5.0 %	No interference

Table 6 Interferences results.

F. Repeatability and Reproducibility

Following the study of repeatability and reproducibility of of **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**, performed using different internal samples, negative and positive, no differences have been observed within the evaluations.

For information purposes only

ANNEX 1

KIT 20 CARD *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ANTIGEN GDH. Catalogue reference: GD820001V

Annex for the following reference:

PRODUCT	REFERENCE
CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH Card (20 tests kit with stool vials)	GD820001V

Table A 1. Reference for kit 20 card of CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH.

I. Materials

MATERIALS PROVIDED	MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED
-20x CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH (card test format) -20x Stool collection tubes with diluent - 1x IFU Instructions for use (including Quick guide use).	- Disposable gloves (other personal protective equipment that will be considered necessary) - Timer - Specimen collection container

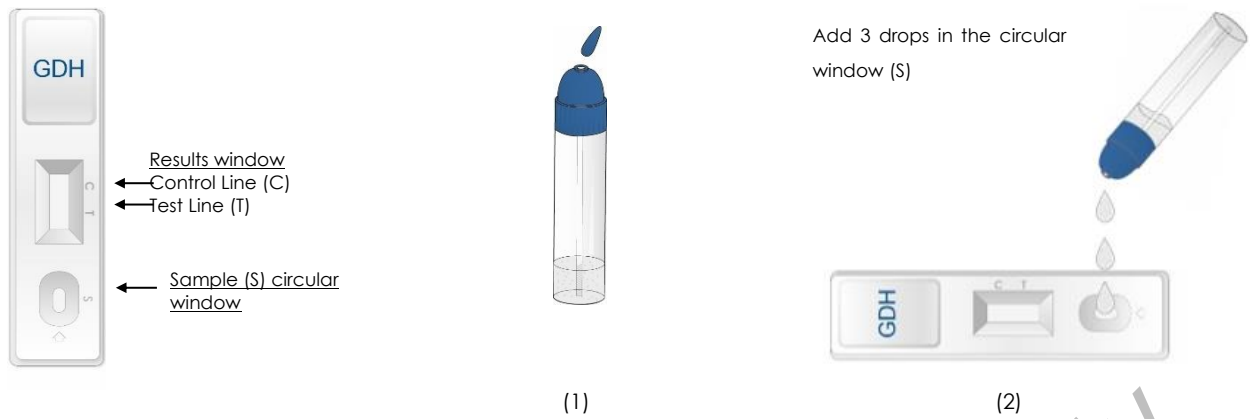
Table A 1.1 Materials necessities for test performance.

II. Test procedures (samples)

Follow proper infection control practices. Allow tests, samples 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* antigen GDH** (card test) from its sealed bag just before using it.
3. Take the **stool collection tube**, cut the end of the cap (1) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter S (2). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes. Any result read after more than 10 minutes will be considered invalid.

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 diluent until seeing the liquid running through the reaction zone.



III. Interpretation of results

(please, refer to the illustration below)

	CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH	Interpretation of the results
1.	NEGATIVE	<p>There is no <i>Clostridium difficile</i> presence in the sample. No infection caused by <i>Clostridium difficile</i>. A negative result should be followed up with additional laboratory techniques to confirm the results.</p>
	GREEN	
2.	POSITIVE	<p>There is <i>Clostridium difficile</i> antigen presence in the sample. Possible infection caused by <i>Clostridium difficile</i>. The presence of these lines (control green line and test red line), independent of their intensity should be considered as a positive result. A positive result should be followed up with additional laboratory techniques to confirm the results.</p>
	GREEN-RED	
3.	INVALID	<p>Invalid result, we recommend repeating the assay using the same sample with another test. Any result read after more than 10 minutes will be considered invalid.</p>
	Any other result	

Table A 1.2 CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH performance interpretation of the results.

NEGATIVE: Only one GREEN line appears across the results window in the site marked with the letter C (control line).

POSITIVE: In addition to the GREEN control line, a RED line also appears in the site marked with the letter T (test line) in the results window.

The result would be considered as positive independent on the intensity of the RED test line.

INVALID: Total absence of the control coloured line (GREEN) regardless the appearance or not of the test line (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control line 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 band in the test line (T) in the results window will vary depending on the concentration of antigen presents in the specimen. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in antigen can be determined by this qualitative test.

IV. Quality Control

INTERNAL CONTROL: control line

Internal procedural control is included in the test. A green line appearing in the control line (C) in the results window is an internal control, which confirms sufficient specimen volume and correct procedural technique.

For information purposes only

ANNEX 2

KIT 20 CARD *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ANTIGEN GDH. Catalogue reference: GD820001VC

Annex for the following reference:

PRODUCT	REFERENCE
CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH Card (20 tests kit with stool vials + PC)	GD820001VC

Table A 2. Reference for kit 20 card of CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH with positive control.

I. Materials

MATERIALS PROVIDED	MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED
-20x CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH (card test format) -20x Stool collection tubes with diluent. -1x CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control -1x Testing tube -1x Disposable pipette -1x IFU Instructions for use (including Quick guide use).	- Disposable gloves (other personal protective equipment that will be considered necessary) - Timer - Specimen collection container

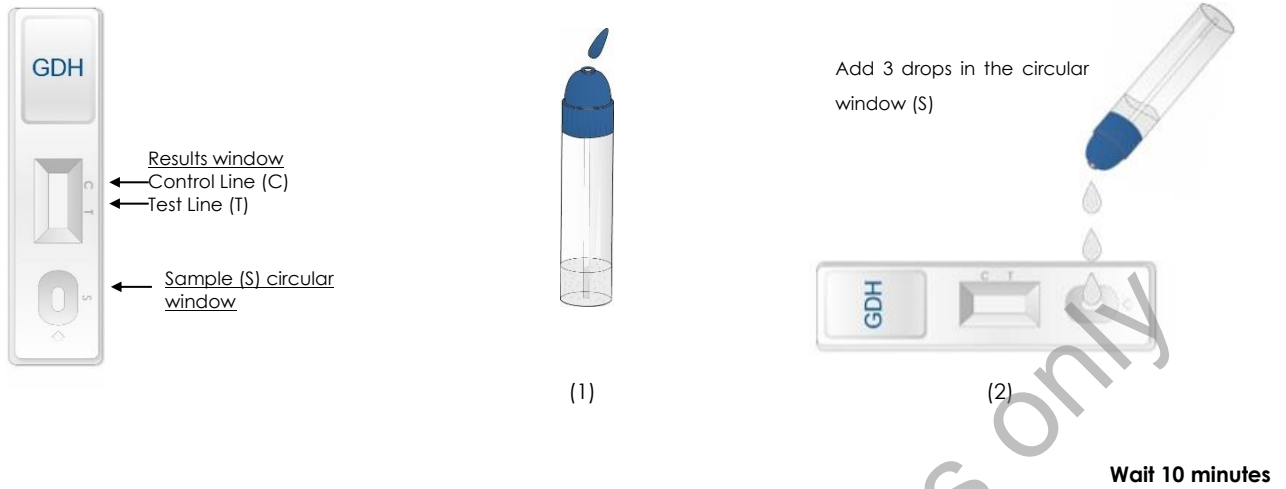
Table A 2.1 Materials necessities for test performance.

II. Test procedures (samples)

Follow proper infection control practices. Allow tests, samples 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* antigen GDH** (card test) from its sealed bag just before using it.
3. Take the **stool collection tube**, cut the end of the cap (1) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter S (2). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes. Any result read after more than 10 minutes will be considered invalid.

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 diluent until seeing the liquid running through the reaction zone.



III. Interpretation of results

(please, refer to the illustration below)

CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH		Interpretation of the results	
1.	NEGATIVE		<p>There is no <i>Clostridium difficile</i> presence in the sample. No infection caused by <i>Clostridium difficile</i>.</p> <p>A negative result should be followed up with additional laboratory techniques to confirm the results.</p>
	GREEN		
2.	POSITIVE		<p>There is <i>Clostridium difficile</i> antigen presence in the sample. Possible infection caused by <i>Clostridium difficile</i>.</p> <p>The presence of these lines (control green line and test red line), independent of their intensity should be considered as a positive result.</p> <p>A positive result should be followed up with additional laboratory techniques to confirm the results.</p>
	GREEN-RED		
3.	INVALID		<p>Invalid result, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.</p> <p>Any result read after more than 10 minutes will be considered invalid.</p>
	Any other result		

Table A.2.2 CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH performance interpretation of the results.

NEGATIVE: Only one GREEN line appears across the results window in the site marked with the letter C (control line).

POSITIVE: In addition to the GREEN control line, a RED line also appears in the site marked with the letter T (test line) in the results window.

The result would be considered as positive independent on the intensity of the RED test line.

INVALID: Total absence of the control coloured line (GREEN) regardless the appearance or not of the test line (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control line 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 band in the test line (T) in the results window will vary depending on the concentration of antigen presents in the specimen. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in antigen can be determined by this qualitative test.

IV. Quality Control

CerTest Clostridium difficile antigen GDH (card test) presents two controls:

INTERNAL CONTROL: control line

Internal control: internal procedural control is included in the test. A green line appearing in the control line (C) in the results window is an internal control, which confirms sufficient specimen volume and correct procedural technique.

EXTERNAL CONTROL: POSITIVE CONTROL SWAB

External control: CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control (positive control swab).

A. External control. CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control

CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control is an external quality control for **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**. Use **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** to check that the extraction reagents and the test are working properly.

