

CerTest Rapid Test

CerTest
BIOTEC

CerTest **GDH+Lactoferrin**

ONE STEP *C. difficile* antigen GDH and
Lactoferrin COMBO CARD TEST

CE 

The test should be used by professional trained in IVD devices

For information purposes only



These instructions for use apply to the following references:

GF882001VF; GF882001VFC; GF882001VFCC

Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

GF882001VF; GF882001VFC; GF882001VFCC

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 GDH+LACTOFERRIN (SEE ANNEX 1) /
KIT DE 20 CARCASAS DE GDH+LACTOFERRIN (VER ANEXO 1)**

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
CerTest GDH+Lactoferrin Combo Card (20 tests kit with stool vials)	GF882001VF

Table A 1. Reference for kit 20 combo card of CerTest GDH+Lactoferrin/ Referencia para kit de 20 carcassas de CerTest GDH+Lactoferrin.

**KIT 20 CARD GDH+LACTOFERRIN WITH POSITIVE CONTROL (SEE ANNEX 2) /
KIT DE 20 CARCASAS DE GDH+LACTOFERRIN CON CONTROL POSITIVO (VER ANEXO 2)**

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
CerTest GDH+Lactoferrin Combo Card (20 tests kit with stool vials + PC)	GF882001VFC

Table A 2. Reference for kit 20 combo card of CerTest GDH+Lactoferrin with positive control / Referencia para kit de 20 carcassas de CerTest GDH+Lactoferrin con control positivo.

**KIT 20 CARD GDH+LACTOFERRIN WITH POSITIVE AND NEGATIVE CONTROL (SEE ANNEX 3) /
KIT DE 20 CARCASAS DE GDH+LACTOFERRIN CON CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVO (VER ANEXO 3)**

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
CerTest GDH+Lactoferrin Combo Card (20 tests kit with stool vials + PC + NC)	GF882001VFCC

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

1. Quick Guide/Guía rápida

Quick Guide

CerTest GDH+Lactoferrin



1

Ref. GF882001VF

(x20) (x20) (x20)

Ref. GF882001VFC

C+ (x2) + (x2)

Ref. GF882001VFCC

C- + (x2)

C+ (x2) + (x3)

88:88:88

+

2a Procedure for GDH

2b Procedure for Lactoferrin

3a

3b

4 88:10:00 10'

5

F-597 rev00

This is a quick guide, for the correct use of the test, read the instructions for use/
 Esto es una guía rápida, para el correcto uso del test, lea las instrucciones de uso.

QG-GF882001VF-VFC-VFCC-en-es-1121

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	9
6. Precautions for users	9
7. Specimen collection and preparation	10
8. Limitations of the test	11
9. Expected values	12
10. Performance characteristics	13
A. Analytical sensitivity (detection limit)	13
B. Clinical sensitivity and specificity	13
C. Hook Effect	15
D. Cross Reactivity	15
E. Interferences	16
F. Repeatability and Reproducibility	18
ANNEX 1	19
I. Materials	19
II. Test procedures (samples)	19
III. Interpretation of results	20
IV. Quality control	22
ANNEX 2	23
I. Materials	23
II. Test procedures (samples)	23
III. Interpretation of results	24
IV. Quality control	26
A. External positive controls	26
1. CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control	26
1.1. Positive control procedure	26

2. CerTest Lactoferrin Positive Control	27
2.1 Positive control procedure	27
A.1 Interpretation positive control procedure	28
ANNEX 3	30
I. Materials.....	30
II. Test procedures (samples)	30
III. Interpretation of results	31
IV. Quality control.....	32
A. External positive controls	32
1. CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control	33
1.1. Positive control procedure	33
2. CerTest Lactoferrin Positive Control	34
2.1 Positive control procedure	34
A.1 Interpretation positive control procedure	35
B. External negative control. CerTest Negative Control	36
B.1 Negative control procedure.....	36
B.1.1 Interpretation negative control procedure.....	39
ESPAÑOL	
2. Uso previsto.....	40
3. Introducción y explicación	40
4. Fundamento del test	41
5. Condiciones de almacenamiento.....	42
6. Precauciones para el usuario	42
7. Recogida de muestras y preparación.....	43
8. Limitaciones del test.....	45
9. Valores esperados.....	46
10. Características del test	46
A. Sensibilidad analítica (límite de detección)	46
B. Sensibilidad y especificidad clínica	46
C. Efecto Hook	48
D. Reacciones cruzadas	48
E. Interferencias.....	50
F. Repetibilidad y Reproducibilidad.....	52

ANEXO 1.....	53
I. Materiales	53
II. Procedimiento (muestras)	53
III. Interpretación de los resultados	54
IV. Control de Calidad.....	56
ANEXO 2.....	57
I. Materiales	57
II. Procedimiento (muestras)	57
III. Interpretación de los resultados	58
IV. Control de Calidad.....	60
A. Controles positivos externos	60
1. CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control	60
1.1. Procedimiento de uso de Control Positivo	61
2. CerTest Lactoferrin Positive Control	61
2.1. Procedimiento de uso de Control Positivo	62
A.1 Interpretación del procedimiento del control positivo.....	62
ANEXO 3.....	64
I. Materiales	64
II. Procedimiento (muestras)	64
III. Interpretación de los resultados	65
IV. Control de Calidad.....	67
A. Controles positivos externos	67
1. CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control	67
1.1. Procedimiento de uso de Control Positivo	68
2. CerTest Lactoferrin Positive Control	68
2.1. Procedimiento de uso de Control Positivo	69
A.1 Interpretación del procedimiento del control positivo.....	70
B. Control negativo externo. CerTest Negative Control	71
B.1 Procedimiento de uso del Control Negativo	71
B.1.1 Interpretación del procedimiento del control negativo	73

ENGLISH/ESPAÑOL

11. Reference/Bibliografía.....	75
12. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro	75

ENGLISH

2. Intended use

CerTest GDH+Lactoferrin one step combo card test is a coloured chromatographic immunoassay for the simultaneous qualitative detection of *Clostridium difficile* Glutamate Dehydrogenase (GDH) and human lactoferrin (hLf) in stool samples.

CerTest GDH+Lactoferrin combo card test offers a simple and highly sensitive screening assay to make a presumptive diagnosis of *Clostridium difficile* infection and intestinal inflammation presence.

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).

Lactoferrin is a glycoprotein component of neutrophil secondary granules, a primary component of the acute inflammatory response and is released from faecal leukocytes. This protein is resistant to proteolysis in the faeces and may serve as a marker of inflammation in the intestine. The major cause of faecal neutrophils in

patients with chronic diarrhoea is chronic inflammatory bowel disease of the colon (i.e., Crohn's Disease and ulcerative colitis). Lactoferrin has been also studied as a predictor of infection with invasive enteropathogens in children with diarrhoea. Bacterial inflammatory diarrhoea may be caused by *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* and *Clostridium difficile* (6,7).

4. Test principle

CerTest GDH+Lactoferrin is based on the principle of a qualitative immunochromatographic assay for the qualitative detection of *Clostridium difficile* Glutamate Dehydrogenase (GDH) and human lactoferrin in human stool samples from patients suspected of *Clostridium difficile* infection and intestinal inflammation presence.

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

Strip B consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against human lactoferrin 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-human lactoferrin) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming two coloured conjugate complexes.

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

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

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

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 the **CerTest GDH+Lactoferrin**. 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 kits are for single use. Do not reuse.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves or other personal protective equipment such as googles 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 GDH+Lactoferrin** 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 requested 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.

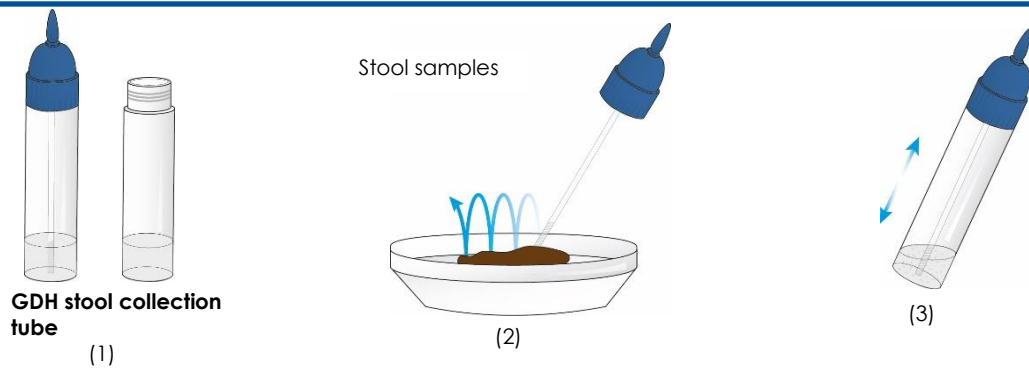
If this is not possible, stool samples could be stored in the refrigerator (2-8°C) for a maximum of 7 days. For longer storage, maximum 1 year, the specimen must be kept frozen (-20°C). In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Ensure only the amount needed is thawed because of freezing and defrosting cycles are not recommended. Homogenise stool samples as thoroughly as possible prior to preparation.

Please take note that there are two different stool collection tubes:

a. GDH stool collection tubes

Specimen preparation (see illustration):

1. Take out the cap of the **GDH 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 **GDH stool collection tube**. For liquid samples, add approx. 125 µL in the **GDH stool collection tube** using a micropipette.
2. Close the **GDH stool collection tube**. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (3).

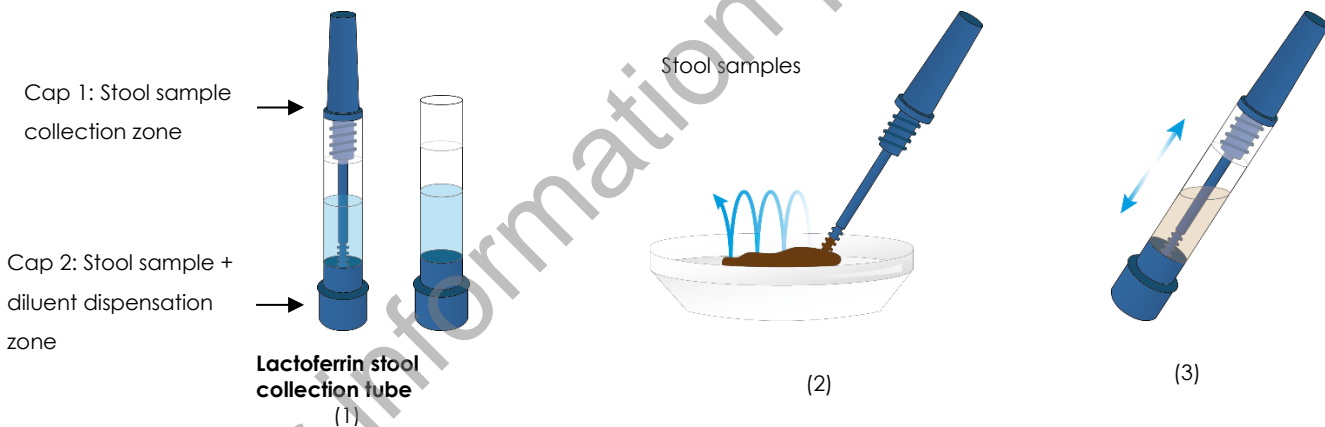


Continue immediately with the test procedure. See Annexes. Each sample vial (containing the sample) and cassette with which will be tested that sample should be perfectly recognizable including patient's identification.

b. Lactoferrin stool collection tubes

Specimen preparation (see illustration):

1. Take out the cap 1 of the **Lactoferrin 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. 20 mg) and add it to the **Lactoferrin stool collection tube**. For liquid samples, add approx. 20 μL in the **Lactoferrin stool collection tube** using a micropipette.
2. Close the **Lactoferrin 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 GDH+Lactoferrin** should be used only with samples from human faeces. The use of other samples has not been established. The quality of the test depends on the quality of the sample; proper faecal specimens must be obtained.
- 5) Positive results determine the presence of GDH of *Clostridium difficile* and human lactoferrin in faecal samples. A positive result should be followed up with additional laboratory techniques (toxigenic culture) to determine the strain of *Clostridium difficile*. 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 GDH of *Clostridium difficile* and/or human lactoferrin concentration in the stool sample is lower than the detection limit value or cut-off value. If the symptoms or situation persist, a *Clostridium difficile* determination should be carried out, on a sample from an enrichment culture.
- 7) Lactoferrin is a component of breast milk; the test will be positive in breast fed children and should not be used to evaluate neonates receiving breast milk.
- 8) Stool from patients with active inflammatory bowel diseases that usually involve significant neutrophilic inflammation of the intestine, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, would be positive for faecal lactoferrin.
- 9) Bloody stool samples can contain components that may cause non-specific reactions in the test. Every bloody stool samples whose result is positive should be followed up with other techniques of diagnosis to confirm the result.
- 10) 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 (4,5,8).

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 (8).

Some studies established equal or higher 10 µg hLf/g faeces as cut-off value to allow to detect adult patients with gastrointestinal inflammatory pathology that will require to diagnosis additional diagnostic invasive procedures(6).

10. Performance characteristics

A. Analytical sensitivity (detection limit)

Detection limit value (LoD) of **CerTest GDH+Lactoferrin** is 0.39 ng/mL of *Clostridium difficile* antigen GDH and 100 ng/mL (10 µg hLf/ g faeces) of human lactoferrin.

There is not any external standard approved as a general and reference standard. The internal standard used for validation of this CerTest products are purified *Clostridium difficile* Glutamate dehydrogenase recombinant protein and human lactoferrin.

B. Clinical sensitivity and specificity

B.1 Clinical sensitivity and specificity -GDH

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

For Strip A: GDH

IC test: CerTest GDH+Lactoferrin (Strip A: GDH)	Evaluation criteria		
	+	-	Total
+	86	1	87
-	3	160	163
Total	89	161	250

Table 1 CerTest GDH+Lactoferrin (strip A: GDH) performance versus evaluation criteria.

CerTest GDH+Lactoferrin (Strip A: 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 GDH+Lactoferrin (strip A: GDH) clinical results.

B.2 Clinical sensitivity and specificity -Lactoferrin

An internal retrospective evaluation (Hospital Clinico Lozano Blesa, Zaragoza) with frozen stool samples was performed using **CerTest GDH+Lactoferrin (strip B: Lactoferrin)** versus ELISA test. The ELISA technique has been considered the gold standard. This is the evaluation criteria. The results were as follows:

For Strip B: Lactoferrin

Data for cut-off value 10µg hLf/g:

IC test: CerTest GDH+Lactoferrin (strip B: Lactoferrin)	Evaluation criteria			
		+	-	Total
	+	27	13	40
	-	3	47	50
	Total	30	60	90

Table 3 CerTest GDH+Lactoferrin (Strip B: Lactoferrin) performance versus evaluation criteria.

CerTest GDH+Lactoferrin (strip B: Lactoferrin) vs Evaluation criteria		
	Mean Value	95% confidence interval
Sensitivity	90.0%	73.5-97.9%
Specificity	78.3%	65.8-87.9%
PPV	67.5%	50.9-81.4%
NPV	94.0%	83.5-98.7%

Table 4 CerTest GDH+Lactoferrin (strip B: Lactoferrin) clinical results.

Specificity for a cut-off value of 2.5 µg hLf/g: 100.0% (mean value); 83.9-100.0% (95% confidence interval).

The most recent external retrospective evaluation performed to the test (with frozen stool samples) showed the following results:

- **GDH:** sensitivity 96.6% (95% confidence interval: 90.5-99.3%) and specificity 99.4% (95% confidence interval: 96.6-100.0%).
- **Lactoferrin:** Sensitivity 90.0%, (95% confidence interval: 73.5-97.9%) and specificity 78.3% (95% confidence interval: 65.8-87.9%).

The results showed a high sensitivity and specificity to detect *Clostridium difficile* antigen GDH and/or human lactoferrin using **CerTest GDH+Lactoferrin**.

For Strip A: GDH

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

Table 5 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 6 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 GDH+Lactoferrin (strip A: GDH).

C. Hook Effect

CerTest GDH+Lactoferrin does not show inhibitory hook effect at concentration higher than $10^5 \times \text{LoD}$ for *Clostridium difficile* antigen GDH and higher than $10^3 \times \text{LoD}$ for human lactoferrin.

D. Cross Reactivity

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

For Strip A: GDH

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

Table 7 Cross reactivity results (GDH).

A specificity assay was performed for **CerTest GDH+Lactoferrin (strip A: GDH)**. This concluded that the test, could detect 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 GDH+Lactoferrin (strip A: GDH)** have a positive signal with this pathogen, but the nature of this positive result could not be established.

For Strip B: Lactoferrin

Cross reactivity										
Virus	Adenovirus	-	Coronavirus	-	Influenza B	-	Norovirus GII	-	Rotavirus	-
	Astrovirus	-	Influenza A	-	Norovirus GI	-	Respiratory Syncytial Virus	-		
Bacteria	<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Escherichia coli</i> O:157	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Shigella boydii</i>	-	<i>Streptococcus pneumococcal</i>	-
	<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH	-	<i>Escherichia coli</i> O:026	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A	-	<i>Escherichia coli</i> O:111	-	<i>Salmonella paratyphi</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	-
	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B	-	<i>Helicobacter pylori</i>	-	<i>Salmonella typhi</i>	-	<i>Shigella sonnei</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	-
Parasites	<i>Cryptosporidium Parvum</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-		
Others	Pig haemoglobin	-	Bovine haemoglobin	-	Bovine lactoferrin	-	Bovine transferrin	-		

Table 8 Cross reactivity results (Lactoferrin).

E. Interferences

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

For Strip A: GDH

	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 (Hibor)	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)	3.0·10 ⁻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

	Potencial interfering substance	Concentration	Results	Potencial interfering substance	Concentration	Results
	Cloperastine (<i>Flutox</i>)	0.3 mg/mL	No interference	Ciprofloxacin	0.3 mg/mL	No interference
	Carbocisteine (<i>Iniston mucolítico</i>)	3.0 mg/mL	No interference	Rifampicin (<i>Rifaldin</i>)	0.3 mg/mL	No interference
	Loratadine	0.3 mg/mL	No interference	Phenoxymethylpenicillin potassium	3.0 mg/mL	No interference
	Dexchloropheniramine (<i>Polaramine</i>)	0.3 mg/mL	No interference	Ambroxol hydrochloride (<i>Mucosan</i>)	0.3 mg/mL	No interference
	Ebastine (<i>Ebastel</i>)	3.0 mg/mL	No interference	Macrogol 3350 (<i>Movicol</i>)	3.0 mg/mL	No interference
	Acetyl Salicylic (<i>Adiro</i>)	0.3 mg/mL	No interference	Lysine Carbocysteinate (<i>Pectox</i>)	$3.0 \cdot 10^{-2}$ mg/mL	No interference
	Ibuprofen (<i>Espidifen</i>)	3.0 mg/mL	No interference	Hydroxyzine dihydrochloride	0.3 mg/mL	No interference
	Paracetamol (<i>Dolocafil</i>)	5.0 mg/mL	No interference	Lorazepam	$3.0 \cdot 10^{-3}$ mg/mL	No interference
	Metamizole (<i>Nolofil</i>)	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	0.10 mg/mL	No interference
	Naso GEL	0.9 mg/mL	No interference	Sore Throat Phenol spray	0.5 mg/mL	No interference
	CVS Nasal Spray (<i>Cromolyn</i>)	4 mg/mL	No interference	Tobramycin	0.3 mg/mL	No interference
	Afrin (<i>Oxymetazoline</i>)	$5.0 \cdot 10^{-2}$ mg/mL	No interference	Mupirocin	$2.5 \cdot 10^{-2}$ mg/mL	No interference
	CVS Nasal Drops (<i>Phenylephrine</i>)	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
	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 9 GDH interferences results.

For Strip B: Lactoferrin

	Potencial interfering substance	Concentration	Results	Potencial interfering substance	Concentration	Results
Exogenous	Metronidazole	3.0 mg/mL	No interference	Loperamide hydrochloride (<i>Fortasec</i>)	0.15 mg/mL	No interference
	Ampicillin	3.0 mg/mL	No interference	Heparin (<i>Hibor</i>)	350.0 IU/mL	No interference
	Oseltamivir	0.3 mg/mL	No interference	Almagato (<i>Almax</i>)	3.0 mg/mL	No interference
	Amantadine	0.3 mg/mL	No interference	Fosfamicin (<i>Monurol</i>)	$3.0 \cdot 10^{-3}$ mg/mL	No interference
	Ribavirin	3.0 mg/mL	No interference	Acetylcysteine (<i>Fluimucil</i>)	3.0 mg/mL	No interference

	Potencial interfering substance	Concentration	Results	Potencial interfering substance	Concentration	Results
	Codeine (<i>Toseina</i>)	0.2 mg/mL	No interference	Dexketoprofen trometamol (<i>Enantyum</i>)	0.3 mg/mL	No interference
	Benzocaine (<i>Angleptol</i>)	0.3 mg/mL	No interference	Levofloxacin	3.0 mg/mL	No interference
	Cloperastine (<i>Flutox</i>)	0.3 mg/mL	No interference	Ciprofloxacin	0.3 mg/mL	No interference
	Carbocisteine (<i>Iniston mucolítico</i>)	3.0 mg/mL	No interference	Rifampicin (<i>Rifaldin</i>)	0.3 mg/mL	No interference
	Loratadine	0.3 mg/mL	No interference	Phenoxymethylpenicillin potassium	3.0 mg/mL	No interference
	Dexchloropheniramine (<i>Polaramine</i>)	0.3 mg/mL	No interference	Ambroxol hydrochloride (<i>Mucosan</i>)	0.3 mg/mL	No interference
	Ebastine (<i>Ebastel</i>)	3.0 mg/mL	No interference	Macrogol 3350 (<i>Movicol</i>)	3.0 mg/mL	No interference
	Acetyl Salicylic (<i>Adiro</i>)	0.3 mg/mL	No interference	Lysine Carbocysteinate (<i>Pectox</i>)	3.0·10 ⁻² mg/mL	No interference
	Ibuprofen (<i>Espidifen</i>)	3.0 mg/mL	No interference	Hydroxyzine dihydrochloride	0.3 mg/mL	No interference
	Paracetamol (<i>Dolocatil</i>)	5.0 mg/mL	No interference	Lorazepam	3.0·10 ⁻³ mg/mL	No interference
	Metamizole (<i>Nolotil</i>)	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	2.0·10 ⁻³ mg/mL	No interference	Biotine	0.10 mg/mL	No interference
	Naso GEL	0.9 mg/mL	No interference	Sore Throat Phenol spray	0.5 mg/mL	No interference
	CVS Nasal Spray (<i>Cromolyn</i>)	4.0 mg/mL	No interference	Tobramycin	0.3 mg/mL	No interference
	Afrin (<i>Oxymetazoline</i>)	5.0·10 ⁻² mg/mL	No interference	Mupirocin	2.5·10 ⁻² mg/mL	No interference
	CVS Nasal Drops (<i>Phenylephrine</i>)	10.0 mg/mL	No interference	Fluticasone Propionate	5.0·10 ⁻² mg/mL	No interference
	ZICAM	1.0 mg/mL	No interference	Homeopathic	DIL 1/10	No interference
	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 10 Lactoferrin interferences results.

F. Repeatability and Reproducibility

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

ANNEX 1

KIT 20 CARD GDH+LACTOFERRIN. Catalogue reference: GF882001VF

Annex for the following reference:

PRODUCT	REFERENCE
CerTest GDH+Lactoferrin Combo Card (20 tests kit with stool vials)	GF882001VF

Table A 1. Reference for kit 20 combo card of CerTest GDH+Lactoferrin.

I. Materials

MATERIALS PROVIDED	MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED
<ul style="list-style-type: none"> - 20x CerTest GDH+Lactoferrin (combo card test format) - 20x GDH stool collection tubes with diluent - 20x Lactoferrin stool collection tubes with diluent - 1x IFU Instructions for use (including Quick guide use). 	<ul style="list-style-type: none"> - Disposable gloves (other personal protective equipment that will be considered necessary) - Timer - Specimen collection container

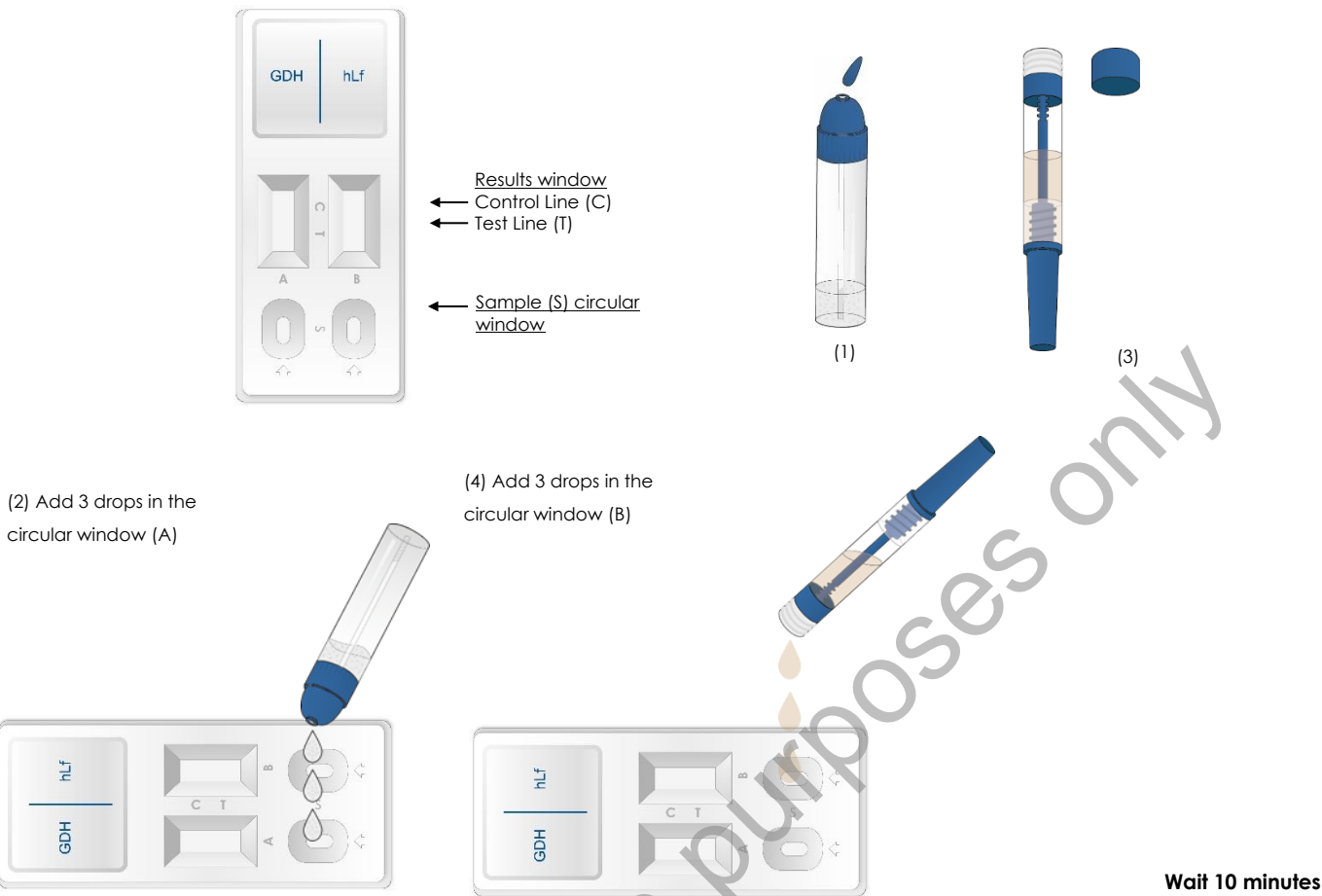
Table A 1.1 Materials necessities for test performance.

II. Test procedures (samples)

Follow proper infection control practices. Allow tests and 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 tubes** (both types) in order to assure good sample dispersion.
2. Remove **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card test) from its sealed bag just before using it.
3. Take the **GDH stool collection tube**, cut the end of the cap (1) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter A (2). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. Take the **Lactoferrin stool collection tube**, open the cap 2 (3) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter B (4). Avoid adding solid particles with the liquid.
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.

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)

	GDH	Lactoferrin		Interpretation of the results
1.	NEGATIVE	NEGATIVE		<p>There are no GDH and human lactoferrin. 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	GREEN		
2.	POSITIVE	POSITIVE		<p>There are GDH and human lactoferrin presence. Possible infection caused by <i>Clostridium difficile</i> and there is an intestinal inflammation.</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	GREEN-RED		

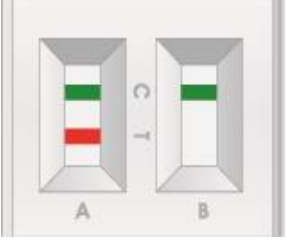
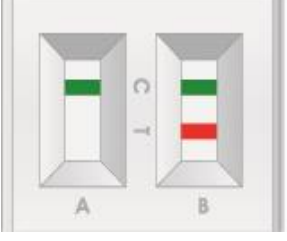
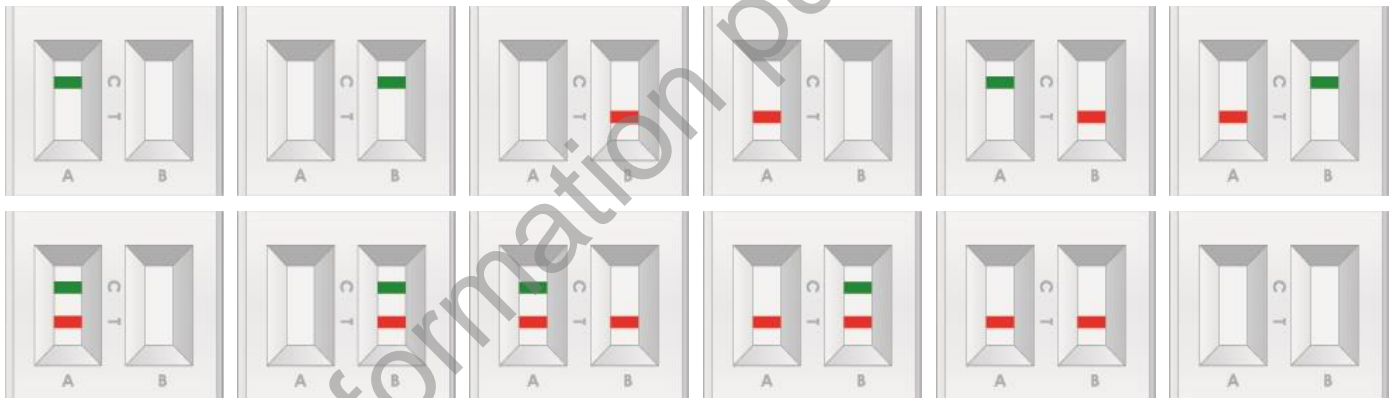
	GDH	Lactoferrin		Interpretation of the results
3.	POSITIVE	NEGATIVE		<p>There is GDH presence. Possible infection caused by <i>Clostridium difficile</i>.</p> <p>The presence of these lines (control green line and test red line), independent of their intensity should be considered as a positive result.</p> <p>A positive result should be followed up with additional laboratory techniques to confirm the results.</p>
	GREEN-RED	GREEN		
4.	NEGATIVE	POSITIVE		<p>There is Lactoferrin presence. Possible intestinal inflammation.</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	GREEN-RED		
5.	INVALID	INVALID	See below this table.	<p>Invalid result either A or B, 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	Any other result		

Table A 1.2. CerTest GDH+Lactoferrin performance interpretation of the results.

INVALID 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 GDH+LACTOFERRIN. Catalogue reference: GF882001VFC

Annex for the following reference:

PRODUCT	REFERENCE
CerTest GDH+Lactoferrin Combo Card (20 tests kit with stool vials + PC)	GF882001VFC

Table A 2. Reference for kit 20 combo card of CerTest GDH+Lactoferrin with positive control.

I. Materials

MATERIALS PROVIDED	MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED
<ul style="list-style-type: none"> - 20x CerTest GDH+Lactoferrin (combo card test format) - 20x GDH stool collection tubes with diluent - 20x Lactoferrin stool collection tubes with diluent -1x CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control -1x CerTest Lactoferrin Positive Control -2x Testing tube -2x Disposable pipette -1x IFU Instructions for use (including Quick guide use). 	<ul style="list-style-type: none"> - Disposable gloves (other personal protective equipment that will be considered necessary) - Timer - Specimen collection container

Table A 2.1 Materials necessities for test performance.