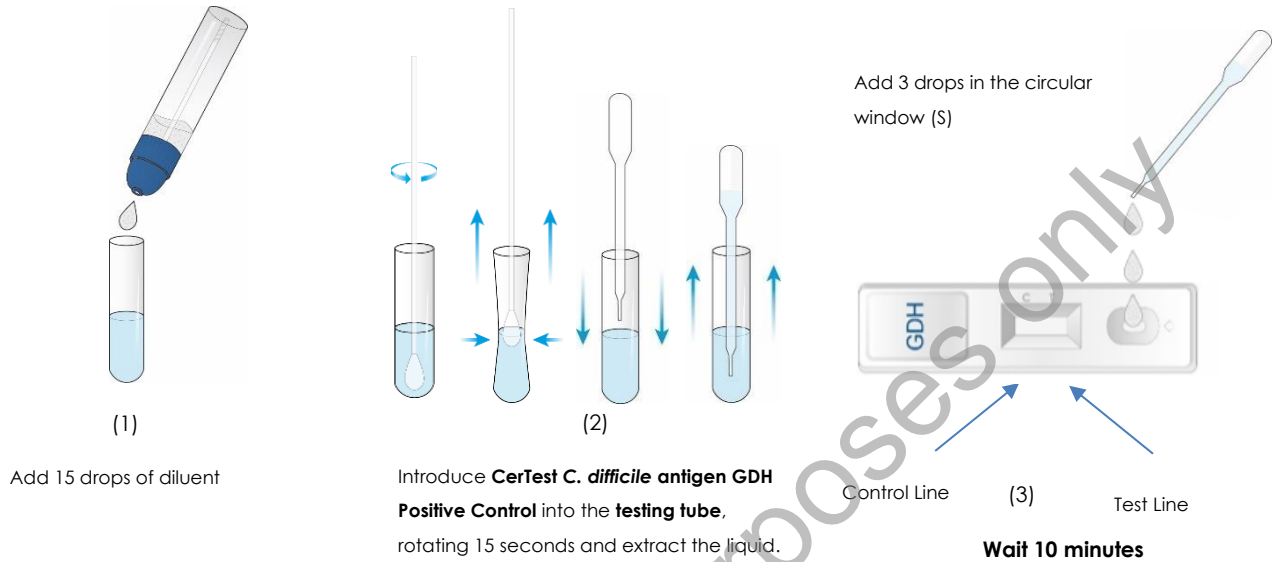
Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** is stable through the expiration date printed on the sealed pouch. **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

A.1 Positive control procedure

Allow tests and CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open the package until the performance of the assay.

1. Add 15 drops (1) of diluent from the **stool collection tube** into the **testing tube** and immediately introduce **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control**.
2. Mix the solution by rotating **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** forcefully against the side of the **testing tube** at least 15 seconds. Extract as much liquid as possible from **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control**, squeezing the sides of the **testing tube** as **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** is withdrawn (2). Discard **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control**.

3. Remove **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** (card test) from its sealed bag just before using it.
4. Use a separate **disposable pipette** and test for each control. Dispense 3 drops from the **testing tube** in the circular window marked with the letter S (3).
5. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes. Any result read after more than 10 minutes will be considered invalid.



Positive control could be tested once for each new test kit opened and as otherwise required by your laboratory's standard quality control procedures.

A.1.1 Interpretation positive control procedure


CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control		Interpretation of the results
1.	POSITIVE	 <p>A GREEN line (control line (C)) and a RED line (test line (T)) appear across the results window during the test performance due to presence of GDH antigen in CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control.</p>
	GREEN-RED	
2.	INVALID	<p>Total absence of the control coloured line (GREEN), regardless the appearance or not of the test line (RED), or only the control (C) coloured line (GREEN). Incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the control with a new test and a new CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control.</p> <p>If the situation still persists, discontinue using the test kit and contact your local distributor.</p> <p>Any result read after more than 10 minutes will be considered invalid.</p>
	Any other result	

Table A 2.3 CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control performance interpretation of the results.

ANNEX 3

KIT 20 CARD *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ANTIGEN GDH. Catalogue reference: GD820001VCC

Annex for the following reference:

PRODUCT	REFERENCE
CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH Card (20 tests kit with stool vials + PC + NC)	GD820001VCC

Table A 3. Reference for Kit 20 card of CerTest *Clostridium difficile* GDH antigen with positive and negative control.

I. Materials

MATERIALS PROVIDED	MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED
-20x CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH (card test format) -20x Stool collection tubes with diluent. -1x CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control -1x CerTest Negative Control -2x Testing tube -2x Disposable pipette -1x IFU Instructions for use (including Quick guide use).	- Disposable gloves (other personal protective equipment that will be considered necessary) - Timer - Specimen collection container

Table A 3.1 Materials necessities for test performance.

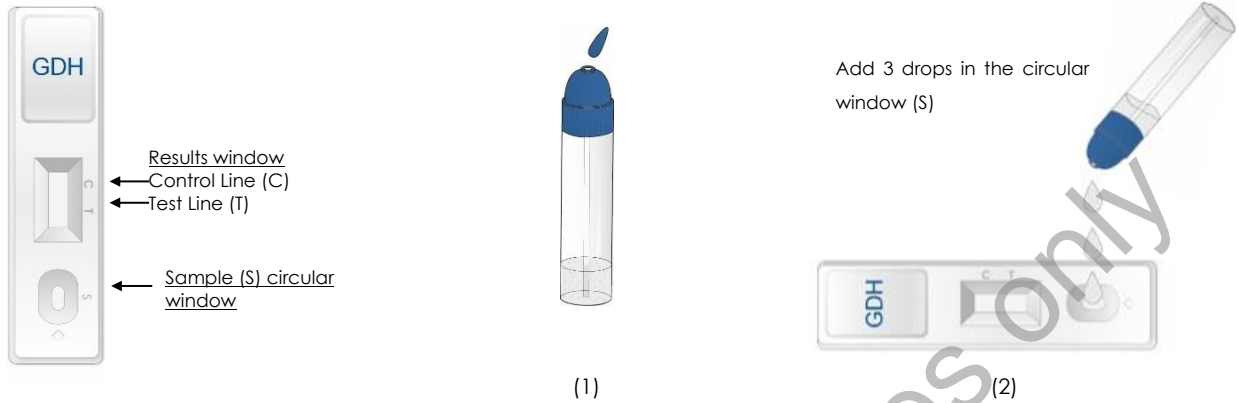
II. Test procedures (samples)

Follow proper infection control practices. Allow tests, samples 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* antigen GDH** (card test) from its sealed bag just before using it.
3. Take the **stool collection tube**, cut the end of the cap (1) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter S (2). Avoid adding solid particles with the liquid.

4. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes. Any result read after more than 10 minutes will be considered invalid.

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 diluent until seeing the liquid running through the reaction zone.



Wait 10 minutes

III. Interpretation of results

(please, refer to the illustration below)

	CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH	Interpretation of the results
1.	NEGATIVE	<p>There is no <i>Clostridium difficile</i> presence in the sample. No infection caused by <i>Clostridium difficile</i>.</p> <p>A negative result should be followed up with additional laboratory techniques to confirm the results.</p>
	GREEN	
2.	POSITIVE	<p>There is <i>Clostridium difficile</i> antigen presence in the sample. Possible infection caused by <i>Clostridium difficile</i>.</p> <p>The presence of these lines (control green line and test red line), independent of their intensity should be considered as a positive result.</p> <p>A positive result should be followed up with additional laboratory techniques to confirm the results.</p>
	GREEN-RED	
3.	INVALID	<p>Invalid result, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.</p> <p>Any result read after more than 10 minutes will be considered invalid.</p>
	Any other result	

Table A 3.2 CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH performance interpretation of the results.

NEGATIVE: Only one GREEN line appears across the results window in the site marked with the letter C (control line).

POSITIVE: In addition to the GREEN control line, a RED line also appears in the site marked with the letter T (test line) in the results window.

The result would be considered as positive independent on the intensity of the RED test line.

INVALID: Total absence of the control coloured line (GREEN) regardless the appearance or not of the test line (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control line 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 band in the test line (T) in the results window will vary depending on the concentration of antigen presents in the specimen. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in antigen can be determined by this qualitative test.

IV. Quality Control

CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH (card test) presents three controls:

INTERNAL CONTROL: control line

Internal control: internal procedural control is included in the test. A green line appearing in the control line (C) in the results window is an internal control, which confirms sufficient specimen volume and correct procedural technique.

EXTERNAL CONTROL: POSITIVE CONTROL AND NEGATIVE CONTROL SWAB:

External positive control: CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control (positive control swab).

External negative control: CerTest Negative Control (negative control swab).

A. External positive control. CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control

CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control is an external quality control for **CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH**. Use **CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control** to check that the extraction reagents and the test are working properly.