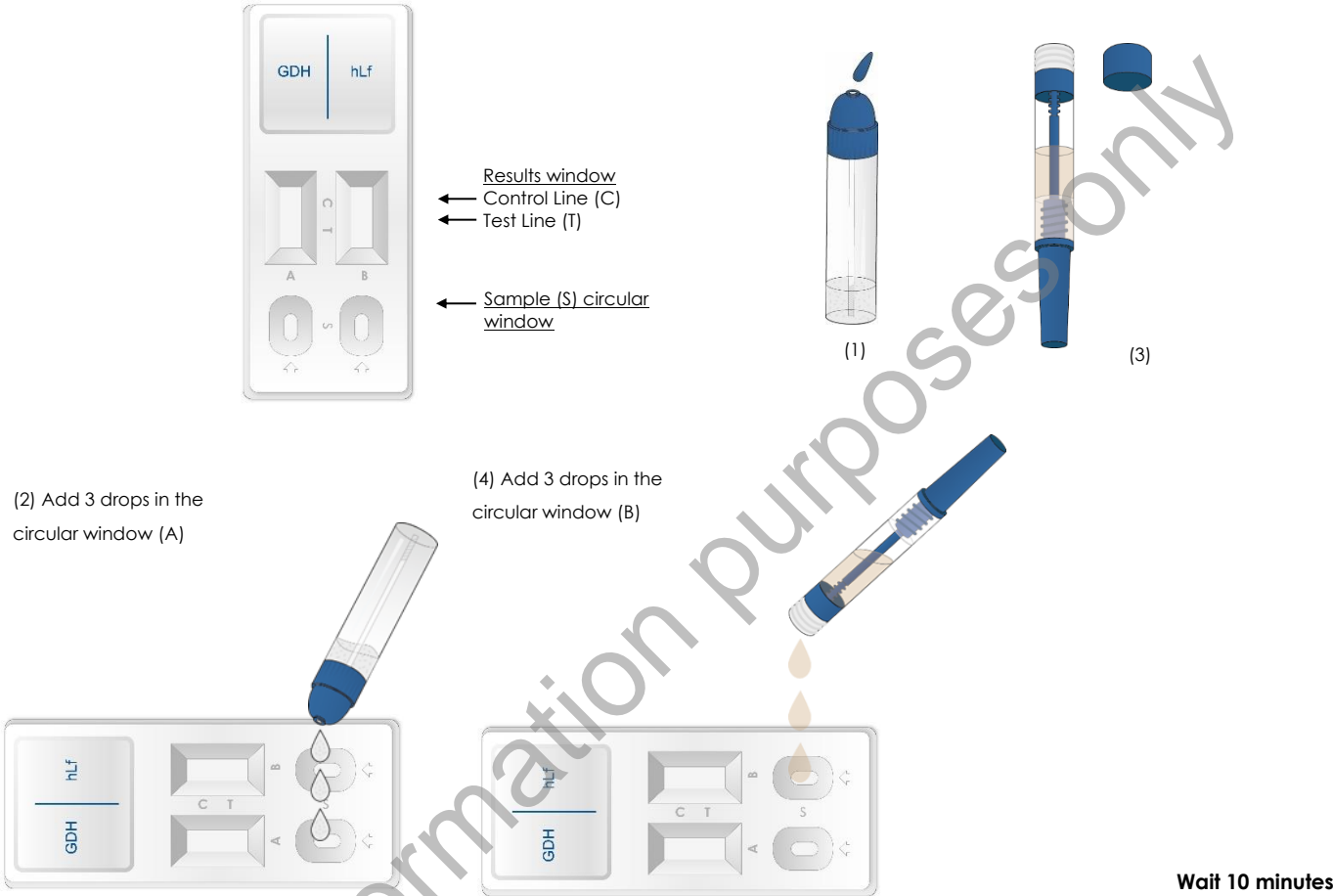
II. Test procedures (samples)

Follow proper infection control practices. Allow tests and 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** (both types) in order to assure good sample dispersion.
2. Remove **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card test) from its sealed bag just before using it.
3. Take the **GDH stool collection tube**, cut the end of the cap (1) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter A (2). Avoid adding solid particles with the liquid.

4. Take the **Lactoferrin stool collection tube**, open the cap 2 (3) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter B (4). Avoid adding solid particles with the liquid.
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.

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)

	GDH	Lactoferrin		Interpretation of the results
1.	NEGATIVE	NEGATIVE		There are no GDH and human lactoferrin. No infection caused by <i>Clostridium difficile</i> . A negative result should be followed up with additional laboratory techniques to confirm the results.
	GREEN	GREEN		


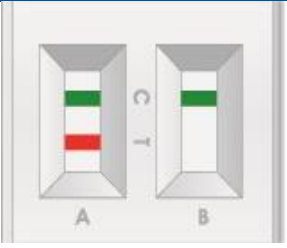

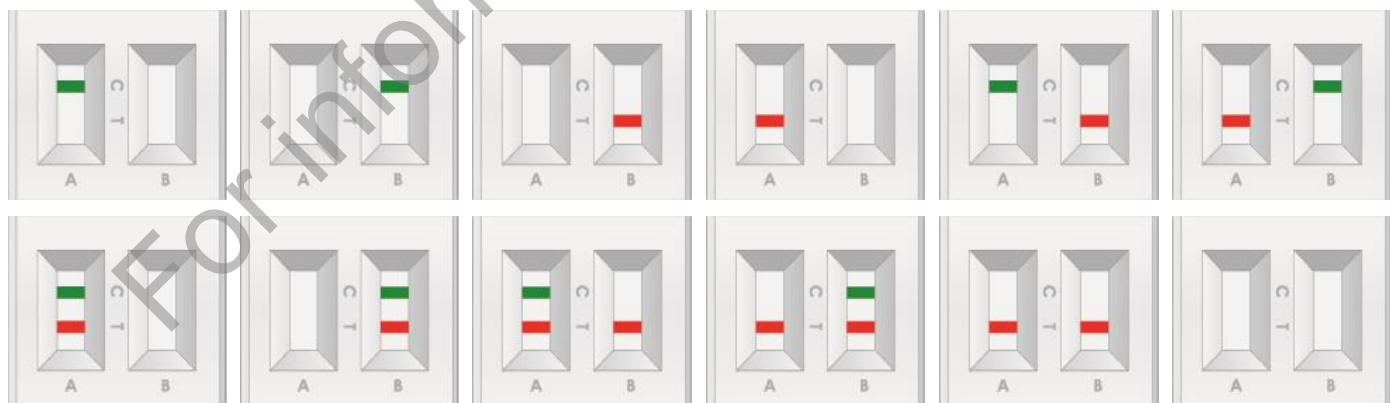
	GDH	Lactoferrin		Interpretation of the results
2.	POSITIVE	POSITIVE		<p>There are GDH and human lactoferrin presence. Possible infection caused by <i>Clostridium difficile</i> and there is an intestinal inflammation.</p> <p>The presence of these lines (control green line and test red line), independent 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	GREEN-RED		
3.	POSITIVE	NEGATIVE		<p>There is GDH presence. 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	GREEN		
4.	NEGATIVE	POSITIVE		<p>There is Lactoferrin presence. Possible intestinal inflammation.</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	GREEN-RED		
5.	INVALID	INVALID	See below this table.	<p>Invalid result either A or B, 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	Any other result		

Table A 2.2 CerTest GDH+Lactoferrin performance interpretation of the results.

INVALID 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 GDH+Lactoferrin (combo 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 SWABS

External control: CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control and **CerTest Lactoferrin Positive Control** (positive control swabs).

A. External positive controls

It is recommended to use the same device for both external positive controls.

1. CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control

CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control is an external quality control for **CerTest GDH+Lactoferrin** (Strip A). Use **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** to check that the extraction reagents and the test are working properly.

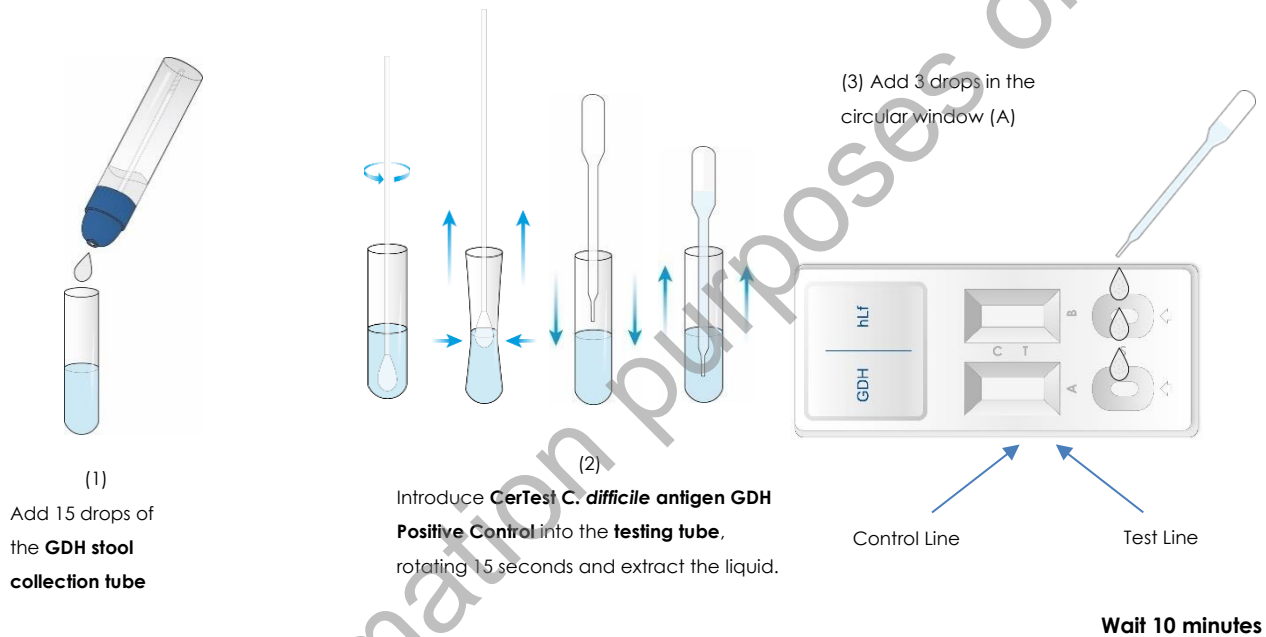
Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C, **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** is stable through the expiration date printed on the sealed pouch. **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

1.1. 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. Take the **GDH stool collection tube**, cut the end of the cap.

2. Add 15 drops (1) from the **GDH stool collection tube** into the **testing tube** and immediately introduce **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control**.
3. 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 the **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**.
4. Remove the **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card format) from its sealed bag just before using it.
5. 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 A (3).
6. **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.



2. CerTest Lactoferrin Positive Control

CerTest Lactoferrin Positive Control is an external quality control for **CerTest GDH+Lactoferrin** (Strip B). Use **CerTest Lactoferrin Positive Control** to check that the extraction reagents and the test are working properly.

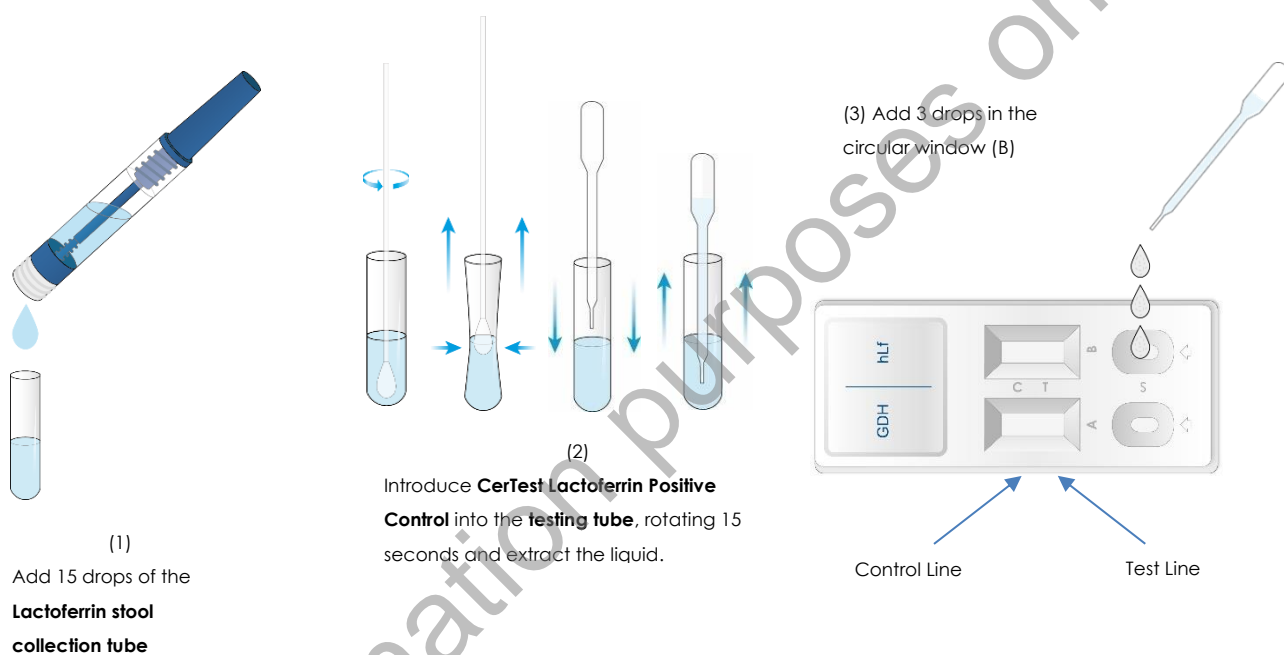
Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C, **CerTest Lactoferrin Positive Control** is stable through the expiration date printed on the sealed pouch. **CerTest Lactoferrin Positive Control** must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

2.1 Positive control procedure

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

1. Take the **Lactoferrin stool collection tube**, open the cap 2.
2. Add 15 drops (1) from the **Lactoferrin stool collection tube** into the **testing tube** and immediately introduce the **CerTest Lactoferrin Positive Control**.

3. Mix the solution by rotating the **CerTest Lactoferrin Positive Control** forcefully against the side of the **testing tube** at least 15 seconds. Extract as much liquid as possible from the **CerTest Lactoferrin Positive Control**, squeezing the sides of the **testing tube** as the **CerTest Lactoferrin Positive Control** is withdrawn (2). Discard **CerTest Lactoferrin Positive Control**.
4. Remove the **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card format) from its sealed bag just before using it.
5. 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 B (3).
6. **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.



Wait 10 minutes

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

A.1 Interpretation positive control procedure

	CerTest <i>C. difficile</i> antigen GDH Positive Control	CerTest Lactoferrin Positive Control	Interpretation of the results
1.	POSITIVE (One device for both positive controls)		A GREEN line (control line (C)) and a RED line (test line (T)) appear across the results in each window during the


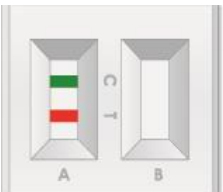


CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control	CerTest Lactoferrin Positive Control		Interpretation of the results
GREEN-RED	GREEN-RED		test performance due to presence of antigens in CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control and Lactoferrin Positive Control.
2.	POSITIVE (One device for CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control)		A GREEN line (control line (C)) and a RED line (test line (T)) appear across the results window in strip A due to presence of antigen GDH in CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control
GREEN-RED	-		
3.	POSITIVE (One device for CerTest Lactoferrin Positive Control)		A GREEN line (control line (C)) and a RED line (test line (T)) appear across the results window in strip B due to presence of Lactoferrin in CerTest Lactoferrin Positive Control.
-	GREEN-RED		
4.	INVALID		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 C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control and Lactoferrin Positive Control.
Any other result			<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 2.3 CerTest C.*difficile* antigen GDH and Lactoferrin Positive Control performance e interpretation of the results.

ANNEX 3

KIT 20 CARD GDH+LACTOFERRIN. Catalogue reference: GF882001VFCC

Annex for the following reference:

PRODUCT	REFERENCE
CerTest GDH+Lactoferrin Combo Card (20 tests kit with stool vials +PC +NC)	GF882001VFCC

Table A 3. Reference for kit 20 combo card of CerTest GDH+Lactoferrin with positive and negative control.

I. Materials

MATERIALS PROVIDED	MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED
<ul style="list-style-type: none"> - 20x CerTest GDH+Lactoferrin (combo card test format) - 20x GDH stool collection tubes with diluent - 20x Lactoferrin stool collection tubes with diluent -1x CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control -1x CerTest Lactoferrin Positive Control -1x CerTest Negative Control -3x Testing tube -3x Disposable pipette --1x IFU Instructions for use (including Quick guide use). 	<ul style="list-style-type: none"> - 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 and 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** (both types) in order to assure good sample dispersion.
2. Remove **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card test) from its sealed bag just before using it.
3. Take the **GDH stool collection tube**, cut the end of the cap (1) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter A (2). Avoid adding solid particles with the liquid.

4. Take the **Lactoferrin stool collection tube**, open the cap 2 (3) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter B (4). Avoid adding solid particles with the liquid.
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.

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)

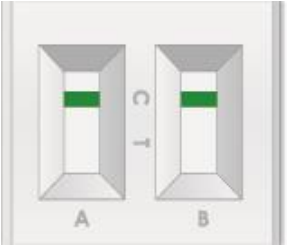

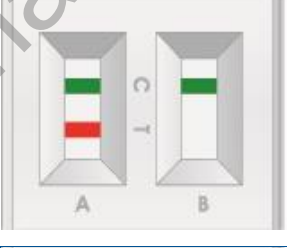
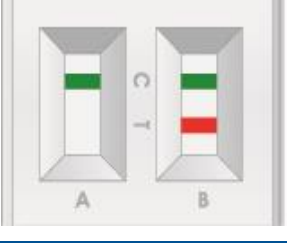
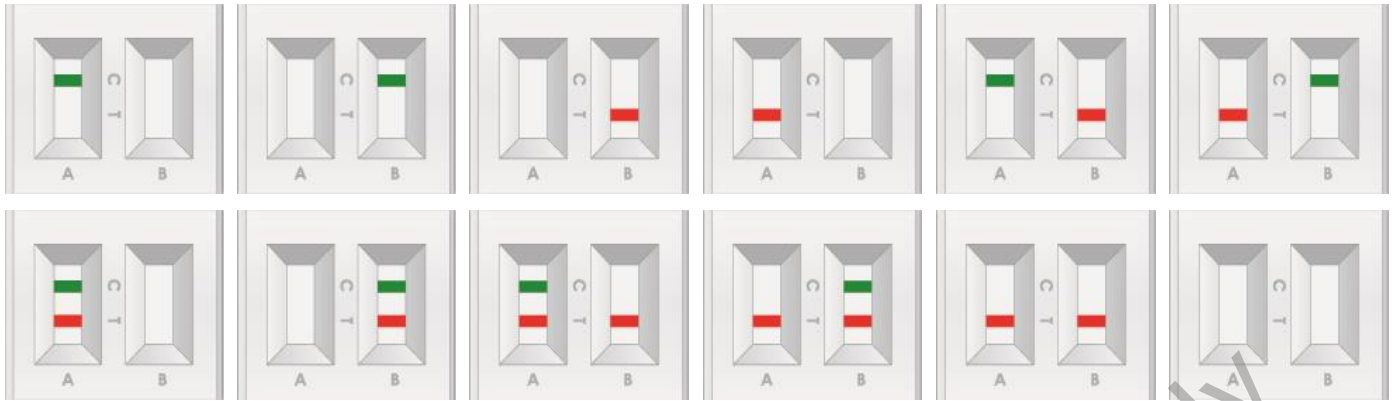
	GDH	Lactoferrin		Interpretation of the results
1.	NEGATIVE	NEGATIVE		<p>There are no GDH and human lactoferrin. No infection caused by <i>Clostridium difficile</i>.</p> <p>A negative result should be followed up with additional laboratory techniques to confirm the results.</p>
	GREEN	GREEN		
2.	POSITIVE	POSITIVE		<p>There are GDH and human lactoferrin presence. Possible infection caused by <i>Clostridium difficile</i> and there is an intestinal inflammation.</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	GREEN-RED		
3.	POSITIVE	NEGATIVE		<p>There is GDH presence. 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	GREEN		
4.	NEGATIVE	POSITIVE		<p>There is Lactoferrin presence. Possible intestinal inflammation.</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	GREEN-RED		
5.	INVALID	INVALID	See below this table.	<p>Invalid result either A or B, 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	Any other result		

Table A 3.2 CerTest GDH+Lactoferrin performance interpretation of the results.

INVALID 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 GDH+Lactoferrin (combo card test) presents four 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 SWABS AND NEGATIVE CONTROL SWAB

External control: CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control and **CerTest Lactoferrin Positive Control** (positive control swabs).

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

A. External positive controls

It is recommended to use the same device for both external positive controls.

1. CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control

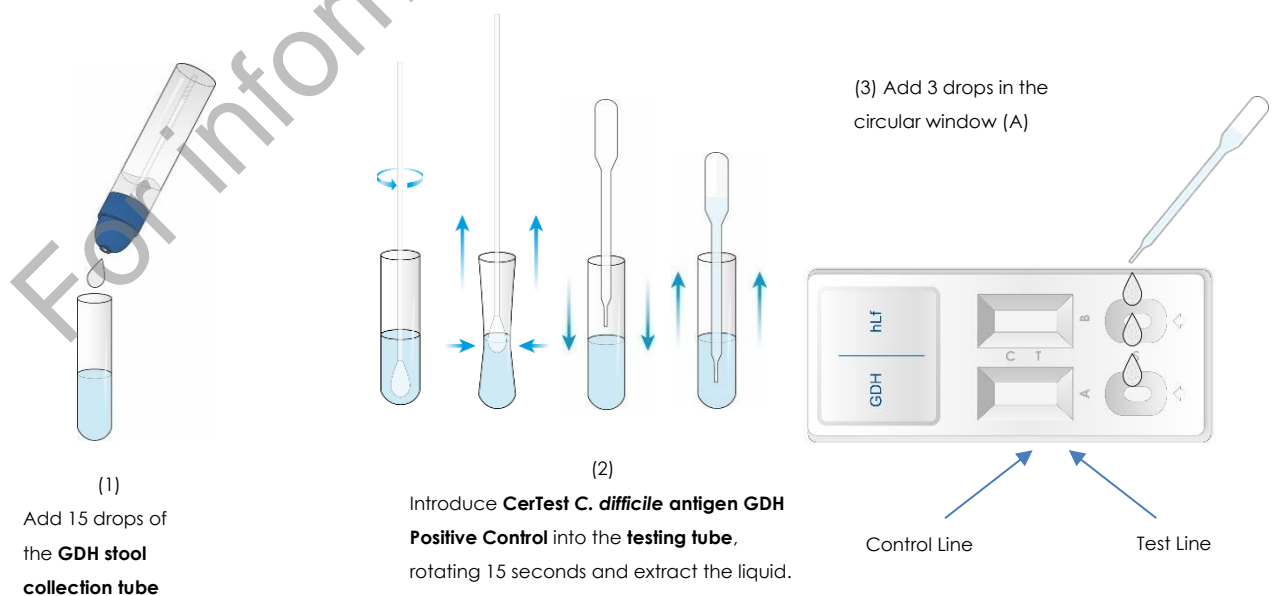
CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control is an external quality control for **CerTest GDH+Lactoferrin** (Strip A). Use **CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control** to check that the extraction reagents and the test are working properly.

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.

1.1. 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. Take the **GDH stool collection tube**, cut the end of the cap.
2. Add 15 drops (1) from the **GDH stool collection tube** into the **testing tube** and immediately introduce **CerTest *C. difficile* antigen GDH Positive Control**.
3. 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 the **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**.
4. Remove the **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card format) from its sealed bag just before using it.
5. 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 A (3).
6. **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.



Wait 10 minutes

2. CerTest Lactoferrin Positive Control

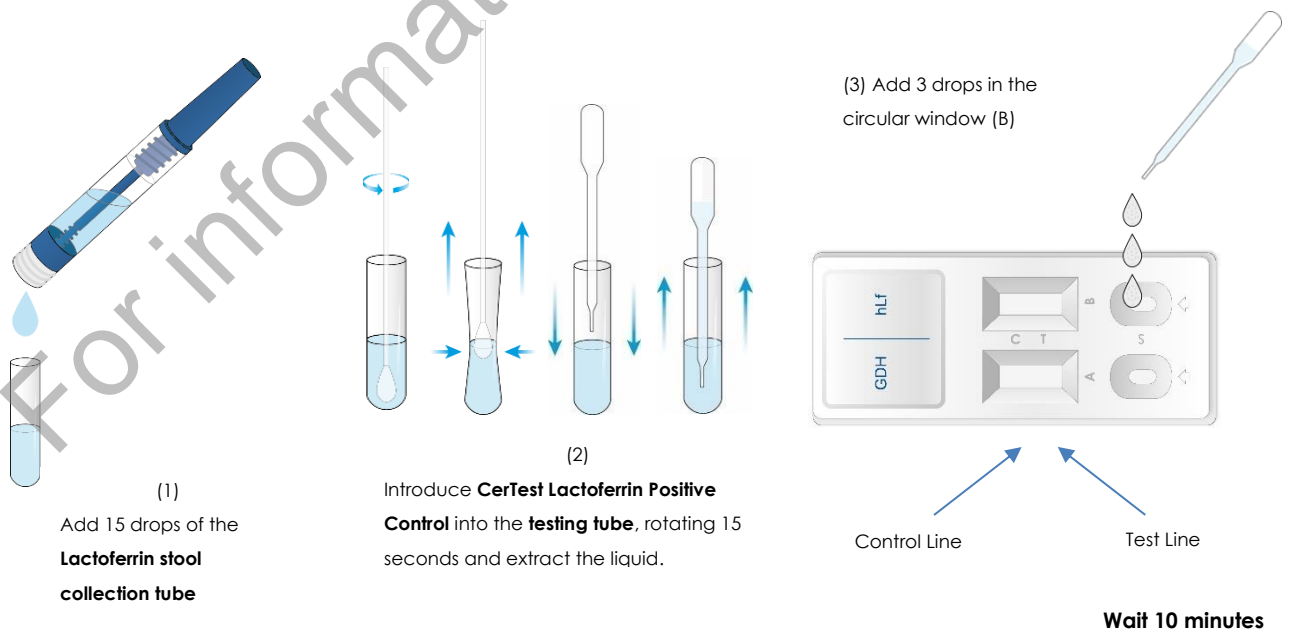
CerTest Lactoferrin Positive Control is an external quality control for **CerTest GDH+Lactoferrin** (Strip B). Use **CerTest Lactoferrin Positive Control** to check that the extraction reagents and the test are working properly.

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

2.1 Positive control procedure

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

1. Take the **Lactoferrin stool collection tube**, open the cap 2.
2. Add 15 drops (1) from the **Lactoferrin stool collection tube** into the **testing tube** and immediately introduce the **CerTest Lactoferrin Positive Control**.
3. Mix the solution by rotating the **CerTest Lactoferrin Positive Control** forcefully against the side of the **Testing tube** at least 15 seconds. Extract as much liquid as possible from the **CerTest Lactoferrin Positive Control**, squeezing the sides of the **testing tube** as the **CerTest Lactoferrin Positive Control** is withdrawn (2). Discard **CerTest Lactoferrin Positive Control**.
4. Remove the **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card format) from its sealed bag just before using it.
5. 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 B (3).
6. **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 controls could be tested once for each new test kit opened and as otherwise required by your laboratory's standard quality control procedures.

A.1 Interpretation positive control procedure


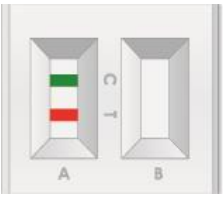
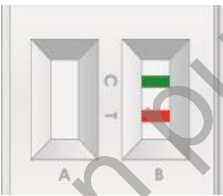
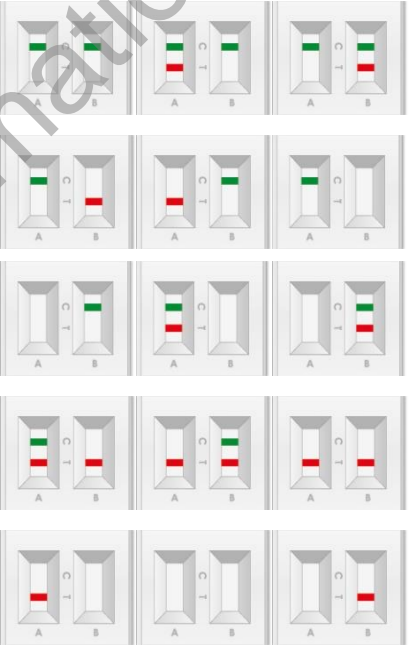
	CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control	CerTest Lactoferrin Positive Control		Interpretation of the results
1.	POSITIVE (One device for both positive controls)			A GREEN line (control line (C)) and a RED line (test line (T)) appear across the results in each window during the test performance due to presence of antigens in CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control and Lactoferrin Positive Control.
	GREEN-RED	GREEN-RED		
2.	POSITIVE (One device for CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control)			A GREEN line (control line (C)) and a RED line (test line (T)) appear across the results window in strip A due to presence of antigen GDH in CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control
	GREEN-RED	-		
3.	POSITIVE (One device for CerTest Lactoferrin Positive Control)			A GREEN line (control line (C)) and a RED line (test line (T)) appear across the results window in strip B due to presence of Lactoferrin in CerTest Lactoferrin Positive Control.
	-	GREEN-RED		
4.	INVALID			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 C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control and Lactoferrin Positive Control. If the situation still persists, discontinue using the test kit and contact your local distributor. Any result read after more than 10 minutes will be considered invalid.
	Any other result			

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

B. External negative control. CerTest Negative Control

CerTest Negative Control is an external quality control for **CerTest GDH+Lactoferrin** (Strip A and B). 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.

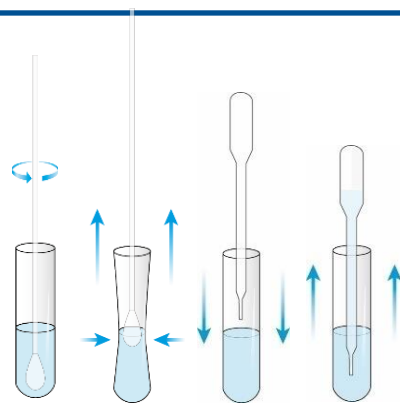
For GDH:

1. Add 15 drops (1) of diluent from the **GDH 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 the **CerTest Negative Control**, squeezing the sides of the **testing tube** as **CerTest Negative Control** is withdrawn (2). Discard the **CerTest Negative Control**.
3. Remove the **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card format) 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** into the circular window marked with letter A (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.



(1)

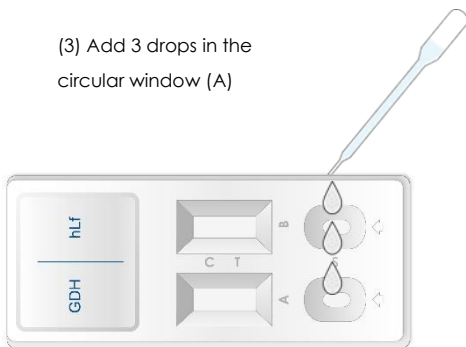
Add 15 drops of **GDH stool collection tube**



(2)

Introduce the **CerTest Negative Control** into the **testing tube**, rotating 15 seconds and extract the liquid

(3) Add 3 drops in the circular window (A)



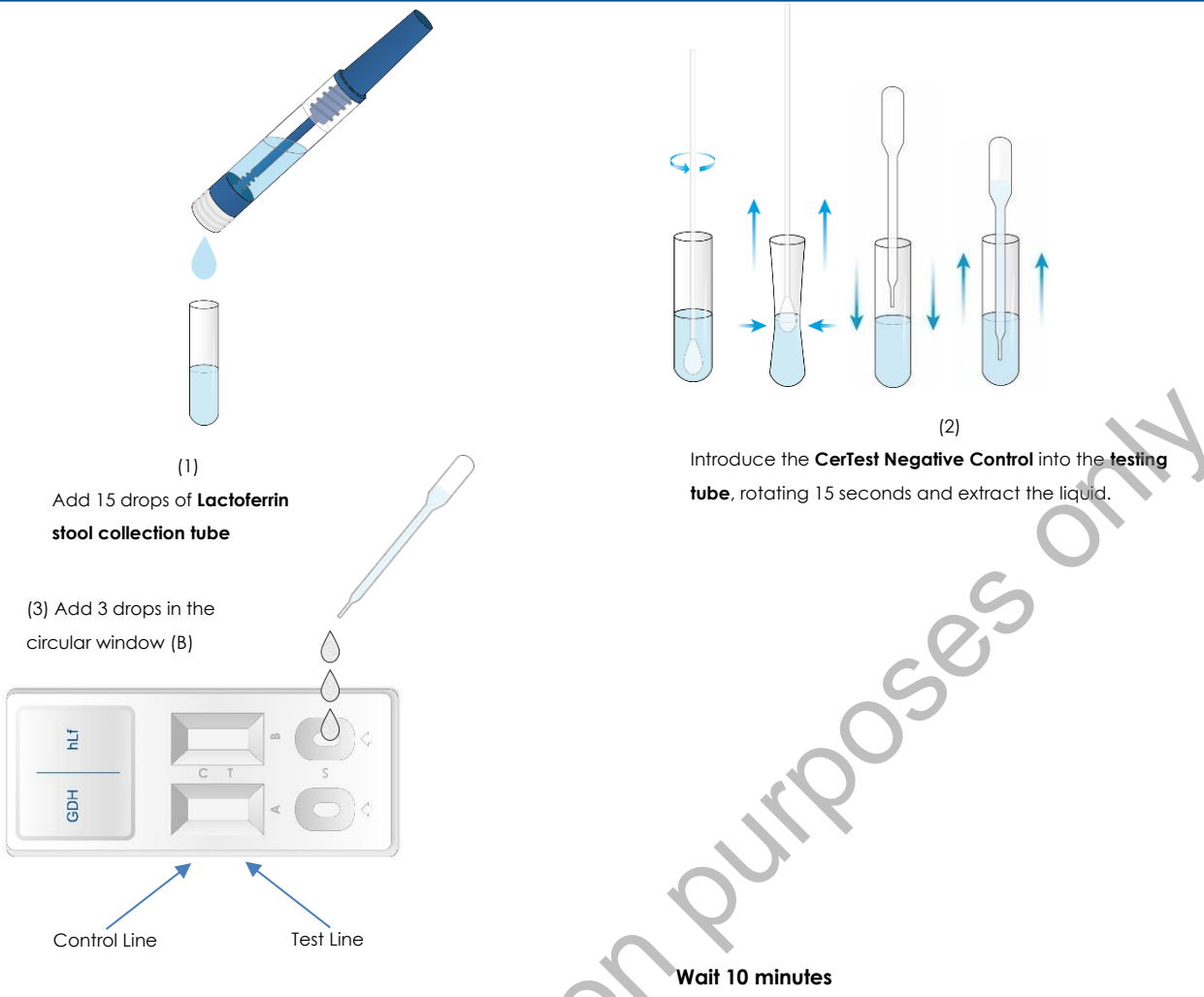
Control Line

Test Line

Wait 10 minutes

For Lactoferrin:

1. Add 15 drops (1) of diluent from the **Lactoferrin 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 the **CerTest Negative Control**, squeezing the sides of the **testing tube** as **CerTest Negative Control** is withdrawn (2). Discard the **CerTest Negative Control**.
3. Remove the **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card format) 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** into the circular window marked with letter B (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

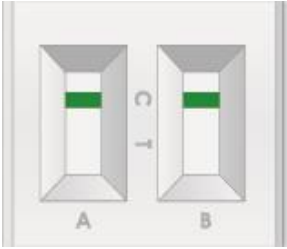
Negative Control		Interpretation of the results
1.	VALID RESULT	 <p>Only A GREEN line (control line (C)) appear across the results window during the test performance.</p>
	GREEN (only control band appear)	
2.	INVALID	<p>Total absence of the control-coloured line (GREEN), regardless the appearance or 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 device and a new CerTest Negative Control.</p> <p>If the situation still persists, discontinue using the test kit and contact your local distributor.</p>
	Any other result	

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

For information purposes only

2. Uso previsto

CerTest GDH+Lactoferrin combo card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de *Clostridium difficile* Glutamato Deshidrogenasa (GDH) y de lactoferrina humana (hLf) en muestras de heces.