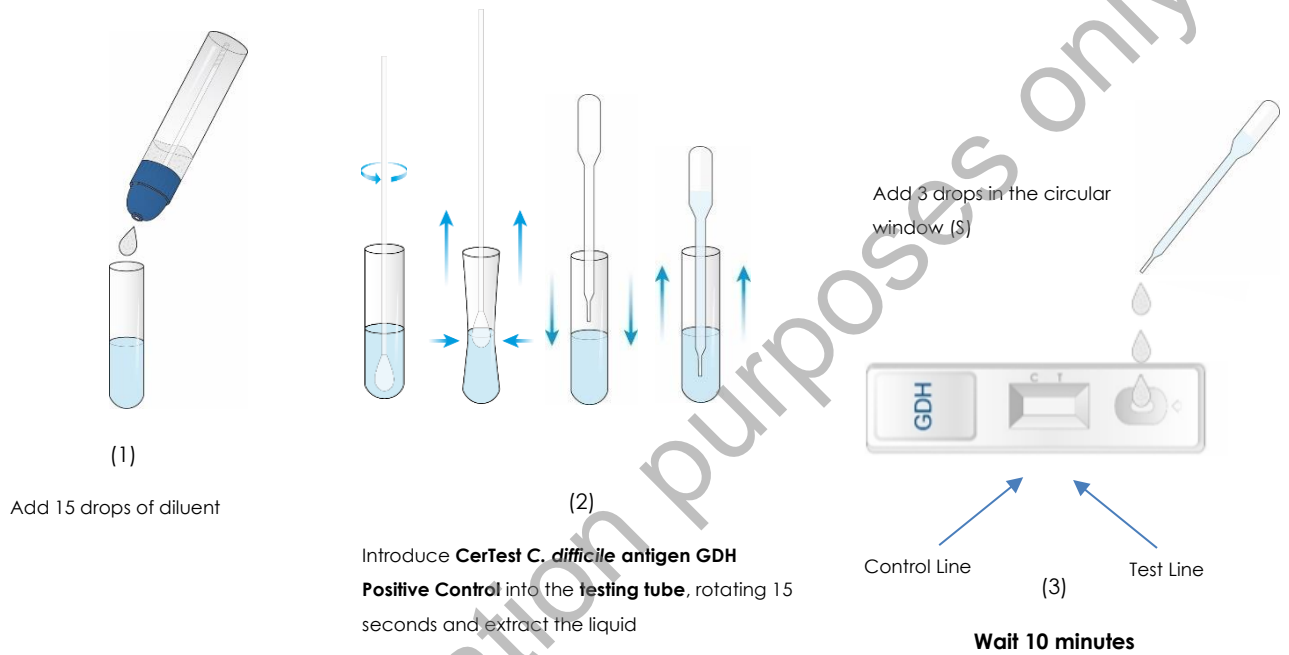
Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C, **CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control** is stable through the expiration date printed on the sealed pouch. **CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control** must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

A.1 Positive control procedure

Allow tests and CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open the package until the performance of the assay.

1. Add 15 drops (1) of diluent from the **stool collection tube** into the **testing tube** and immediately introduce **CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control**.

- Mix the solution by rotating **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** forcefully against the side of the **testing tube** at least 15 seconds. Extract as much liquid as possible from **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control**, squeezing the sides of the **testing tube** as **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** is withdrawn (2). Discard **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control**.
- Remove **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** (card test) from its sealed bag just before using it.
- Use a separate **disposable pipette** and test for each control. Dispense 3 drops from the **testing tube** in the circular window marked with the letter S (3).
- Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes. Any result read after more than 10 minutes will be considered invalid.



Positive control could be tested once for each new test kit opened and as otherwise required by your laboratory's standard quality control procedures.

A.1.1 Interpretation positive control procedure

	CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control	Interpretation of the results
1.	<p>POSITIVE</p> <p>GREEN-RED</p>	A GREEN line (control line (C)) and a RED line (test line (T)) appear across the results window during the test performance due to presence of GDH antigen in CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control .
2.	<p>INVALID</p> <p>Any other result</p>	Total absence of the control coloured line (GREEN), regardless the appearance or not of the test line (RED), or only the control (C) coloured line (GREEN). Incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the

CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control		Interpretation of the results
		<p>control with a new test and a new CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control.</p> <p>If the situation still persists, discontinue using the test kit and contact your local distributor.</p> <p>Any result read after more than 10 minutes will be considered invalid.</p>

Table A 3.3 CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control performance interpretation of the results.

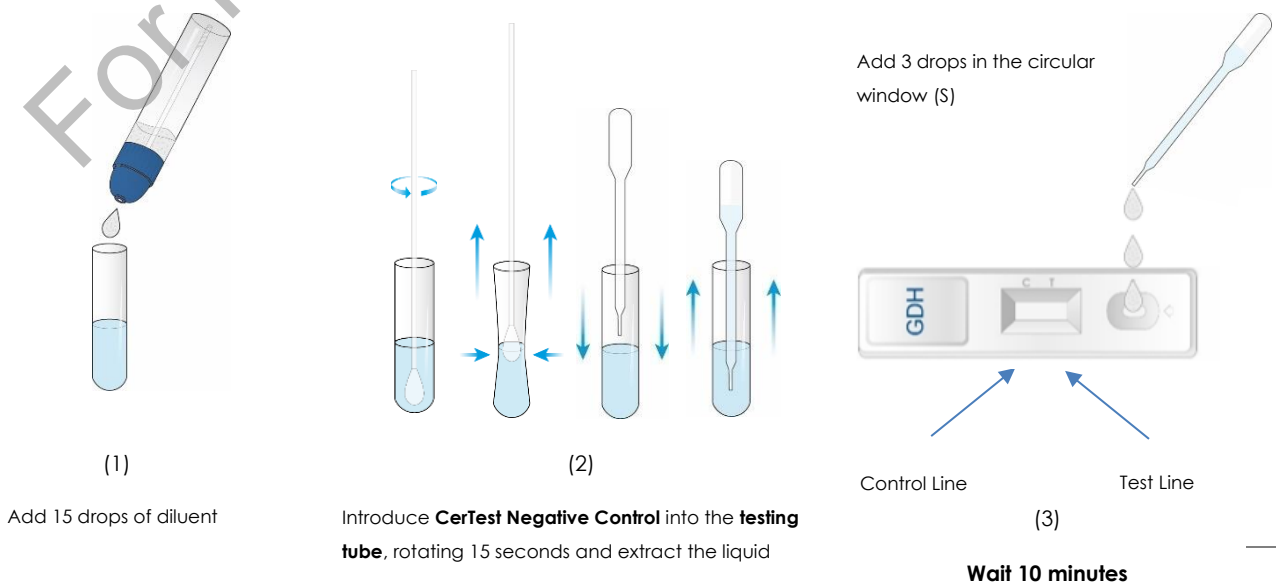
B. External negative control. CerTest Negative Control

CerTest Negative Control is an external quality control for **CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH** (card test). Use **CerTest Negative Control** to check that the extraction reagents and the test are working properly. Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C, **CerTest Negative Control** is stable through the expiration date printed on the sealed pouch. **CerTest Negative Control** must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

B.1 Negative control procedure

Allow tests and CerTest Negative Control to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open the package until the performance of the assay.

1. Add 15 drops (1) of diluent from the **stool collection tube** into the **testing tube** and immediately put **CerTest Negative Control**.
2. Mix the solution by rotating **CerTest Negative Control** forcefully against the side of the **testing tube** at least 15 seconds. Extract as much liquid as possible from **CerTest Negative Control**, squeezing the sides of the **testing tube** as **CerTest Negative Control** is withdrawn (2). Discard **CerTest Negative Control**.
3. Remove **CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH** (card test) from its sealed bag just before using it.
4. Use a separate **disposable pipette** and test for each control. Dispense 3 drops from the **testing tube** in the corresponding circular window (3).
5. **Read the result at 10 minutes**. Do not read the test result later than 10 minutes. Any result read after more than 10 minutes will be considered invalid.



Negative controls could be tested once for each new test kit opened and as otherwise required by your laboratory's standard quality control procedures.

B.1.1. Interpretation negative control procedure


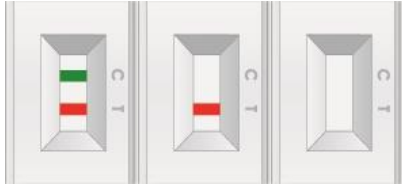
CerTest Negative Control		Interpretation of the results
1.	VALID RESULT	 <p>Only A GREEN line (control line (C)) appear across the results window during the test performance.</p>
	GREEN (only control band appear)	
2.	INVALID	 <p>Total absence of the control coloured line (GREEN), regardless the appearance or not of the test line (RED), or present of both lines (RED test and GREEN control lines). Incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the control with a new test and a new CerTest Negative Control.</p> <p>If the situation still persists, discontinue using the test kit and contact your local distributor.</p> <p>Any result read after more than 10 minutes will be considered invalid</p>
	Any other result	

Table A 3.4 CerTest Negative Control performance interpretation of the results.

2. Uso previsto

CerTest Clostridium difficile antigen GDH card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa de *Clostridium difficile* Glutamato Deshidrogenasa (GDH) en muestras de heces.

CerTest Clostridium difficile antigen GDH card test ofrece un ensayo de cribado sencillo y de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de infección por *Clostridium difficile*.

3. Introducción y explicación

Clostridium difficile (*C. difficile*), bacteria anaerobia, Gram-positiva, formadora de esporas, es el principal agente etiológico de la diarrea y de la colitis relacionada con el uso de antibióticos (1).

C. difficile es la principal causa de diarrea relacionada con la atención de la salud en países desarrollados y es una fuente importante de morbilidad y mortalidad de enfermedad nosocomial en todo el mundo. Aunque tradicionalmente se consideraba una infección que afectaba a pacientes en centros de salud, en los últimos 10-20 años, la infección por *C. difficile* se identifica cada vez más en la comunidad entre personas sin hospitalizaciones recientes y sin exposición previa a antibióticos (2-4).

La enfermedad causada por *C. difficile* se origina cuando se permite que la bacteria proliferen en el colon, mayoritariamente a causa de una alteración de la microflora intestinal tras un tratamiento con antibióticos. En general, el uso de antibióticos se asocia con un riesgo tres veces mayor de infección por *C. difficile* asociada a la comunidad (CA-CDI). Sin embargo, el riesgo de CA-CDI depende en gran medida de la clase de uso de antibióticos (1,3).

Tras esta colonización, *C. difficile* puede liberar dos toxinas de alto peso molecular, la Toxina A y la Toxina B, siendo ambas responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, que van desde una diarrea acuosa auto-limitante, no grave, hasta 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 la convierte en un excelente marcador para determinar la presencia del microorganismo (2,5).