CerTest GDH+Lactoferrin combo card test ofrece un ensayo de cribado sencillo y de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de infección por *Clostridium difficile* y para determinar la actividad inflamatoria intestinal.

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 prolifere 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).

La lactoferrina es un componente glicoproteico de los gránulos neutrofílicos secundarios, componente primario de la respuesta aguda inflamatoria y es liberada a partir de los leucocitos fecales. Esta proteína es resistente a la proteólisis en las heces y puede servir como marcador de inflamación en el intestino. La causa más frecuente de la presencia de neutrófilos en heces en pacientes con diarrea crónica es la enfermedad crónica inflamatoria intestinal localizada en el colon (como la Enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa).

Se ha estudiado la lactoferrina como marcador de infección por enteropatógenos invasivos en niños con diarrea. La diarrea inflamatoria bacteriana puede ser causada por *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Clostridium difficile* (6,7).

4. Fundamento del test

CerTest GDH+Lactoferrin es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección cualitativa de *Clostridium difficile* Glutamato Deshidrogenasa (GDH) y lactoferrina en muestras humanas de heces procedentes de pacientes sospechosos de infección por *Clostridium difficile*, y de inflamación intestinal.

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

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

Si la muestra es GDH positiva, el antígeno de la muestra diluida reacciona con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-GDH-microesferas rojas de látex) en la tira A, y si la muestra es Lactoferrina positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-lactoferrina humana-microesferas rojas de látex) en la tira B, los cuales fueron secados previamente en el material absorbente. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados. Los anticuerpos anti-GDH presentes en la membrana de la tira A (línea de test), y los anticuerpos anti-lactoferrina

humana presentes en la membrana de la tira B (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá en las tres tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

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

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

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.

- **Solo 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 GDH+ Lactoferrin**. 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 GDH+Lactoferrin**. 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.

Por favor, observe que hay dos stool collection tubes:

a. GDH B stool collection tubes

Preparación de la muestra (ver dibujo):

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

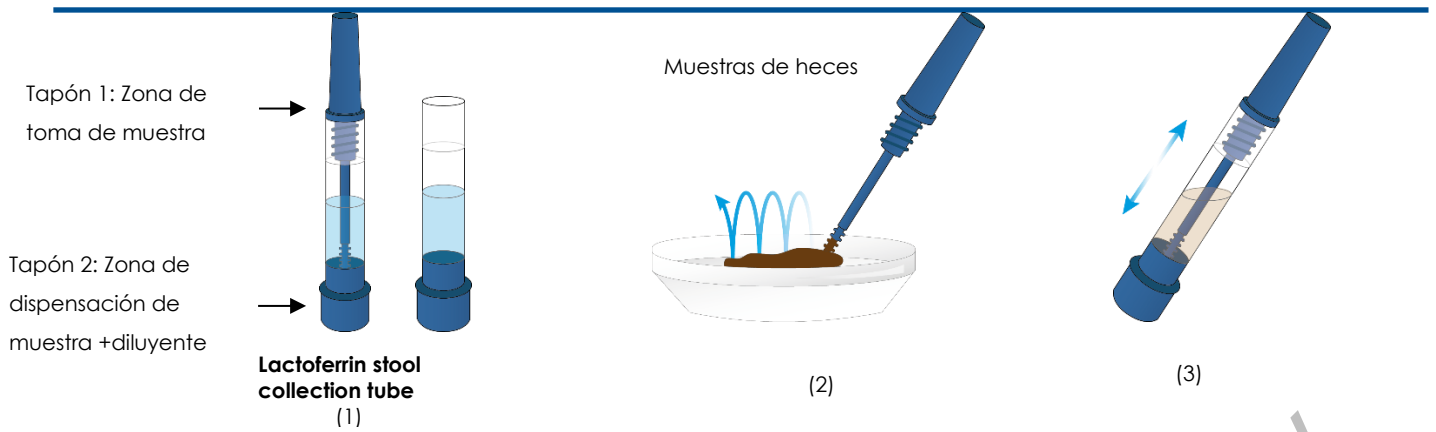


Continuar inmediatamente con el procedimiento del test. Véase en Anexos.

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.

b. Lactoferrin stool collection tubes

1. Abrir el tapón (1) del **Lactoferrin 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. 20 mg) y finalmente se introducirá la muestra en el **Lactoferrin stool collection tube**. Para muestras líquidas, añada aprox. 20 μL en el **Lactoferrin stool collection tube** utilizando una micropipeta.
2. Cerrar el **Lactoferrin 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 GDH+Lactoferrin** debería utilizarse sólo con muestras de heces humanas. El uso de otras muestras no ha sido determinado. La calidad del test depende de la calidad de la muestra; por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras fecales.
- 5) Los resultados positivos determinan la presencia de GDH de *Clostridium difficile* y lactoferrina humana en muestras fecales. Un resultado positivo debe ser objeto de seguimiento con técnicas de laboratorio adicionales (cultivo toxigénico) para determinar la cepa. La confirmación de una infección sólo debe ser realizada por un médico después de que todos los hallazgos clínicos y de laboratorio hayan sido evaluados y debe basarse en la correlación de los resultados con otras observaciones clínicas.
- 6) Un resultado negativo no se puede considerar como concluyente, puede darse que la concentración de GDH de *Clostridium difficile* y/o lactoferrina humana en muestras fecales sea inferior al valor del límite de detección. Si los síntomas o la situación persisten, para la determinación de *Clostridium difficile* se debería repetir la prueba con la muestra previamente sometida a enriquecimiento.
- 7) La lactoferrina es un componente de la leche materna, este test dará positivo en lactantes y no debería utilizarse para evaluar neonatos lactantes.
- 8) Las muestras de heces de pacientes que presentan la enfermedad inflamatoria intestinal que normalmente lleva asociada una inflamación neutrofílica del intestino, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, deberían dar resultados positivos para lactoferrina fecal.

- 9) 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.
- 10) 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 (4,5,8).

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 (8).

Algunos estudios establecieron igual o superior a 10 µg hLf/g heces como valor de corte para permitir detectar pacientes adultos con patología inflamatoria gastrointestinal que requerirán para su diagnóstico procedimientos diagnósticos invasivos adicionales(6).

10. Características del test

A. Sensibilidad analítica (límite de detección)

El límite de detección de **CerTest GDH+Lactoferrin** es 0.39 ng/mL del antígeno de *Clostridium difficile* GDH y 100 ng/mL (10 µg hLf/ g heces) de lactoferrina humana.

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 proteína recombinante purificada de *Clostridium difficile* GDH y de lactoferrina humana.

B. Sensibilidad y especificidad clínica

B.1 Sensibilidad y especificidad clínica- GDH

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

Para tira A: GDH

IC test: CerTest GDH+Lactoferrin (tira A: GDH)	Criterio de evaluación		
		+	-
+	86	1	87
-	3	160	163
Total	89	161	250

Tabla 1 Desempeño de CerTest GDH+Lactoferrin (tira A: GDH) frente al criterio de evaluación.

CerTest GDH+Lactoferrin (tira A: 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 GDH+Lactoferrin (tira A: GDH).

B.2 Sensibilidad y especificidad clínica- Lactoferrin

Una evaluación retrospectiva externa (Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza) con muestras de heces congeladas se llevó a cabo comparando **CerTest GDH+Lactoferrin (tira B: Lactoferrin)** frente a un test ELISA. La técnica ELISA se considera la técnica gold-standard. Este es el criterio de evaluación. Los resultados se muestran a continuación:

Para tira B: Lactoferrin

Datos para el valor de cut-off 10µg hLf/g

IC test: CerTest GDH+Lactoferrin (tira B: Lactoferrin)	Evaluation criteria		
		+	-
+	27	13	40
-	3	47	50
Total	30	60	90

Tabla 3 Desempeño de CerTest GDH+Lactoferrin (tira B: Lactoferrin) frente al criterio de evaluación.

CerTest GDH+Lactoferrin (tira B: Lactoferrin) vs Evaluation criteria		
	Mean Value	95% confidence interval
Sensitivity	90.0%	73.5-97.9%
Specificity	78.3%	65.8-87.9%
PPV	67.5%	50.9-81.4%
NPV	94.0%	83.5-98.7%

Tabla 4 Resultados clínicos de CerTest GDH+Lactoferrin (tira B: Lactoferrin)

Especificidad para un valor de cut-off de 2.5 µg hLf/g: 100.0% (valor medio); 83.9-100.0% (95% intervalo de confianza).

Esta evaluación retrospectiva externa más reciente (con muestras de heces congeladas) mostró los siguientes resultados:

- **GDH:** Sensibilidad 96.6%, (95% intervalo de confianza: 90.5-99.3%) y especificidad 99.4% (95% intervalo de confianza: 96.6-100.0%).
- **Lactoferrin:** Sensibilidad 90.0%, (95% intervalo de confianza: 73.5-97.9%) y especificidad 78.3% (95% intervalo de confianza: 65.8-87.9%).

Los resultados mostraron una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Clostridium difficile* antigen GDH y/o lactoferrina humana utilizando **CerTest GDH+Lactoferrin**.

Para tira A: GDH

Ref.	Localización	Tipo de muestra	Referencia	Diana
1	Hospital Clínico Lozano Blesa (Zaragoza, Spain) Abril-Mayo 2021	Muestras de heces humanas	(17.1.1)	<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH
2	Hospital Clínico Lozano Blesa (Zaragoza, Spain) Abril-Junio 2017	Muestras de heces humanas	(17.1.2)	<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH
3	Louvain, (France) Enero- Diciembre 2016	Muestras de heces humanas	(17.1.3)	<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH
4	ECCMID Abril 2016, Amsterdam	Muestras de heces humanas	(17.1.4)	<i>Clostridium difficile</i> antigen GDH

Tabla 5 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 6 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 GDH+Lactoferrin (tira A: GDH).

C. Efecto Hook

CerTest GDH+Lactoferrin test no mostró efecto Hook inhibitorio a concentraciones mayores de $10^5 \times \text{LoD}$ para *Clostridium difficile* antigen GDH, ni a concentraciones mayores a $10^3 \times \text{LoD}$ para lactoferrina humana.

D. Reacciones cruzadas

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

Para tira A: GDH

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 bifermentans	-	Escherichia coli O:026	-	Salmonella paratyphi	-	Staphylococcus aureus	-		
	Clostridium Butyricum	-	Escherichia coli O:111	-	Salmonella typhi	-	Streptococcus pneumococcal	-		
Parásitos	Cryptosporidium Parvum	-	Entamoeba histolytica	-	Giardia lamblia	-				
Others	Hemoglobina porcina	-	Hemoglobina bovina	-	Lactoferrina bovina	-	Transferrina bovina	-		

Tabla 7 Resultados reacciones cruzadas (tira A: GDH).

Una prueba de especificidad para **CerTest GDH+Lactoferrin (tira A: 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 GDH+Lactoferrin (tira A: GDH)**, tiene una señal positiva con este patógeno, pero no se pudo establecer la naturaleza de este resultado positivo

Para tira B: Lactoferrin

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

Table 8 Resultados reacciones cruzadas (tira B: Lactoferrin).

E. Interferencias

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

Para la fira A: GDH

	Potencial sustancia interferente	Concentración	Resultado	Potencial sustancia interferente	Concentración	Resultado
Exógenos	Metronidazole	3.0 mg/mL	No interferencia	Loperamide hydrochloride (<i>Fortasec</i>)	0.15 mg/mL	No interferencia
	Ampicillin	3.0 mg/mL	No interferencia	Heparin (<i>Hibor</i>)	350.0 IU/mL	No interferencia
	Oseltamivir	0.3 mg/mL	No interferencia	Almagato (<i>Almax</i>)	3.0 mg/mL	No interferencia
	Amantadine	0.3 mg/mL	No interferencia	Fosfamicin (<i>Monurol</i>)	$3.0 \cdot 10^{-3}$ mg/mL	No interferencia
	Ribavirin	3.0 mg/mL	No interferencia	Acetylcysteine (<i>Fluimucil</i>)	3.0 mg/mL	No interferencia
	Codeine (<i>Toseina</i>)	0.2 mg/mL	No interferencia	Dexketoprofen trometamol (<i>Enantyum</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia
	Benzocaine (<i>Angileptol</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia	Levofloxacin	3.0 mg/mL	No interferencia
	Cloperastine (<i>Flutox</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia	Ciprofloxacin	0.3 mg/mL	No interferencia
	Carbocisteine (<i>Iniston mucolítico</i>)	3.0 mg/mL	No interferencia	Rifampicin (<i>Rifaldin</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia
	Loratadine	0.3 mg/mL	No interferencia	Phenoxymethylpenicillin potassium	3.0 mg/mL	No interferencia
	Dexchlorpheniramine (<i>Polaramine</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia	Ambroxol hydrochloride (<i>Mucosan</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia
	Ebastine (<i>Ebastel</i>)	3.0 mg/mL	No interferencia	Macrogol 3350 (<i>Movicol</i>)	3.0 mg/mL	No interferencia
	Acetyl Salicylic (<i>Adiro</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia	Lysine Carbocysteinate (<i>Pectox</i>)	$3.0 \cdot 10^{-2}$ mg/mL	No interferencia
	Ibuprofen (<i>Espidifen</i>)	3.0 mg/mL	No interferencia	Hydroxyzine dihydrochloride	0.3 mg/mL	No interferencia
	Paracetamol (<i>Dolocatil</i>)	5.0 mg/mL	No interferencia	Lorazepam	$3.0 \cdot 10^{-3}$ mg/mL	No interferencia
	Metamizole (<i>Nolotil</i>)	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	0.10 mg/mL	No interferencia
	Naso GEL	0.9 mg/mL	No interferencia	Sore Throat Phenol spray	0.5 mg/mL	No interferencia
	CVS Nasal Spray (<i>Cromolyn</i>)	4 mg/mL	No interferencia	Tobramycin	0.3 mg/mL	No interferencia
Afrin (<i>Oxymetazoline</i>)	$5.0 \cdot 10^{-2}$ mg/mL	No interferencia	Mupirocin	$2.5 \cdot 10^{-2}$ mg/mL	No interferencia	
CVS Nasal Drops (<i>Phenylephrine</i>)	10.0 mg/mL	No interferencia	Fluticasone Propionate	$5.0 \cdot 10^{-2}$ mg/mL	No interferencia	

	Potencial sustancia interferente	Concentración	Resultado	Potencial sustancia interferente	Concentración	Resultado
	ZICAM	1.0 mg/mL	No interferencia	Homeopathic	DIL 1/10	No interferencia
	Phenylpropanolamine	0.3 mg/mL	No interferencia			
Endógenos	Hemoglobina humana	5.0 µg/mL	No interferencia	Lactoferrin 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 9 Resultados de interferencias de GDH.

Para tira B: Lactoferrin

	Potencial sustancia interferente	Concentración	Resultado	Potencial sustancia interferente	Concentración	Resultado
Exógenos	Metronidazole	3.0 mg/mL	No interferencia	Loperamide hydrochloride (<i>Fortasec</i>)	0.15 mg/mL	No interferencia
	Ampicillin	3.0 mg/mL	No interferencia	Heparin (<i>Hibor</i>)	350.0 IU/mL	No interferencia
	Oseltamivir	0.3 mg/mL	No interferencia	Almagato (<i>Almax</i>)	3.0 mg/mL	No interferencia
	Amantadine	0.3 mg/mL	No interferencia	Fosfamicin (<i>Monurol</i>)	3.0·10 ⁻³ mg/mL	No interferencia
	Ribavirin	3.0 mg/mL	No interferencia	Acetylcysteine (<i>Fluimucil</i>)	3.0 mg/mL	No interferencia
	Codeine (<i>Toseina</i>)	0.2 mg/mL	No interferencia	Dexketoprofen trometamol (<i>Enantyum</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia
	Benzocaine (<i>Angileptol</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia	Levofloxacin	3.0 mg/mL	No interferencia
	Cloperastine (<i>Flutox</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia	Ciprofloxacin	0.3 mg/mL	No interferencia
	Carbocysteine (<i>Iniston mucolítico</i>)	3.0 mg/mL	No interferencia	Rifampicin (<i>Rifaldin</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia
	Loratadine	0.3 mg/mL	No interferencia	Phenoxyethylpenicillin potassium	3.0 mg/mL	No interferencia
	Dexchlorpheniramine (<i>Polaramine</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia	Ambroxol hydrochloride (<i>Mucosan</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia
	Ebastine (<i>Ebastel</i>)	3.0 mg/mL	No interferencia	Macrogol 3350 (<i>Movicol</i>)	3.0 mg/mL	No interferencia
	Acetyl Salicylic (<i>Adiro</i>)	0.3 mg/mL	No interferencia	Lysine Carbocysteinate (<i>Pectox</i>)	3.0·10 ⁻² mg/mL	No interferencia
	Ibuprofen (<i>Espidifen</i>)	3.0 mg/mL	No interferencia	Hydroxyzine dihydrochloride	0.3 mg/mL	No interferencia
	Paracetamol (<i>Dolocatil</i>)	5.0 mg/mL	No interferencia	Lorazepam	3.0·10 ⁻³ mg/mL	No interferencia
	Metamizole (<i>Nolotil</i>)	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	2.0·10 ⁻³ mg/mL	No interferencia	Biotine	0.10 mg/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)	4.0 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 interferencia			
Endógenos	Hemoglobina humana	5.0 µg/mL	No interferencia	Lactoferrin 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

Table 10 Resultados de interferencias de Lactoferrin.