El uso de un ensayo directo de GDH fecal, junto con una prueba de toxina AB fecal, podría mejorar el diagnóstico de infección por *Clostridium difficile*. Los pacientes con GDH fecal positiva, pero toxina negativa pueden ser monitoreados mientras se espera el resultado de un cultivo toxigénico (CT), que se utiliza como técnica de referencia para determinar la infección por *Clostridium difficile* (5).

La prevención de la infección por *C. difficile* ofrece una mejora potencialmente significativa en los resultados del paciente, así como una reducción de los costes hospitalarios y los gastos de recursos. El uso controlado

de antibióticos sigue siendo una importante estrategia de salud pública para reducir los casos de infección por *C. difficile* (1,3).

4. Fundamento del test

CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección de *Clostridium difficile* Glutamato Deshidrogenasa (GDH) en muestras de heces procedentes de pacientes sospechosos de infección por *Clostridium difficile* antigen GDH.

La tira consiste en una membrana de nitrocelulosa que ha sido 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 de 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.

Si la muestra es positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-GDH-microesferas rojas de látex) el cual ha sido secado 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 (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá. Esta línea se utilizará para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no presenta antígeno de GDH o el antígeno está presente en una concentración inferior al límite de detección y no se produce reacción con el complejo coloreado rojo. Los anticuerpos anti-GDH presentes en la membrana (línea de test) no capturarán el antígeno-complejo coloreado rojo (no formado) y no aparecerá la línea roja.

Independientemente de que la muestra sea positiva o no, la mezcla continuará moviéndose a través de la membrana hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en la línea de control. Estos anticuerpos anti-proteína específica presentes en la membrana capturarán el complejo conjugado de control y la línea de control verde siempre aparecerá. La aparición de esta línea 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.

5. Condiciones de almacenamiento

Los kits deben almacenarse a 2-30°C, en estas condiciones pueden ser usados hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta de kit. Todos los componentes del kit son de un solo uso y deben permanecer en su envase primario hasta ser usados. No congelar.

6. Precauciones para el usuario

- **Sólo para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.**
- Leer las instrucciones de uso cuidadosamente antes de usar el kit
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- No utilizar el kit si la etiqueta que cierra el estuche está dañada o rota.
- No utilizar el producto si el estuche o los sobres de aluminio están abiertos o dañados en el momento que se recibe.
- No utilizar los test (ni controles positivos/negativos si la referencia final los contiene) si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**. No mezclar o utilizar componentes de otros kits o lotes. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados (de otros proveedores).
- Todos los componentes del kit son de un solo uso. No reutilizar.
- Seguir Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables u otros equipos de protección individual como gafas y mascarilla que se consideren necesarios. No comer, ni beber o fumar en la zona de trabajo.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas, así como los materiales que han estado en contacto con las muestras y deben ser manipuladas de acuerdo con las normas locales o nacionales de seguridad. Deben tratarse de la misma forma que un agente infeccioso. Utilice prácticas adecuadas de control de infecciones al recolectar y manipular las muestras. Estas prácticas deben incluir, pero no se limitan a, equipo de protección personal (EPP), bata de laboratorio, mascarilla quirúrgica u otro tipo de máscara que se considere apropiada, guantes desechables y protección para los ojos. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras. Cada una de las muestras deben de ser correcta e inequívocamente identificadas con el fin de garantizar la correcta trazabilidad de las mismas.
- Un nuevo test deberá utilizarse para cada una de las muestras para evitar errores de contaminación.
- Limpiar los posibles derrames con un desinfectante adecuado.
- Los reactivos contienen conservantes (<0.1% azida de sodio). Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. De conformidad con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (REACH), **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** no contiene sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (CLP) o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración. La hoja de datos de seguridad no se incluye con este producto, sin embargo, puede ser consultada bajo petición a CerTest Biotec.
- El certificado de análisis no se incluye con este producto, sin embargo, se puede solicitar a CerTest Biotec en caso de necesidad.

- 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.
- Interpretación visual de los resultados utilizando líneas de colores, interpretación de resultados debe ser realizada por un usuario profesional sin problemas en la interpretación de colores.
- Los tests (viales, pruebas, control positivo/negativo si los contiene el kit final) deben ser desechados en un contenedor adecuado de bioseguridad después de ser usados. Estos contenedores deben desecharse de acuerdo con las leyes o regulaciones locales o nacionales.

7. Recogida de muestras y preparación

Las muestras deben recogerse en un recipiente limpio y ser procesadas lo antes posible tras su recolección. Siga las prácticas adecuadas de control de infecciones.

Las muestras pueden conservarse a temperatura ambiente si se van a analizar en el mismo día en el que han sido tomadas. La recomendación es procesarlas inmediatamente tras su recolección.

Si esto no fuera posible, las muestras de heces pueden almacenarse en nevera (2-8°C) como máximo 7 días. Para la conservación de muestras un tiempo prolongado, como máximo 1 año, deben mantenerse congeladas (-20°C). En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. Ciclos de congelación y descongelación no son recomendables, por lo que se debe descongelar únicamente la cantidad necesaria de muestra para hacer la prueba. Homogeneizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Preparación de la muestra (ver dibujo):

1. Abrir el **stool collection tube** (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 (aprox. 50 mg) y finalmente se introducirá la muestra en el **stool collection tube**. Para muestras líquidas, añada aprox. 125 µL en el **stool collection tube** utilizando una micropipeta.
2. Cerrar el **stool collection tube** con diluyente. Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (3).



Continuar inmediatamente con el procedimiento del test. Véase en Anexos.

Cada vial de muestra (que contiene la muestra) y carcasa con la que se analizará esa muestra, deben ser perfectamente reconocibles incluyendo la identificación del paciente.

8. Limitaciones del test

- 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* antigen GDH** 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 *Clostridium difficile* antigen GDH en muestras de heces; sin embargo, ésta puede ser debida a cepas toxigénicas o no-toxigénicas de *Clostridium difficile*. Un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas diagnósticas (cultivo toxigénico) para determinar la cepa. La infección debe confirmarse por un especialista o médico cualificado, tras evaluar las pruebas clínicas y los hallazgos de laboratorio teniendo en cuenta la correlación que puede existir con todas las observaciones clínicas.
- 6) Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de antígenos en la muestra de heces 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 o se debería utilizar otras técnicas invasivas.
- 7) 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.
- 8) 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.

9. 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. Además, casi 223.900 personas en Estados Unidos requirieron atención hospitalaria por *C. difficile* y al menos 12.800 personas murieron en 2017. Aunque la tasa de prescripción de antibióticos en los Estados Unidos disminuyó de 2011 a 2016, se estima que al menos el 30% de las prescripciones de antibióticos en

pacientes externos son innecesarias, lo que pone de manifiesto la necesidad de mejorar la prescripción en pacientes externos (4-6).

Si bien el desarrollo de nuevos tratamientos es una de estas acciones clave, estas inversiones deben ir acompañadas de esfuerzos dedicados a prevenir las infecciones en primer lugar, frenar el desarrollo de la resistencia mediante un mejor uso de los antibióticos y detener la propagación de la resistencia (6).

10. Características del test

A. Sensibilidad analítica (límite de detección)

El límite de detección (LoD) de **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** es 0.39 ng/mL de antígeno GDH de *Clostridium difficile* antigen GDH. No existe ningún estándar externo aprobado como estándar general y de referencia. El estándar interno utilizado para la validación de este producto CerTest es una Glutamato deshidrogenasa de *Clostridium difficile* recombinante.

B. Sensibilidad y especificidad clínica

Una evaluación externa retrospectiva (Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza) con muestras de heces congeladas se llevó a cabo comparando **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** frente a otro test inmunocromatográfico (IC). Resultados discordantes entre los test fueron analizados mediante qPCR. Este es el criterio de evaluación. Los resultados se muestran a continuación:

		Criterio de evaluación		
		+	-	Total
IC test: CerTest Clostridium difficile antigen GDH	+	86	1	87
	-	3	160	163
	Total	89	161	250

Tabla 1 Desempeño de CerTest Clostridium difficile antigen GDH frente al criterio de evaluación.

CerTest Clostridium difficile antigen GDH vs Criterio de evaluación		
	Valor medio	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	96.6%	90.5-99.3%
Especificidad	99.4%	96.6-100.0%
VPP	98.9%	93.8-100.0%
VPN	98.2%	94.7-99.6%

Tabla 2 Resultados clínicos de CerTest Clostridium difficile antigen GDH.

Esta evaluación externa retrospectiva más reciente (con muestras de heces congeladas) mostró los siguientes resultados: sensibilidad 96,6% (intervalo de confianza del 95%: 90,5-99,3%) y especificidad: 99,4% (intervalo de confianza del 95%: 96,6-100,0%).

Los resultados mostraron una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Clostridium difficile* utilizando **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**.

En las siguientes tablas puede encontrarse información acerca de las evaluaciones que se le han realizado a **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**.

Nº	Localización	Tipo de muestra	Referencia	Diana
1	Hospital Clínico Lozano Blesa (Zaragoza, España) Abril-Mayo 2021	Muestras de heces humanas	(17.1.1)	<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH
2	Hospital Clínico Lozano Blesa (Zaragoza, España) Abril-Junio 2017	Muestras de heces humanas	(17.1.2)	<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH
3	Lovaina, (Bélgica) Enero-Diciembre 2016	Muestras de heces humanas	(17.1.3)	<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH
4	ECCMID Abril 2016, Ámsterdam	Muestras de heces humanas	(17.1.4)	<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH

Tabla 3. Resumen evaluaciones clínicas. Localización, tipo de muestra, diana.

Nº	TP	FP	FN	TN	N	Sens. (%) CI (%)	Spec. (%) CI (%)	VPP (%) CI (%)	VPN (%) CI (%)
1	86	1	3	160	250	96.6 (90.5-99.3)	99.4 (96.6-100.0)	98.9 (93.8-100.0)	98.2 (94.7-99.6)
2	51	0	0	75	126	100.0 (93.0-100.0)	100.0 (95.2-100.0)	100.0 (93.0-100.0)	100.0 (95.2-100.0)
3	130	8	8	332	478	94.2 (88.9-97.5)	97.6 (95.4-99.0)	94.2 (88.9-97.5)	97.6 (95.4-99.0)
4	27	8	6	117	158	81.8 (64.5-93.0)	93.6 (87.8-97.2)	77.1 (59.9-89.6)	95.1 (89.7-98.2)
Total	294	17	17	684	1012	94.5 (91.4-96.8)	97.6 (96.1-98.6)	94.5 (91.4-96.8)	97.6 (96.1-98.6)

Tabla 4. Evaluaciones clínicas y resultados globales. Valores de verdadero positivo (TP), de falso positivo (FP), falso negativo (FN) y número total de muestras (N). Sensibilidad (Sens), especificidad (Spec), valor predictivo positivo (PPV), valor predictivo negativo (NPV), 95% intervalo de confianza (CI) de CerTest Clostridium difficile antigen GDH.

C. Efecto Hook

CerTest Clostridium difficile antigen GDH no mostró efecto Hook inhibitorio completo a concentraciones mayores de $10^5 \times \text{LoD}$.

D. Reacciones cruzadas

Se llevó a cabo una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas de **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**; no se detectó reacción cruzada con organismos, patógenos, sustancias que podrían causar infecciones:

Reacciones cruzadas										
Virus	Adenovirus	-	Coronavirus	-	Influenza B	-	Norovirus GII	-	Rotavirus	-
	Astrovirus	-	Influenza A	-	Norovirus GI	-	Respiratory Syncytial Virus	-		
Bacteria	Campylobacter coli	-	Clostridium Haemolyticum	-	Helicobacter pylori	-	Salmonella typhimurium	-	Streptococcus pyogenes	-
	Campylobacter jejuni	-	Clostridium Novyi	-	Legionella pneumophila	-	Shigella boydii	-	Yersinia enterocolitica O:3	-
	Clostridium difficile Toxin A	-	Clostridium Tetani	-	Listeria monocytogenes	-	Shigella dysenteriae	-	Yersinia enterocolitica O:9	-
	Clostridium difficile Toxin B	-	Clostridium Septicum	-	Peptostreptococcus anaerobius	-	Shigella flexneri	-		
	Clostridium perfringens	-	Escherichia coli O:157	-	Salmonella enteritidis	-	Shigella sonnei	-		
	Clostridium bifementans	-	Escherichia coli O:026	-	Salmonella paratyphi	-	Staphylococcus aureus	-		
	Clostridium Butyricum	-	Escherichia coli O:111	-	Salmonella typhi	-	Streptococcus pneumococcal	-		
Parásitos	Cryptosporidium Parvum	-	Entamoeba histolytica	-	Giardja lamblia	-				
Otros	Hemoglobina bovina	-	Hemoglobina porcina	-	Lactoferrina bovina	-	Transferrina bovina	-		

Tabla 5. Resultados reacciones cruzadas

Una prueba de especificidad para **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**, concluyó que el test podría detectar los siguientes antígenos: *C. sporogenes* (CECT 485) y *C. botulinium* (CECT 551).

En este ensayo de especificidad, se evaluó *Clostridium sordellii* (ATCC 9714) y no se encontró reactividad cruzada. En algunos estudios de intercomparaciones, **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** tiene una señal positiva con este patógeno, pero no se pudo establecer la naturaleza de este resultado positivo.

E. Interferencias

Se llevó a cabo una evaluación para determinar posibles interferencias de **CerTest Clostridium difficile** antigen GDH; no se detectó interferencia con ninguna de las sustancias probadas:

	Potencial sustancia interferente	Concentración	Resultado	Potencial sustancia interferente	Concentración	Resultado
Exógenos	Metronidazole	3.0 mg/mL	No interferencia	Loperamide hydrochloride (Fortasec)	0.15 mg/mL	No interferencia
	Ampicillin	3.0 mg/mL	No interferencia	Heparin (Hibor)	350.0 IU/mL	No interferencia
	Oseltamivir	0.3 mg/mL	No interferencia	Almagato (Almax)	3.0 mg/mL	No interferencia
	Amantadine	0.3 mg/mL	No interferencia	Fosfamicin (Monuroil)	$3.0 \cdot 10^{-3}$ mg/mL	No interferencia
	Ribavirin	3.0 mg/mL	No interferencia	Acetylcysteine (Fluimucil)	3.0 mg/mL	No interferencia
	Codeine (Toseina)	0.2 mg/mL	No interferencia	Dexketoprofen trometamol (Enantyum)	0.3 mg/mL	No interferencia
	Benzocaine (Angileptol)	0.3 mg/mL	No interferencia	Levofloxacin	3.0 mg/mL	No interferencia
	Cloperastine (Flutox)	0.3 mg/mL	No interferencia	Ciprofloxacin	0.3 mg/mL	No interferencia
	Carbocisteine (Iniston mucolítico)	3.0 mg/mL	No interferencia	Rifampicin (Rifaldin)	0.3 mg/mL	No interferencia
	Loratadine	0.3 mg/mL	No interferencia	Phenoxymethylpenicillin potassium	3.0 mg/mL	No interferencia
	Dexchlorpheniramine (Polaramine)	0.3 mg/mL	No interferencia	Ambroxol hydrochloride (Mucosan)	0.3 mg/mL	No interferencia
	Ebastine (Ebastel)	3.0 mg/mL	No interferencia	Macrogol 3350 (Movicol)	3.0 mg/mL	No interferencia
	Acetyl Salicylic (Adiro)	0.3 mg/mL	No interferencia	Lysine Carbocysteinate (Pectox)	$3.0 \cdot 10^{-2}$ mg/mL	No interferencia
	Ibuprofen (Espidifen)	3.0 mg/mL	No interferencia	Hydroxyzine dihydrochloride	0.3 mg/mL	No interferencia
	Paracetamol (Dolocatil)	5.0 mg/mL	No interferencia	Lorazepam	$3.0 \cdot 10^{-3}$ mg/mL	No interferencia
	Metamizole (Nolotil)	5.0 mg/mL	No interferencia	Amoxicillin	3.0 mg/mL	No interferencia
	Prednisone	0.3 mg/mL	No interferencia	Mercaptopurine	0.3 mg/mL	No interferencia
Omeprazole	$2.0 \cdot 10^{-3}$ mg/mL	No interferencia	Biotine	100.0 µg/mL	No interferencia	

	Potencial sustancia interferente	Concentración	Resultado	Potencial sustancia interferente	Concentración	Resultado
	Naso GEL	0.9 mg/mL	No interferencia	Sore Throat Phenol spray	0.5 mg/mL	No interferencia
	CVS Nasal Spray (Cromolyn)	4 mg/mL	No interferencia	Tobramycin	0.3 mg/mL	No interferencia
	Afrin (Oxymetazoline)	5.0·10 ⁻² mg/mL	No interferencia	Mupirocin	2.5·10 ⁻² mg/mL	No interferencia
	CVS Nasal Drops (Phenylephrine)	10.0 mg/mL	No interferencia	Fluticasone Propionate	5.0·10 ⁻² mg/mL	No interferencia
	ZICAM	1.0 mg/mL	No interferencia	Homeopathic	DIL 1/10	No interferencia
	Phenylpropanolamine	0.3 mg/mL	No interference			
Endógenos	Hemoglobina humana	5.0 µg/mL	No interferencia	Lactoferrina humana	5.0 µg/mL	No interferencia
	Transferrina humana	0.5 µg/mL	No interferencia	Mucina	0.5 %	No interferencia
	Calprotectina humana	5.0 µg/mL	No interferencia	Sangre humana	5.0 %	No interferencia

Tabla 6. Resultados de interferencias

F. Repetibilidad y Reproducibilidad

Tras el estudio de la repetibilidad y reproducibilidad de **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**, realizado con diversas muestras internas, negativas y positivas, no se han observado diferencias dentro de las evaluaciones.

ANEXO 1

KIT 20 CARD CLOSTRIDIUM DIFFICILE ANTIGEN GDH. Referencia: GD820001V

Anexo para la siguiente referencia:

PRODUCTO	REFERENCIA
CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH Card (20 tests kit with stool vials)	GD820001V

Tabla A 1. Referencia para kit de 20 carcacas de CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH.

I. Materiales

MATERIALES SUMINISTRADOS	MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS
<ul style="list-style-type: none"> - 20x CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH (formato card test) - 20x Stool collection tubes (con diluyente) -1x IFU: Instrucciones de uso (incluyendo 1x Quick guide, guía rápida de uso). 	<ul style="list-style-type: none"> - Guantes desechables (otros equipos de protección personal que se consideren necesarios). - Cronómetro. - Recipiente para recogida de muestra.

Tabla A 1.1 Materiales necesarios para la realización del test.

II. Procedimiento (muestras)

Siga las prácticas adecuadas de control de infecciones. Previamente los tests y las muestras se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el **stool collection tube** para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar **CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH** (card test) de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el **stool collection tube**, cortar la punta del tapón (1) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra S (2), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. **Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos. Cualquier resultado leído pasados los 10 minutos se considerará inválido.

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.