F. Repetibilidad y Reproducibilidad

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

ANEXO 1

KIT 20 CARD GDH+LACTOFERRIN. Referencia: GF882001VF

Anexo para la siguiente referencia:

PRODUCTO	REFERENCIA
CerTest GDH+Lactoferrin Combo Card (20 tests kit with stool vials)	GF882001VF

Tabla A 1. Referencia para kit de 20 carcacas de CerTest GDH+Lactoferrin.

I. Materiales

MATERIALES SUMINISTRADOS	MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS
- 20x CerTest GDH+Lactoferrin (formato combo card test) - 20x GDH stool collection tubes (con diluyente) - 20x Lactoferrin stool collection tubes (con diluyente) - 1x IFU: Instrucciones de uso (incluyendo 1x Quick guide, guía rápida de uso).	- Guantes desechables (otros equipos de protección personal que se consideren necesarios). - Cronómetro. - Recipiente para recogida de muestra.

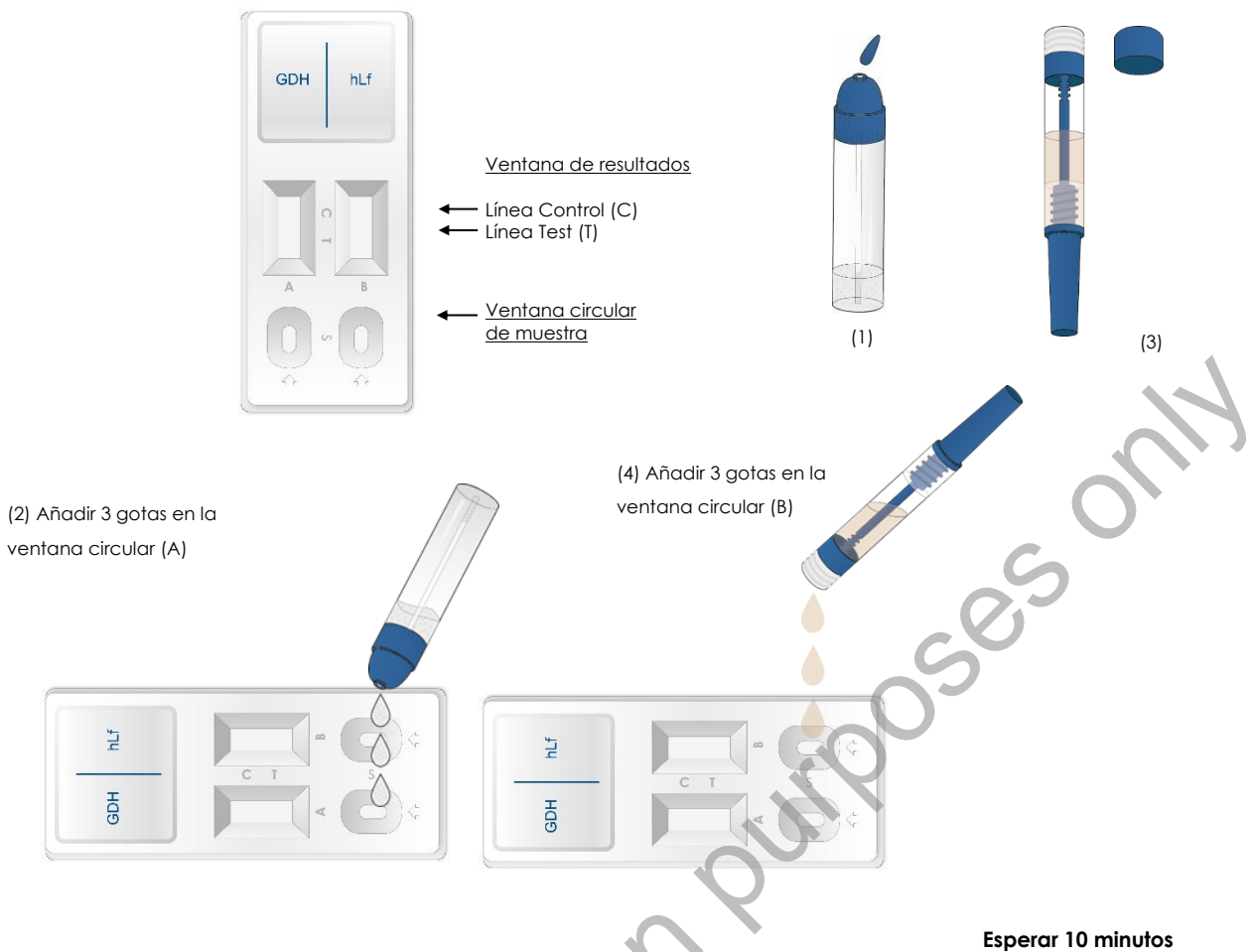
Tabla A 1.1 Materiales necesarios para la realización del test.

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** (ambos tipos) para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el **CerTest GDH+Lactoferrin** (formato combo card) de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el **GDH stool collection tube**, cortar la punta del tapón (1) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (2), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. Tomar el **Lactoferrin stool collection tube**, abrir el tapón 2 (3) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra B (4), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
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.

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.



III. Interpretación de los resultados

(por favor, fíjese en el siguiente dibujo)

	GDH	Lactoferrin		Interpretation of the results
1.	NEGATIVO	NEGATIVO		<p>No hay presencia de GDH ni de lactoferrina humana. 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	VERDE		
2.	POSITIVO	POSITIVO		<p>Hay presencia de GDH y de lactoferrina humana. Posible infección causada por <i>Clostridium difficile</i>, y existe inflamación intestinal.</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	VERDE-ROJO		

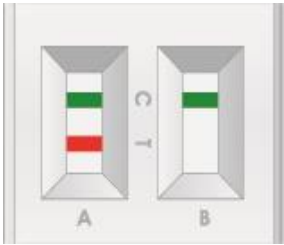
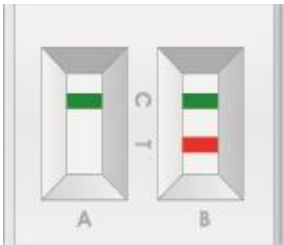
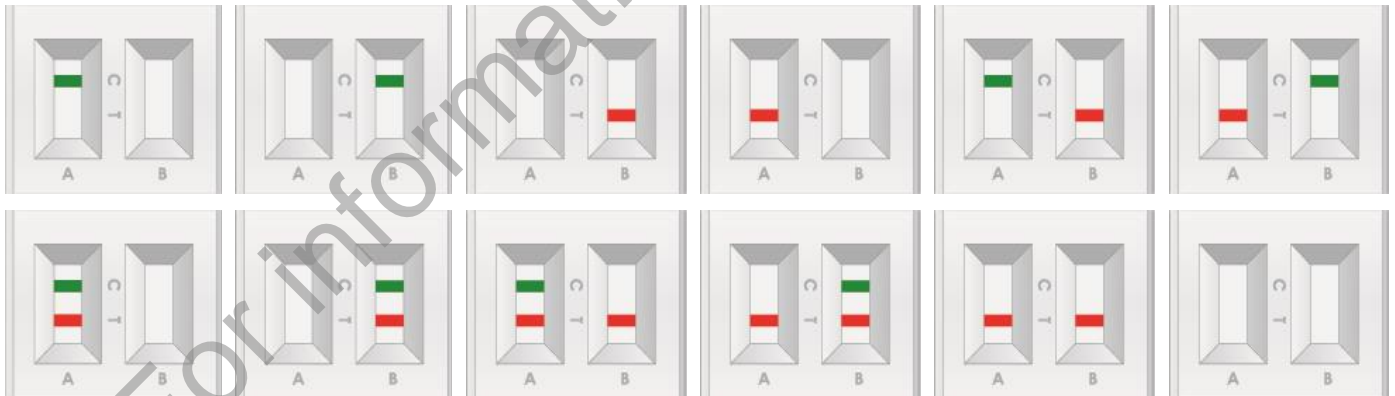
	GDH	Lactoferrin		Interpretation of the results
3.	POSITIVO	NEGATIVO		<p>Hay presencia de GDH. Posible infección causada por <i>Clostridium difficile</i>.</p> <p>La presencia de estas líneas (línea verde de control y roja de test), independientemente de su intensidad debería ser considerada como resultado positivo.</p> <p>Un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas de laboratorio para confirmar los resultados.</p>
	VERDE-ROJO	VERDE		
4.	POSITIVO	POSITIVO		<p>Hay presencia de lactoferrina humana. Posible inflamación intestinal.</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	VERDE-ROJO		
5.	INVÁLIDO	INVÁLIDO	Véase debajo de esta tabla.	<p>Resultado no válido ya sea A o B, recomendamos repetir el ensayo utilizando la misma muestra con otro test.</p> <p>Cualquier resultado leído tras más de 10 minutos será considerado inválido.</p>
	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado		

Tabla A 1.2 Interpretación de los resultados de CerTest GDH+Lactoferrin.

RESULTADOS NO VÁLIDOS



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, lo que confirma que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

For information purposes only

ANEXO 2

KIT 20 CARD GDH+ +LACTOFERRIN. Referencia: GF882001VFC

Anexo para la siguiente referencia:

PRODUCTO	REFERENCIA
CerTest GDH+Lactoferrin Combo Card (20 tests kit with stool vials + PC)	GF882001VFC

Tabla A 2. Referencia para kit de 20 carcacas de CerTest GDH+Lactoferrin con control positivo.

I. Materiales

MATERIALES SUMINISTRADOS	MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS
- 20x CerTest GDH+Lactoferrin (formato combo card test) - 20x GDH stool collection tubes (con diluyente) - 20x Lactoferrin stool collection tubes (con diluyente) - 1x CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control - 1x CerTest Lactoferrin Positive Control - 2x Testing tube - 2x Disposable pipette - 1x IFU: Instrucciones de uso (incluyendo 1x Quick guide, guía rápida de uso).	- 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.

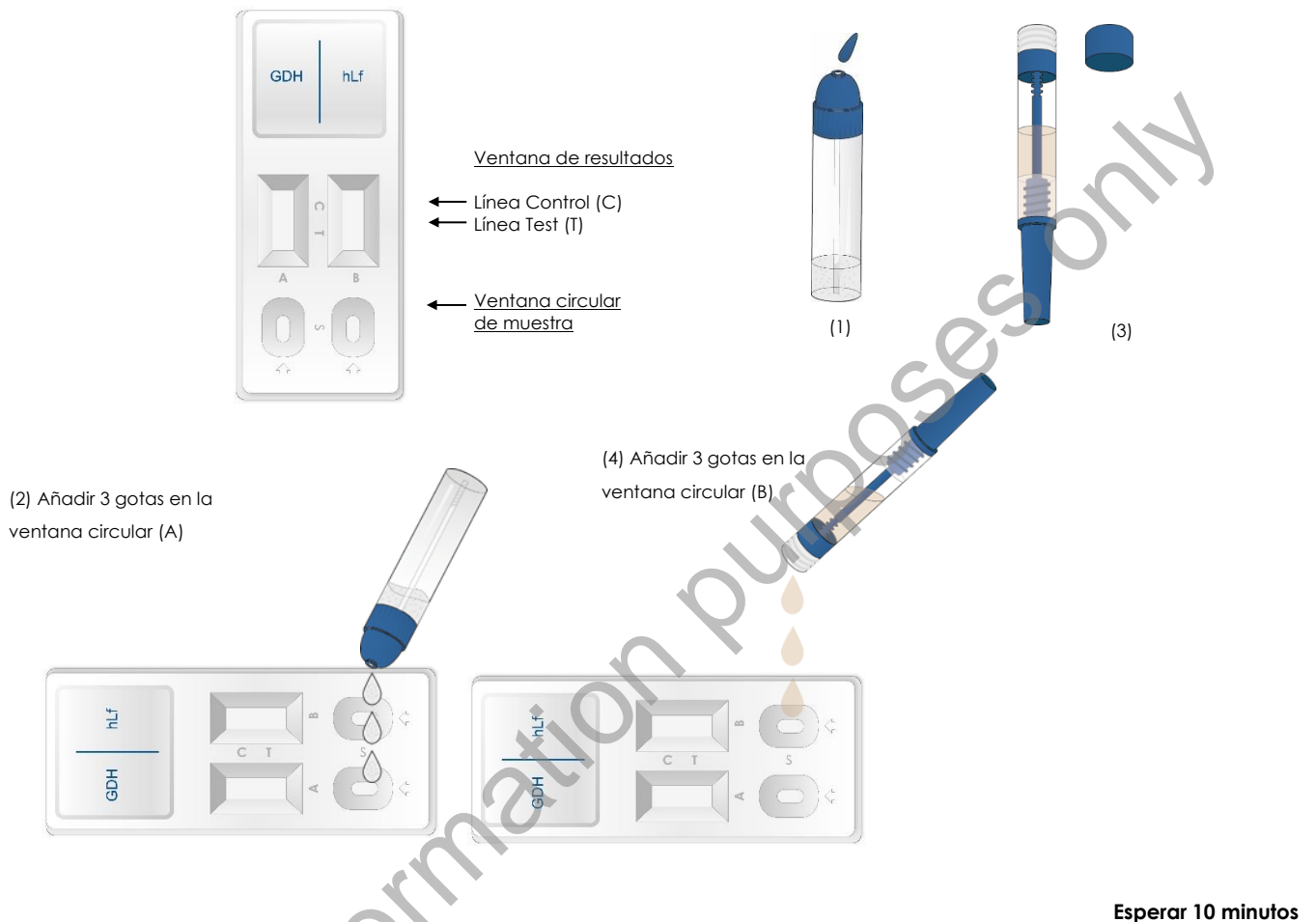
II. Procedimiento (muestras)

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** (ambos tipos) para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el **CerTest GDH+Lactoferrin** (formato combo card) de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el **GDH stool collection tube**, cortar la punta del tapón (1) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (2), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. Tomar el **Lactoferrin stool collection tube**, abrir el tapón 2 (3) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra B (4), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.

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.

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.



III. Interpretación de los resultados

(por favor, fíjese en el siguiente dibujo)

	GDH	Lactoferrin		Interpretation of the results
1.	NEGATIVO	NEGATIVO		No hay presencia de GDH ni de lactoferrina humana. No hay infección causada por <i>Clostridium difficile</i> . Un resultado negativo debería ser contrastado con otras técnicas de laboratorio para confirmar los resultados.
	VERDE	VERDE		
	POSITIVO	POSITIVO		


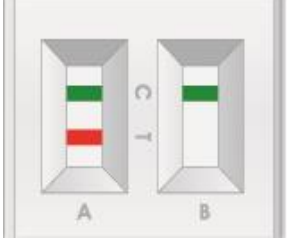
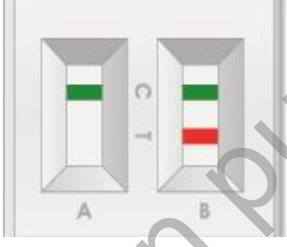
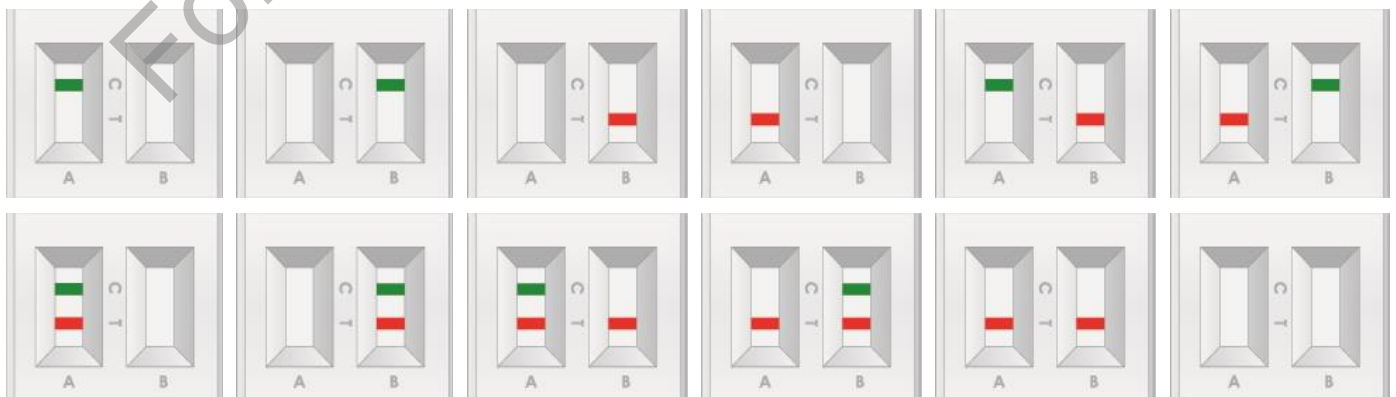
	GDH	Lactoferrin		Interpretation of the results
2.	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO		<p>Hay presencia de GDH y de lactoferrina humana. Posible infección causada por <i>Clostridium difficile</i>, y existe inflamación intestinal.</p> <p>La presencia de estas líneas (línea verde de control y roja de test), independientemente 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.	POSITIVO	NEGATIVO		<p>Hay presencia de GDH. 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	VERDE		
4.	POSITIVO	POSITIVO		<p>Hay presencia de lactoferrina humana. Posible inflamación intestinal.</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	VERDE-ROJO		
5.	INVÁLIDO	INVÁLIDO	Véase debajo de esta tabla.	<p>Resultado no válido ya sea A o B, recomendamos repetir el ensayo utilizando la misma muestra con otro test.</p> <p>Cualquier resultado leído tras más de 10 minutos será considerado inválido.</p>
	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado		

Tabla A 2.2 Interpretación de los resultados de CerTest GDH+Lactoferrin.