Esperar 10 minutos

III. Interpretación de los resultados

(por favor, fíjese en el siguiente dibujo)

CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH		Interpretación de los resultados
1.	NEGATIVO	<p>No hay presencia de <i>Clostridium difficile</i> en la muestra. No hay infección causada por <i>Clostridium difficile</i>.</p> <p>Un resultado negativo debería ser contrastado con otras técnicas de laboratorio para confirmar los resultados.</p>
	VERDE	
2.	POSITIVO	<p>Hay presencia de <i>Clostridium difficile</i> en la muestra. Posible infección causada por <i>Clostridium difficile</i>.</p> <p>La presencia de estas líneas (línea verde de control y roja de test), independientemente de su intensidad debería ser considerada como resultado positivo.</p> <p>Un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas de laboratorio para confirmar los resultados.</p>
	VERDE-ROJO	
3.	INVÁLIDO	<p>Resultado inválido, se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.</p> <p>Cualquier resultado leído tras más de 10 minutos será considerado inválido.</p>
	Cualquier otro resultado	

Tabla A 1.2 Interpretación de los resultados de CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH.

NEGATIVO: Una sola línea de color VERDE aparece en la ventana de resultados del test, en la zona marcada con la letra C (línea de control).

POSITIVO: Además de la línea de control VERDE, también aparece una línea ROJA en la zona marcada con la letra T (línea de test) en la ventana de resultados. El resultado se considerará positivo independientemente de la intensidad de la línea ROJA de test

INVÁLIDO: Cuando la línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezca o no la línea 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 revisarse 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 la línea de color rojo en la línea de test (T) en la ventana 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.

IV. Control de Calidad

CONTROL INTERNO: línea de control

El control interno de funcionamiento viene incluido en la prueba. La línea verde que aparece en la zona de la línea de control (C) en la ventana de resultados es el control interno del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

ANEXO 2

KIT 20 CARD CLOSTRIDIUM DIFFICILE ANTIGEN GDH. Referencia: GD820001VC

Anexo para la siguiente referencia:

PRODUCTO	REFERENCIA
CerTest Clostridium difficile antigen GDH Card (20 tests kit with stool vials + PC)	GD820001VC

Tabla A 2. Referencia para kit de 20 carcacas de CerTest Clostridium difficile antigen GDH con control positivo.

I. Materiales

MATERIALES SUMINISTRADOS	MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS
<ul style="list-style-type: none"> - 20x CerTest Clostridium difficile antigen GDH (formato card test) - 20x Stool collection tubes (con diluyente) - 1x CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control - 1x Testing tube - 1x Disposable pipette - 1x IFU: Instrucciones de uso (incluyendo 1x Quick guide, guía rápida de uso). 	<ul style="list-style-type: none"> - Guantes desechables (otros equipos de protección personal que se consideren necesarios). - Cronómetro. - Recipiente para recogida de muestra.

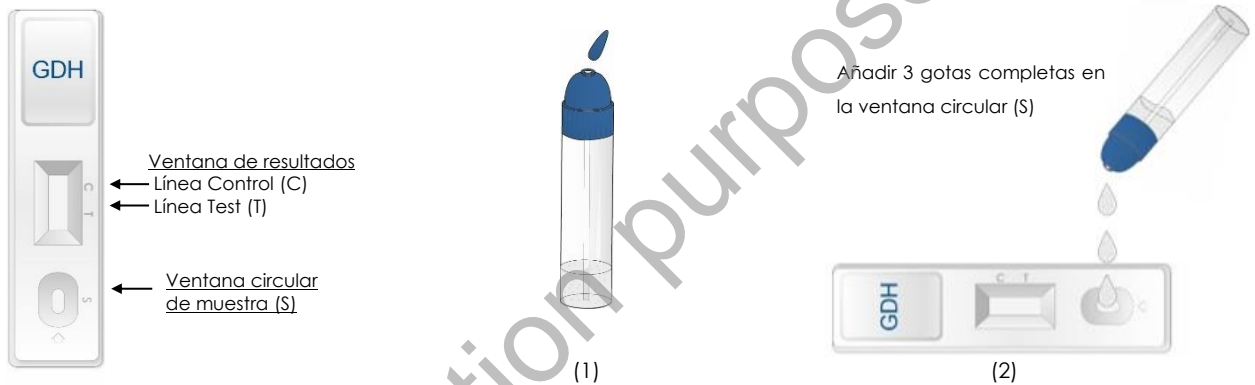
Tabla A 2.1 Materiales necesarios para la realización del test.

II. Procedimiento (muestras)

Siga las prácticas adecuadas de control de infecciones. Previamente los tests y las muestras se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el **stool collection tube** para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** (card test) de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el **stool collection tube**, cortar la punta del tapón (1) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra S (2), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. **Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos. Cualquier resultado leído pasados los 10 minutos se considerará inválido.

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.



Esperar 10 minutos

III. Interpretación de los resultados

(por favor, fíjese en el siguiente dibujo)

	CerTest Clostridium difficile antigen GDH		Interpretación de los resultados
1.	NEGATIVO		No hay presencia de <i>Clostridium difficile</i> en la muestra. No hay infección causada por <i>Clostridium difficile</i> .
	VERDE		Un resultado negativo debería ser contrastado con otras técnicas de laboratorio para confirmar los resultados.


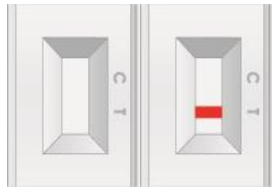
CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH			Interpretación de los resultados
2.	POSITIVO		Hay presencia de <i>Clostridium difficile</i> en la muestra. Posible infección causada por <i>Clostridium difficile</i> .
	VERDE-ROJO		La presencia de estas líneas (línea verde de control y roja de test), independientemente de su intensidad debería ser considerada como resultado positivo. Un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas de laboratorio para confirmar los resultados.
3.	INVÁLIDO		Resultado inválido, se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.
	Cualquier otro resultado		Cualquier resultado leído tras más de 10 minutos será considerado inválido.

Tabla A 2.2 Interpretación de los resultados de CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH.

NEGATIVO: Una sola línea de color VERDE aparece en la ventana de resultados del test, en la zona marcada con la letra C (línea de control).

POSITIVO: Además de la línea de control VERDE, también aparece una línea ROJA en la zona marcada con la letra T (línea de test) en la ventana de resultados. El resultado se considerará positivo independientemente de la intensidad de la línea ROJA de test

INVÁLIDO: Cuando la línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezca o no la línea 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 revisarse 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 la línea de color rojo en la línea de test (T) en la ventana 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.

IV. Control de Calidad

CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH (card test) presenta dos controles:

CONTROL INTERNO: línea de control

Control interno: El control interno de funcionamiento viene incluido en la prueba. La línea verde que aparece en la zona de la línea de control (C) en la ventana de resultados es el control interno del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

CONTROL EXTERNO: HISOPO CONTROL POSITIVO**Control externo: CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control.****A. Control Externo. CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** (hisopo control positivo).

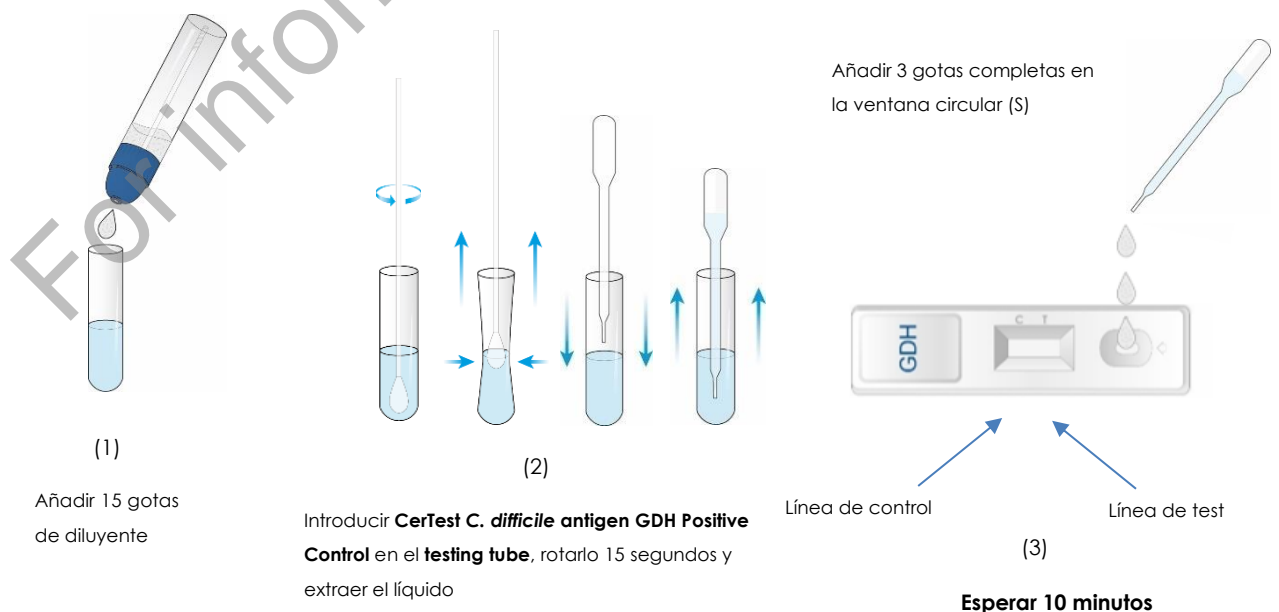
CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control es un control de calidad externo para **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**. **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** se debe usar para evaluar que los reactivos y el funcionamiento del test son adecuados.

Debe ser almacenado entre 2-30°C en su envase original sellado, **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** es estable hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** no debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

A.1 Procedimiento de uso del Control Positivo

Previamente los tests y **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir el envase hasta el momento de la prueba.