RESULTADOS NO VÁLIDOS



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 GDH+Lactoferrin (combo 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.

CONTROL EXTERNO: HISOPOS CONTROL POSITIVO

Control externo: CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control y CerTest Lactoferrin Positive Control (hisopos control positivo).

A. Controles positivos externos

Se recomienda utilizar el mismo dispositivo para ambos controles positivos externos.

1. CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control

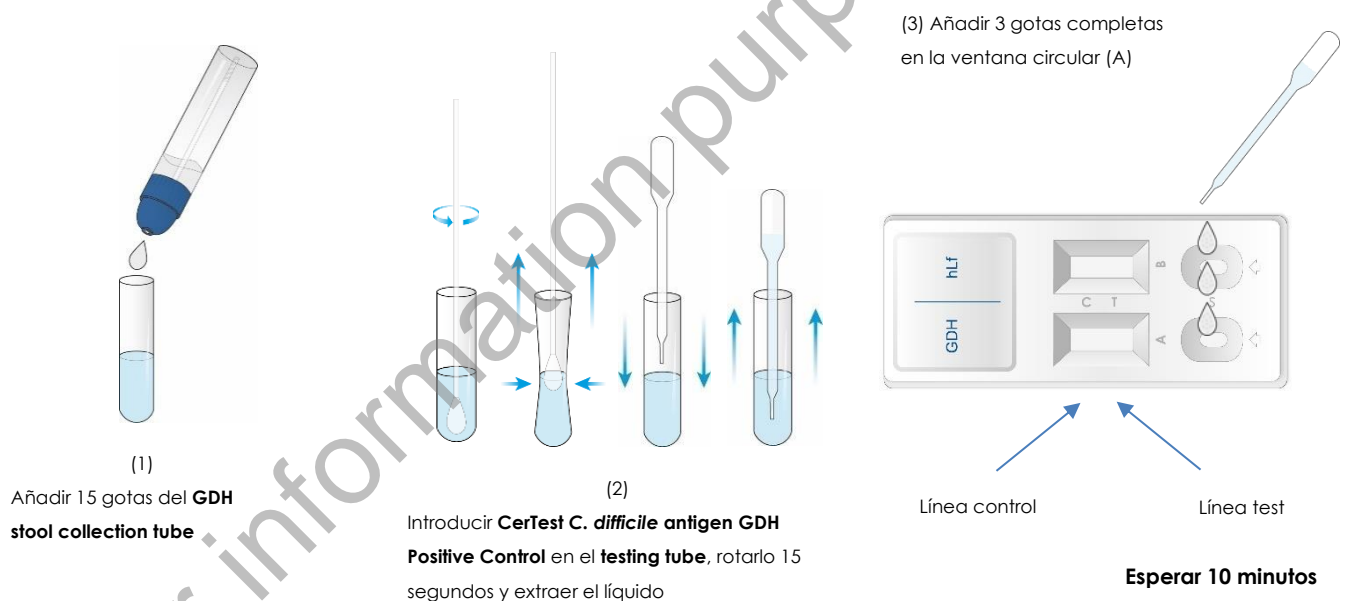
CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control es un control de calidad externo para **CerTest GDH+Lactoferrin** (Tira A). **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** se debe usar para evaluar que los reactivos y el funcionamiento del test son adecuados.

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.

1.1. Procedimiento de uso de 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. Tomar el **GDH stool collection tube**, cortar la punta del tapón.
2. Añadir 15 gotas (1) de **GDH stool collection tube** en el **testing tube** e inmediatamente introducir **CerTest C. difficile** antigen GDH Positive Control.
3. 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 del vial (2). Desechar **CerTest C. difficile** antigen GDH Positive Control.
4. Sacar el **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card test) de su envase sellado antes de utilizarlo.
5. Usar una **disposable pipette** diferente para cada control. Dispensar 3 gotas del **testing tube** en la ventana circular marcada con la letra A (3).
6. **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.



2. CerTest Lactoferrin Positive Control

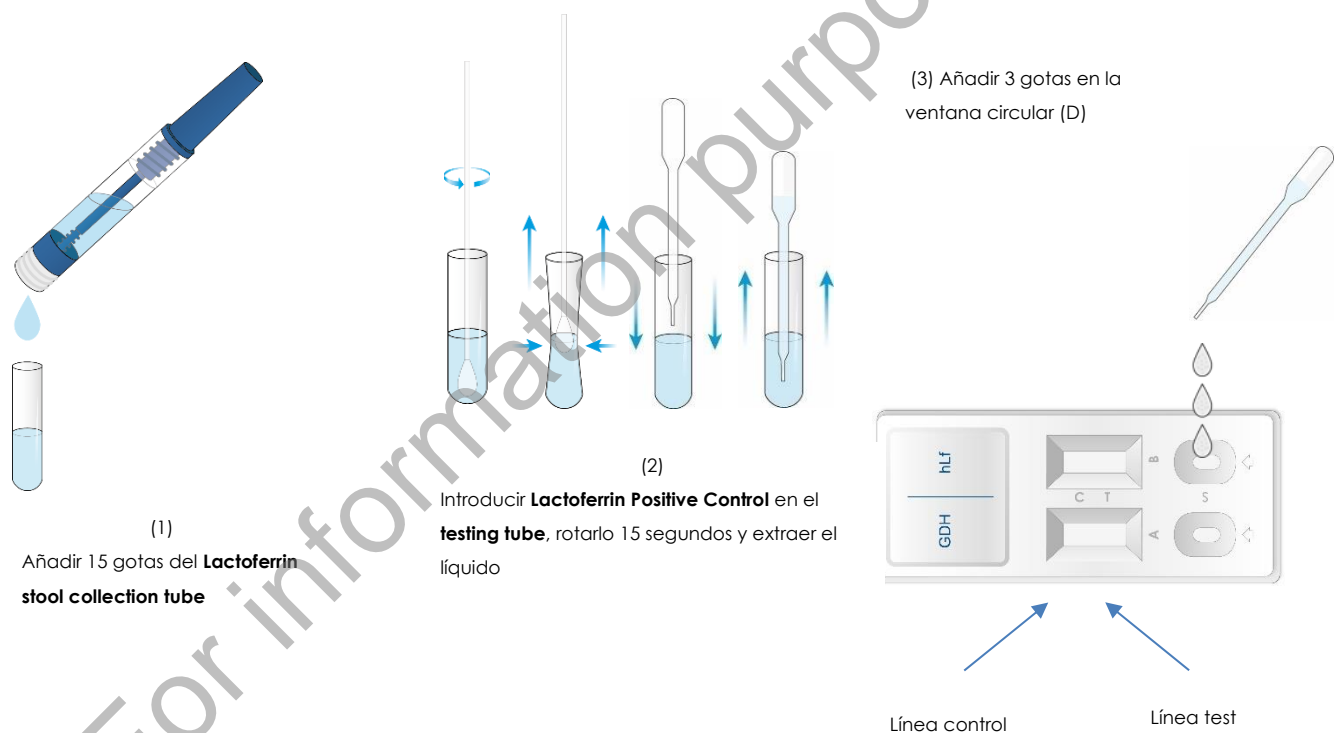
CerTest Lactoferrin Positive Control es un control de calidad externo para **CerTest GDH+Lactoferrin** (Tira B). **CerTest Lactoferrin Positive Control** se debe usar para evaluar que los reactivos y el funcionamiento del test son adecuados.

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

2.1. Procedimiento de uso de Control Positivo

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

1. Tomar el **Lactoferrin stool collection tube**, abrir el tapón 2.
2. Añadir 15 gotas (1) del **Lactoferrin stool collection tube** en el **testing tube** e inmediatamente introducir **CerTest Lactoferrin Positivo Control**.
3. Mezclar la solución rotando **CerTest Lactoferrin Positivo Control** contra las paredes del **testing tube** al menos 15 segundos. Extraer la máxima cantidad de líquido de **CerTest Lactoferrin Positivo Control**, presionándolo contra las paredes del **testing tube** mientras se retira del vial (2). Desechar **CerTest Lactoferrin Positivo Control**.
4. Sacar el **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card test) de su envase sellado antes de utilizarlo.
5. Usar una **disposable pipette** diferente para cada control. Dispensar 3 gotas del **testing tube** en la ventana circular marcada con la letra B (3).
6. **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 lo establecido por su laboratorio para los procedimientos de control de calidad.

A.1 Interpretación del procedimiento del control positivo

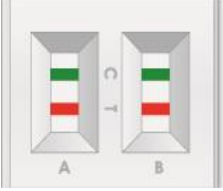
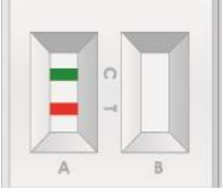
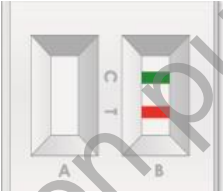

CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control	CerTest Lactoferrin Positive Control		Interpretación de los resultados
1.	POSITIVO (Un dispositivo para ambos controles positivos)		Aparecerán una línea VERDE (línea de control (C)) y una línea ROJA (línea de test (T)) en la ventana de resultados durante el desarrollo del test debido a la presencia de antígenos en CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control y CerTest Lactoferrin Positive Control .
	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	
2.	POSITIVO (Un dispositivo para CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control)		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 antígeno GDH en CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control .
	VERDE-ROJO	-	
3.	POSITIVO (Un dispositivo para CerTest Lactoferrin Positive Control)		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 lactoferrina en CerTest Lactoferrin Positive Control .
	-	VERDE-ROJO	
4.	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 C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control y CerTest Lactoferrin 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.

Table A 2.3 Interpretación de los resultados de CerTest GDH+Lactoferrin.

ANEXO 3

KIT 20 CARD GDH+LACTOFERRIN. Referencia: GF882001VFCC

Anexo para la siguiente referencia:

PRODUCTO	REFERENCIA
CerTest GDH+Lactoferrin Combo Card (20 tests kit with stool vials + PC + NC)	GF882001VFCC

Tabla A 3. Referencia para kit 20 carcassas de CerTest GDH+Lactoferrin con control positivo y negativo.

I. Materiales

MATERIALES SUMINISTRADOS	MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS
<ul style="list-style-type: none"> - 20x CerTest GDH+Lactoferrin (formato combo card test) - 20x GDH stool collection tubes (con diluyente) - 20x Lactoferrin stool collection tubes (con diluyente) - 1x CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control - 1x CerTest Lactoferrin Positive Control - 1x CerTest Negative Control - 3x Testing tube - x 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.

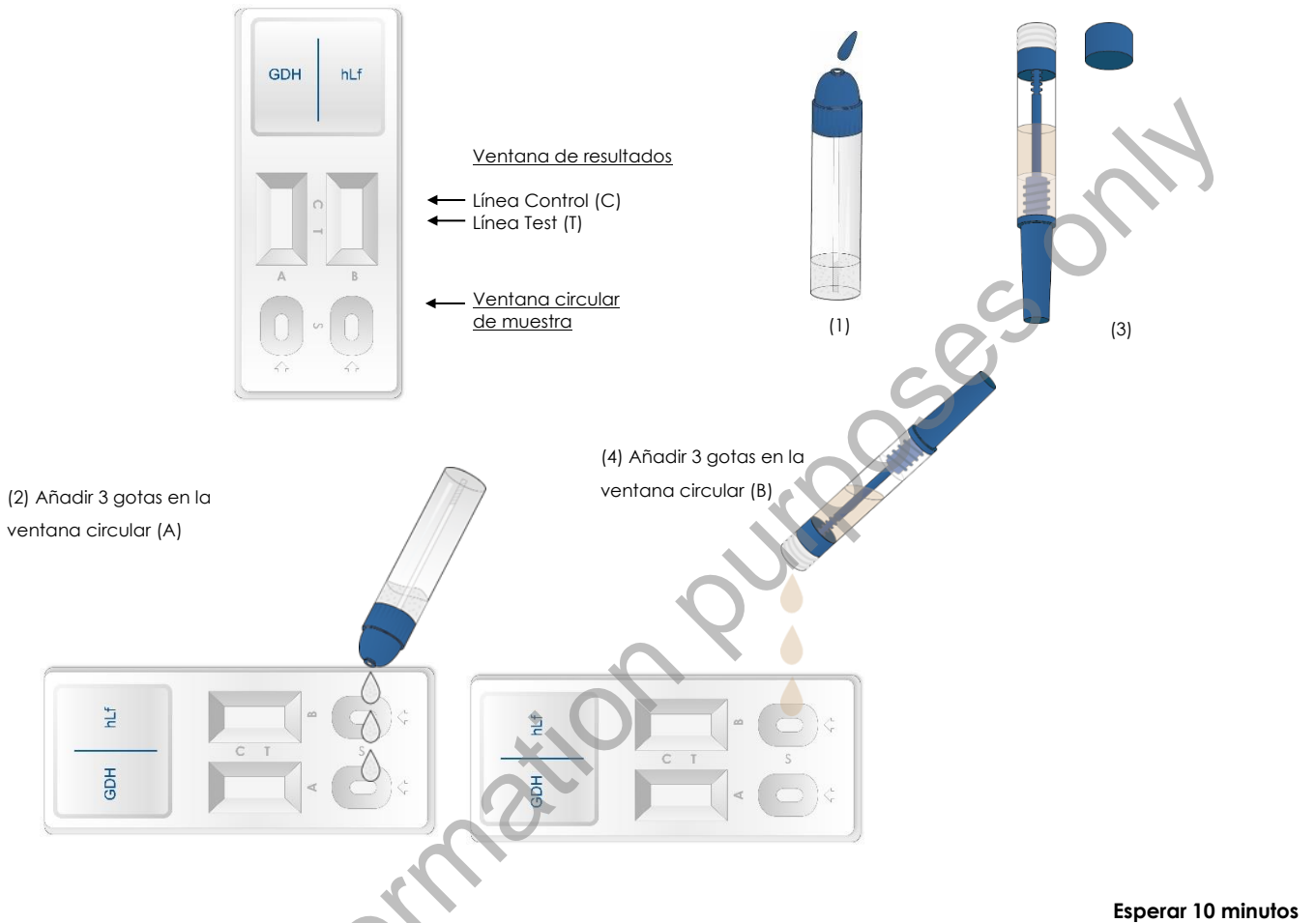
II. Procedimiento (muestras)

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** (ambos tipos) para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el **CerTest GDH+Lactoferrin** (formato combo card test) de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el **GDH stool collection tube**, cortar la punta del tapón (1) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (2), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. Tomar el **Lactoferrin stool collection tube**, abrir el tapón 2 (3) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra B (4), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.

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.

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.