1. Añadir 15 gotas (1) de diluyente del **stool collection tube** en el **testing tube** e inmediatamente introducir **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control**.
2. Mezclar la solución rotando **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** contra las paredes del **testing tube** al menos 15 segundos. Extraer la máxima cantidad de líquido de **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control**, presionándolo contra las paredes del **testing tube** mientras se retira (2). Desechar **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control**.
3. Sacar **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** (card test) de su envase sellado antes de utilizarlo.
4. Usar una **disposable pipette** diferente para cada control. Dispensar 3 gotas desde el **testing tube** en la ventana circular marcada con la letra S (3).
5. **Leer el resultado a los 10 minutos**. No leer el resultado superados los 10 minutos. Cualquier resultado leído pasados los 10 minutos se considerará inválido.



Los controles positivos deberían usarse cada vez que se utilice un nuevo kit o según indiquen los controles establecidos por su laboratorio para los procedimientos de control de calidad.

A.1.1 Interpretación del procedimiento del control positivo


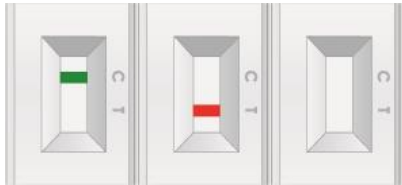
CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control			Interpretación de los resultados
1.	POSITIVO		Aparecerán una línea VERDE (línea de control (C)) y una línea ROJA (línea de test (T)) en la ventana de resultados durante el desarrollo del test debido a la presencia de antígenos de <i>Clostridium difficile</i> en CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control .
	VERDE-ROJO		
2.	INVÁLIDO		<p>Cuando la línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezca o no la línea de test (ROJA), o si sólo aparece la línea de control (VERDE). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisarse el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test y un nuevo CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control.</p> <p>Si la situación se repitiera, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor.</p> <p>Cualquier resultado leído tras más de 10 minutos será considerado inválido.</p>
	Cualquier otro resultado		

Tabla A 2.3 Interpretación de los resultados de CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control.

ANEXO 3

KIT 20 CARD CLOSTRIDIUM DIFFICILE ANTIGEN GDH. Referencia: GD820001VCC

Anexo para la siguiente referencia:

PRODUCTO	REFERENCIA
CerTest Clostridium difficile antigen GDH Card (20 tests kit with stool vials + PC + NC)	GD820001VCC

Tabla A 3. Referencia para kit 20 carcassas de CerTest Clostridium difficile antigen GDH con controles positivo y negativo.

I. Materiales

MATERIALES SUMINISTRADOS	MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS
<ul style="list-style-type: none"> - 20x CerTest Clostridium difficile antigen GDH (formato card test) - 20x Stool collection tubes (con diluyente) -1x CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control -1x CerTest Negative Control -2x Testing tube -2x Disposable pipette -1x IFU: Instrucciones de uso (incluyendo 1x Quick guide, guía rápida de uso). 	<ul style="list-style-type: none"> - Guantes desechables (otros equipos de protección personal que se consideren necesarios). - Cronómetro. - Recipiente para recogida de muestra.

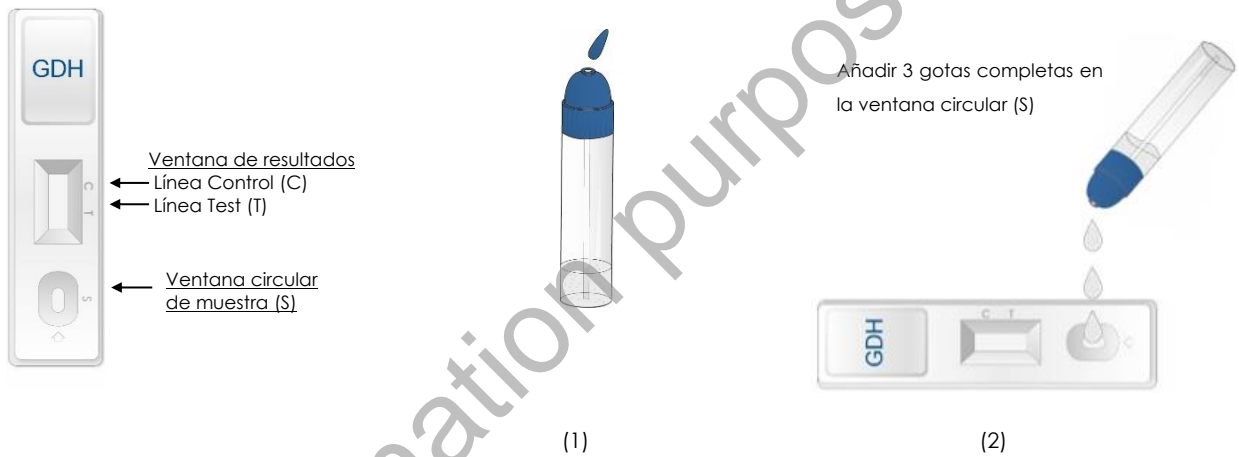
Tabla A 3.1 Materiales necesarios para la realización del test.

II. Procedimiento (muestras)

Siga las prácticas adecuadas de control de infecciones. Previamente los tests y las muestras se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el **stool collection tube** para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** (card test) de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el **stool collection tube**, cortar la punta del tapón (1) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra S (2), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. **Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos. Cualquier resultado leído pasados los 10 minutos se considerará inválido.


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.



Esperar 10 minutos

III. Interpretación de los resultados

(por favor, fíjese en el siguiente dibujo)

	CerTest Clostridium difficile antigen GDH		Interpretación de los resultados
1.	NEGATIVO		No hay presencia de <i>Clostridium difficile</i> en la muestra. No hay infección causada por <i>Clostridium difficile</i> .
	VERDE		Un resultado negativo debería ser contrastado con otras técnicas de laboratorio para confirmar los resultados.
2.	POSITIVO		


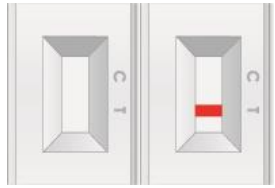
CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH		Interpretación de los resultados
VERDE-ROJO		<p>Hay presencia de <i>Clostridium difficile</i> en la muestra. Posible infección causada por <i>Clostridium difficile</i>.</p> <p>La presencia de estas líneas (línea verde de control y roja de test), independientemente de su intensidad debería ser considerada como resultado positivo.</p> <p>Un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas de laboratorio para confirmar los resultados.</p>
3. INVÁLIDO		<p>Resultado inválido, se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.</p> <p>Cualquier resultado leído tras más de 10 minutos será considerado inválido.</p>
Cualquier otro resultado		

Tabla A 3.2 Interpretación de los resultados de CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH.

NEGATIVO: Una sola línea de color VERDE aparece en la ventana de resultados del test, en la zona marcada con la letra C (línea de control).

POSITIVO: Además de la línea de control VERDE, también aparece una línea ROJA en la zona marcada con la letra T (línea de test) en la ventana de resultados. El resultado se considerará positivo independientemente de la intensidad de la línea ROJA de test

INVÁLIDO: Cuando la línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezca o no la línea 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 revisarse 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 la línea de color rojo en la línea de test (T) en la ventana 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.

IV. Control de Calidad

CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH (card test) presenta tres controles:

CONTROL INTERNO: línea de control

Control interno: El control interno de funcionamiento viene incluido en la prueba. La línea verde que aparece en la zona de la línea de control (C) en la ventana de resultados es el control interno del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

CONTROLES EXTERNOS: HISOPO CONTROL POSITIVO E HISOPO CONTROL NEGATIVO

Control positivo externo: CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control (hisopo control positivo).

Control negativo externo: CerTest Negative Control (hisopo control negativo).

A. Control positivo externo. CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control

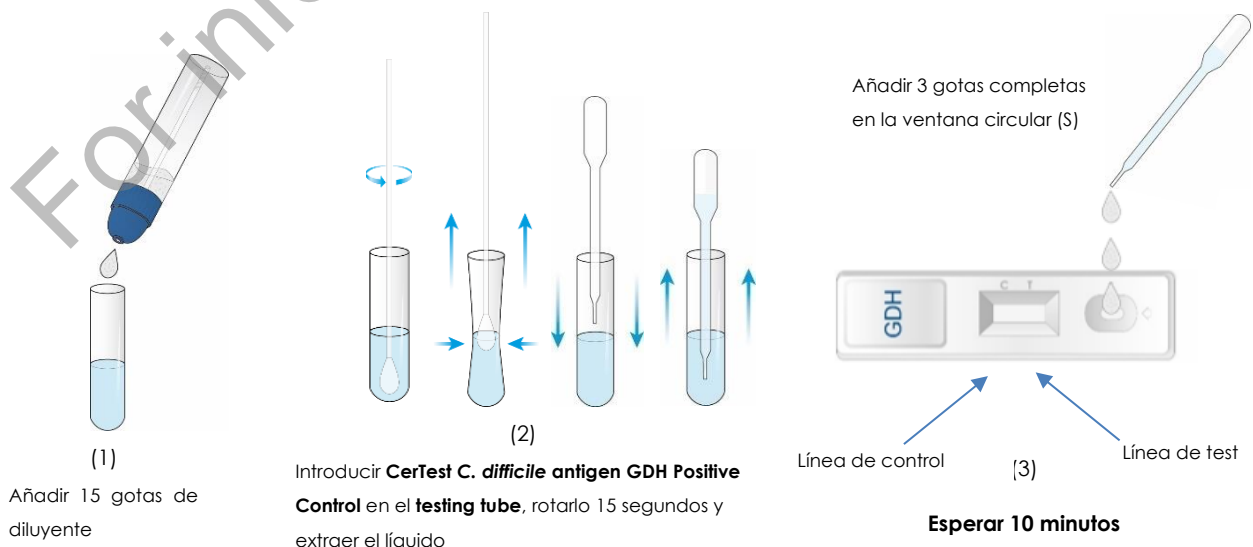
CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control es un control de calidad externo para **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**. **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** se debe usar para evaluar que los reactivos y el funcionamiento del test son adecuados.