III. Interpretación de los resultados

(por favor, fíjese en el siguiente dibujo)

	GDH	Lactoferrin		Interpretation of the results
1.	NEGATIVO	NEGATIVO		<p>No hay presencia de GDH ni de lactoferrina humana. 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	VERDE		
	POSITIVO	POSITIVO		


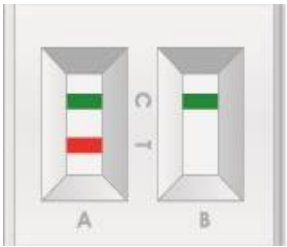
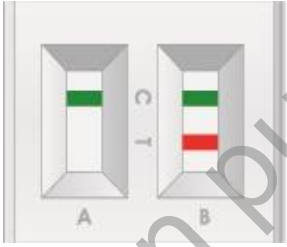
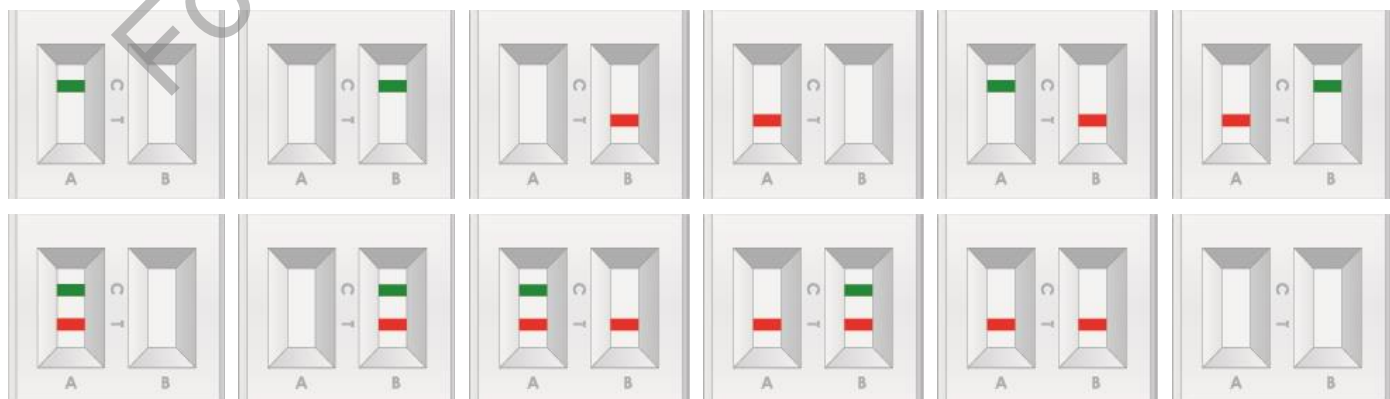
	GDH	Lactoferrin		Interpretation of the results
2.	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO		<p>Hay presencia de GDH y de lactoferrina humana. Posible infección causada por <i>Clostridium difficile</i>, y existe inflamación intestinal.</p> <p>La presencia de estas líneas (línea verde de control y roja de test), independientemente 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.	POSITIVO	NEGATIVO		<p>Hay presencia de GDH. 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	VERDE		
4.	POSITIVO	POSITIVO		<p>Hay presencia de lactoferrina humana. Posible inflamación intestinal.</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	VERDE-ROJO		
5.	INVÁLIDO	INVÁLIDO	Véase debajo de esta tabla.	<p>Resultado no válido ya sea A o B, recomendamos repetir el ensayo utilizando la misma muestra con otro test.</p> <p>Cualquier resultado leído tras más de 10 minutos será considerado inválido.</p>
	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado		

Tabla A 3.2 Interpretación de los resultados de CerTest GDH+Lactoferrin.

RESULTADOS NO VÁLIDOS



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 GDH+Lactoferrin (combo card test) presenta cuatro 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: HISOPOS CONTROL POSITIVO E HISOPO CONTROL NEGATIVO

Control positivo externo: CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control y CerTest Lactoferrin Positive Control (hisopos control positivo).

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

A. Controles positivos externos

Se recomienda utilizar el mismo dispositivo para ambos controles positivos externos.

1. CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control

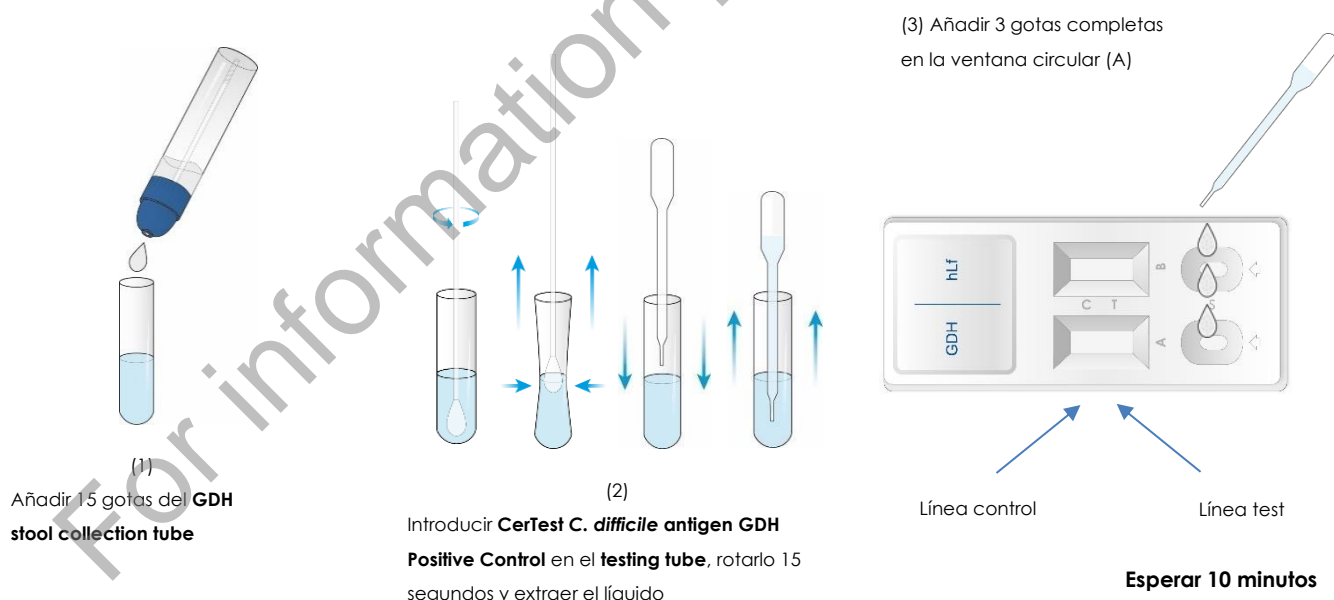
CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control es un control de calidad externo para **CerTest GDH+Lactoferrin** (Tira A). **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control** se debe usar para evaluar que los reactivos y el funcionamiento del test son adecuados.

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.

1.1. Procedimiento de uso de 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. Tomar el **GDH stool collection tube**, cortar la punta del tapón.
2. Añadir 15 gotas (1) de **GDH stool collection tube** en el **testing tube** e inmediatamente introducir **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control**.
3. 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 del vial (2). Desechar **CerTest C. difficile antigen GDH Positive Control**.
4. Sacar el **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card test) de su envase sellado antes de utilizarlo.
5. Usar una **disposable pipette** diferente para cada control. Dispensar 3 gotas del **testing tube** en la ventana circular marcada con la letra A (3).
6. **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.



2. CerTest Lactoferrin Positive Control

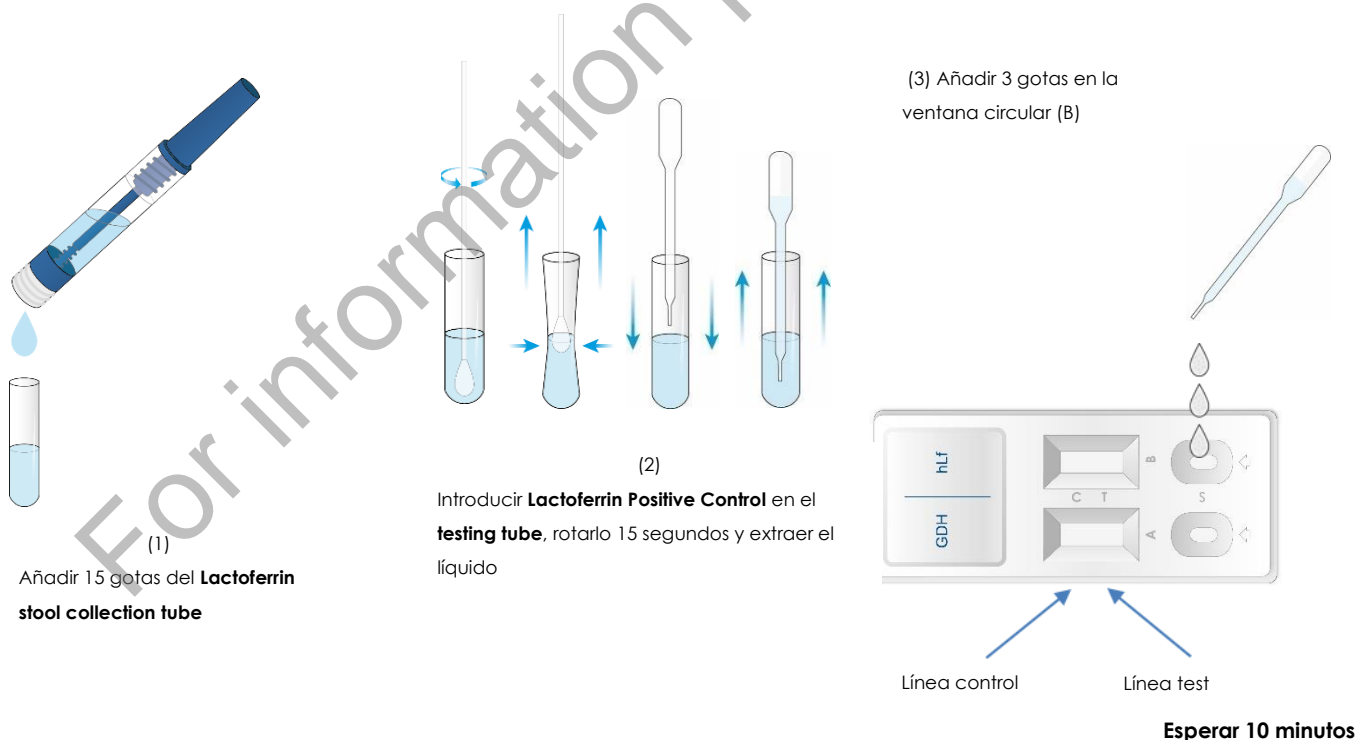
CerTest Lactoferrin Positive Control es un control de calidad externo para **CerTest GDH+Lactoferrin** (Tira B). **CerTest Lactoferrin Positive Control** se debe usar para evaluar que los reactivos y el funcionamiento del test son adecuados.

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

2.1. Procedimiento de uso de Control Positivo


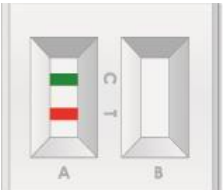


Previamente los tests y CerTest Lactoferrin Positive Control se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir el envase hasta el momento de la prueba.

1. Tomar el **Lactoferrin stool collection tube**, abrir el tapón 2.
2. Añadir 15 gotas (1) del **Lactoferrin stool collection tube** en el **testing tube** e inmediatamente introducir **CerTest Lactoferrin Positive Control**.
3. Mezclar la solución rotando **CerTest Lactoferrin Positive Control** contra las paredes del **testing tube** al menos 15 segundos. Extraer la máxima cantidad de líquido de **CerTest Lactoferrin Positive Control**, presionándolo contra las paredes del **testing tube** mientras se retira del vial (2). Desechar **CerTest Lactoferrin Positive Control**.
4. Sacar el **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card test) de su envase sellado antes de utilizarlo.
5. Usar una **disposable pipette** diferente para cada control. Dispensar 3 gotas del **testing tube** en la ventana circular marcada con la letra B (3).
6. **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 Interpretación del procedimiento del control positivo

CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control	CerTest Lactoferrin Positive Control		Interpretación de los resultados
1.	POSITIVO (Un dispositivo para ambos controles positivos)		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 en CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control y CerTest Lactoferrin Positive Control .
2.	POSITIVO (Un dispositivo para CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control)		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 antígeno GDH en CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control .
3.	POSITIVO (Un dispositivo para CerTest Lactoferrin Positive Control)		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 lactoferrina en CerTest Lactoferrin Positive Control .
4.	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 C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control y CerTest Lactoferrin Positive Control . Si la situación se repitiera, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor.

CerTest C. <i>difficile</i> antigen GDH Positive Control	CerTest Lactoferrin Positive Control		Interpretación de los resultados
			Cualquier resultado leído tras más de 10 minutos será considerado inválido.

Table A 3.3 Interpretación de los resultados

B. Control negativo externo. CerTest Negative Control

CerTest Negative Control es un control de calidad externo para **CerTest GDH+Lactoferrin** (Tira A y B). **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.

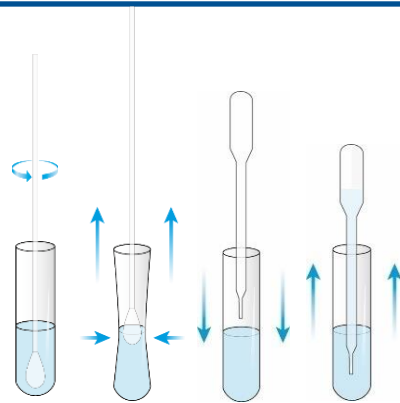
Para GDH:

1. Añadir 15 gotas (1) de diluyente del **GDH 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 del **CerTest Negative Control** presionándolo contra las paredes del **testing tube** mientras se retira. Desechar **CerTest Negative Control**.
3. Sacar **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card test) de su envase sellado antes de utilizarlo.
4. Usar una **disposable pipette** y un test diferente para cada control. Añadir 3 gotas a partir del **testing tube** en la ventana circular marcada con la letra A (3).
5. **Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos.



(1)

Añadir 15 gotas de **GDH stool collection tube**



(2)

Introducir **CerTest Negative Control** en el **testing tube**, rotarlo 15 segundos y extraer el líquido.

(3) Añadir 3 gotas en la ventana circular (A)



Esperar 10 minutos

Línea control

Línea test

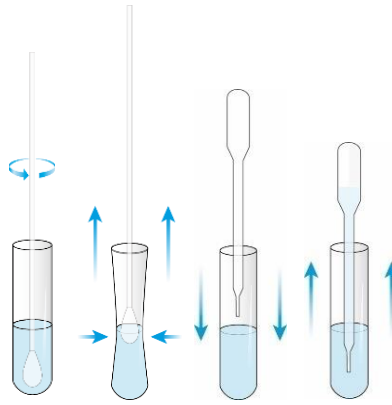
Para Lactoferrina:

1. Añadir 15 gotas (1) de diluyente del **Lactoferrin 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 del **CerTest Negative Control** presionándolo contra las paredes del **testing tube** mientras se retira. Desechar **CerTest Negative Control**.
3. Sacar **CerTest GDH+Lactoferrin** (combo card test) de su envase sellado antes de utilizarlo.
4. Usar una **disposable pipette** y un test diferente para cada control. Añadir 3 gotas a partir del **testing tube** en la ventana circular marcada con la letra B (3).
5. **Leer el resultado a los 10 minutos**. No leer el resultado superados los 10 minutos.



(1)

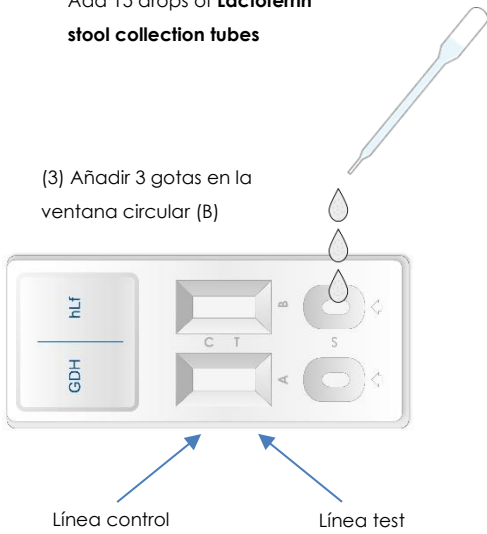
Add 15 drops of **Lactoferrin stool collection tubes**



(2)

Introducir **CerTest Negative Control** en el **testing tube**, rotarlo 15 segundos y extraer el líquido.

(3) Añadir 3 gotas en la ventana circular (B)

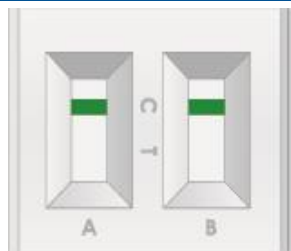


Esperar 10 minutos

Los controles negativos 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.

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 (Sólo aparece la línea de Control)	



	CerTest Negative Control		Interpretación de los resultados
2.	INVÁLIDO	<p>Resultado no válido ya sea A o B recomendamos repetir el ensayo utilizando el mismo muestra con otra prueba.</p>	<p>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.</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 3.4 Interpretación de los resultados de CerTest Negative Control.

For information purposes only

11. Reference/Bibliografía

1. Vaishnavi C. **Clinical spectrum & pathogenesis of Clostridium difficile associated diseases.** Indian J Med Res. 2010;131(4):487–99.
2. Fitzsimmons. **Independent evaluation of a GDH enzyme immunoassay for C. difficile screening.** Biomed Sci. 2011;(October):698–700.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Angriman I, Scarpa M, D'Incà R, Basso D, Ruffolo C, Polese L, et al. **Enzymes in feces: Useful markers of chronic inflammatory bowel disease.** Clin Chim Acta. 2007;381(1):63–8.
7. Guerrant RL, Araujo V, Soares E, Kotloff K, Lima AAM, Cooper WH, et al. **Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes.** J Clin Microbiol. 1992;30(5):1238–42.
8. 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				

Change Control/Control de Cambios		
Version/Versión	Changes/Cambios	Date/Fecha
00	Updated new IFU format and IFU codification / Adaptación nuevo formato de instrucción de uso y codificación	03/04/2023

Table A 4. Change control table/ Tabla de Control de Cambio

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.00