Debe ser almacenado entre 2-30°C en su envase original sellado, **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** es estable hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** no debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

A.1 Procedimiento de uso del Control Positivo

Previamente los tests y **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir el envase hasta el momento de la prueba.

1. Añadir 15 gotas (1) de diluyente del **stool collection tube** en el **testing tube** e inmediatamente introducir **CerTest Clostridium difficile antigen GDH**.
2. Mezclar la solución rotando **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** contra las paredes del **testing tube** al menos 15 segundos. Extraer la máxima cantidad de líquido de **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control**, presionándolo contra las paredes del **testing tube** mientras se retira (2). Desechar **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control**.
3. Sacar el **CerTest Clostridium difficile antigen GDH** (card test) de su envase sellado antes de utilizarlo.
4. Usar una **disposable pipette** diferente para cada control. Dispensar 3 gotas desde el **testing tube** en la ventana circular marcada con la letra S (3).
5. **Leer el resultado a los 10 minutos**. No leer el resultado superados los 10 minutos. Cualquier resultado leído pasados los 10 minutos se considerará inválido.



Los controles positivos deberían usarse cada vez que se utilice un nuevo kit o según indiquen los controles establecidos por su laboratorio para los procedimientos de control de calidad.

A.1.1 Interpretación del procedimiento del control positivo


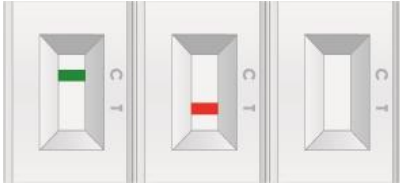
	CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control		Interpretación de los resultados
1.	POSITIVO VERDE-ROJO		Aparecerán una línea VERDE (línea de control (C)) y una línea ROJA (línea de test (T)) en la ventana de resultados durante el desarrollo del test debido a la presencia de antígenos de <i>Clostridium difficile</i> en CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control .
2.	INVÁLIDO Cualquier otro resultado		Cuando la línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezca o no la línea de test (ROJA), o si sólo aparece la línea de control (VERDE). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisarse el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test y un nuevo CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control . Si la situación se repitiera, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor. Cualquier resultado leído tras más de 10 minutos será considerado inválido.

Tabla A 3.3 Interpretación de los resultados de CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control.

B. Control negativo externo. CerTest Negative Control

CerTest Negative Control es un control de calidad externo para **CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH** (card test). **CerTest Negative Control** se debe usar para evaluar que los reactivos y el funcionamiento del test son adecuados.

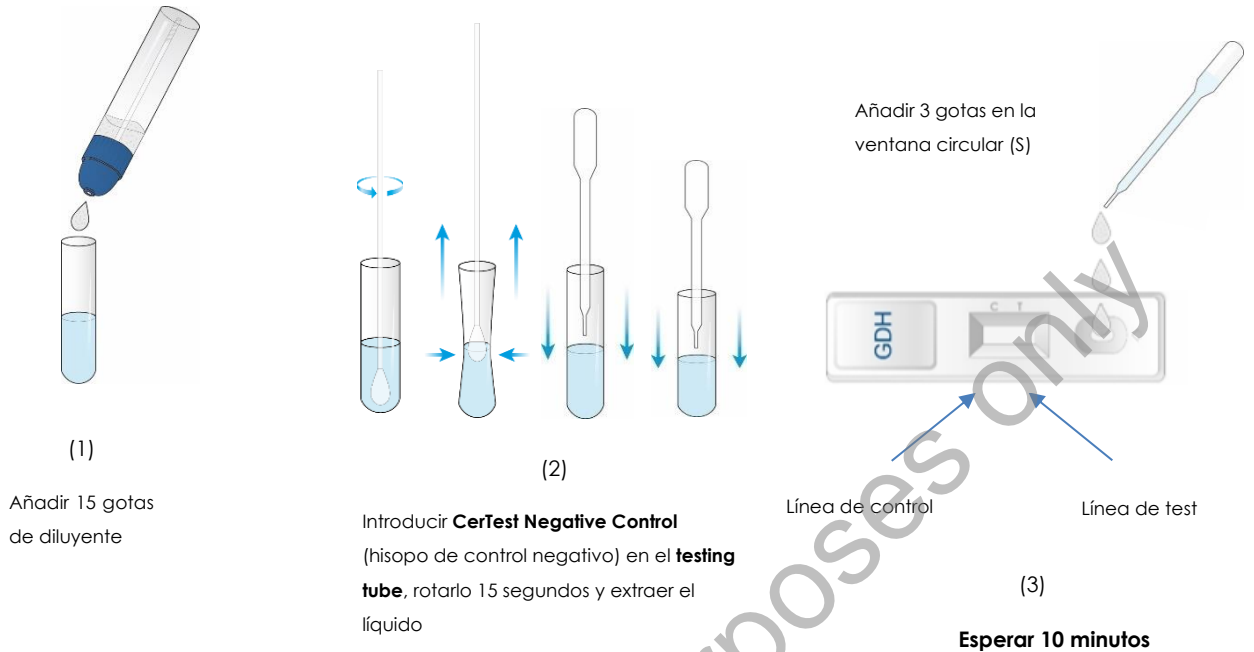
Debe ser almacenado entre 2-30°C en su envase original sellado, **CerTest Negative Control** es estable hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. **CerTest Negative Control** no debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

B.1 Procedimiento de uso del Control Negativo

Previamente los tests y CerTest Negative Control se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir el envase hasta el momento de la prueba.

1. Añadir 15 gotas (1) del diluyente del **stool collection tube** en el **testing tube** e inmediatamente introducir **CerTest Negative Control**.
2. Mezclar la solución rotando **CerTest Negative Control** contra las paredes del **testing tube** al menos 15 segundos. Extraer la máxima cantidad del líquido de **CerTest Negative Control** presionándolo contra las paredes del **testing tube** mientras se retira. Desechar **CerTest Negative Control**.
3. Sacar **CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH** (card test) de su envase sellado antes de utilizarlo.

4. Usar una **disponible pipette** y un test diferente para cada control. Añadir 3 gotas a partir del **testing tube** en la correspondiente ventana circular (3).
5. **Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos.



El control negativo debería usarse cada vez que se utilice un nuevo kit o según indiquen los controles establecidos por su laboratorio para los procedimientos de control de calidad.

B.1.1. Interpretación del procedimiento del control negativo














CerTest Negative Control		Interpretación de los resultados
1.	RESULTADO VÁLIDO	Solo aparecerá una línea VERDE (línea de control (C)) en la ventana de resultados durante el desarrollo del test.
	VERDE (solo debe aparecer la línea de control)	
2.	INVÁLIDO	Cuando la línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezca o no la línea de test (ROJA), o aparecen ambas líneas (línea ROJA de test y línea VERDE de control). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisarse el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test y un nuevo CerTest Negative Control . Si la situación se repitiera, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor. Cualquier resultado leído tras más de 10 minutos será considerado inválido.
	Cualquier otro resultado	

Tabla A 3.4 Interpretación de los resultados de CerTest Negative Control.

11. Reference/Bibliografía

1. D. Rodríguez-Pardo et al. **Infecciones producidas por Clostridium difficile**. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2013, 31(4): 254-263.
2. Fitzsimmons. **Independent evaluation of a GDH enzyme immunoassay for C. difficile screening**. *Biomed Sci.* 2011;(October):698–700.
3. Vaishnavi C. **Clinical spectrum & pathogenesis of Clostridium difficile associated diseases**. *Indian J Med Res.* 2010;131(4):487–99.
4. Wren MWD, Sivapalan M, Kinson R, Shetty NP. **An evaluation of tests for faecal toxin , glutamate dehydrogenase , lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory**. *Br J Biomed Sci.* 2009;66(1):1–5.
5. Ofori E, Ramai D, Dhawan M, Mustafa F, Gasperino J, Reddy M. **Community-acquired Clostridium difficile: epidemiology, ribotype, risk factors, hospital and intensive care unit outcomes, and current and emerging therapies**. *J Hosp Infect.* 2018;99(4):436–42.
6. Guh AY, Mu Y, Winston LG, Johnston H, Olson D, Farley MM, et al. **Trends in U.S. Burden of Clostridioides difficile Infection and Outcomes**. *N Engl J Med.* 2021;382(14):1320–30.
7. Services U. D of H and H. **Antibiotic resistance threats in the United States**. *Centers Dis Control Prev.* 2019;1–113.

12. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

	In vitro diagnostic device / Producto para diagnóstico in vitro		Contains <n> test/ Contiene <n> test		Catalogue number/ Número de referencia		Keep dry/ Almacenar en lugar seco
	Consult instructions for use/ Consultar las instrucciones de uso		Batch code/ Número de lote		Use by (yyyy-mm: year and month)/ Fecha de caducidad (yyyy-mm: año y mes)		Temperature limitation/ Limitación de temperatura
	Only one use/ No reutilizar		Manufacture/ Fabricante	DIL	Sample diluent/ Diluyente de muestra		CE marking/ Marcado CE
	Positive Control/ Control positivo		Negative Control/ Control negativo				



CerTest Rapid Test

CerTest
BIOTEC

For information purposes only



CerTest Rapid Test

CerTest
BIOTEC



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | rapidtest@certest.es

www.certest.es

One step ahead

For information purposes only

F-616 rev.01