
CERTEST GDH+ Lactoferrin

ONE STEP
GDH+Lactoferrin COMBO CARD
TEST

CERTEST BIOTEC S.L.



ENGLISH**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.

INTRODUCTION

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

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

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

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

Lactoferrin is a glycoprotein component of neutrophil secondary granules, a primary component of the acute inflammatory response and is released from fecal 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 diarrhea may be caused by *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* and *Clostridium difficile*.

TEST PRINCIPLE

CerTest GDH+Lactoferrin is based on the principle of a qualitative immunochromatographic assay for the determination *Clostridium difficile* Glutamate Dehydrogenase (GDH) and human lactoferrin (hLf) in stool samples.

Strip A consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against GDH and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-GDH) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming 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 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 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 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 line will be visible in both strips. These bands are used to interpret the result.

If the sample is negative, there is no GDH and lactoferrin antigens 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 line will not appear.

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

STORAGE AND STABILITY

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

PRECAUTIONS

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Reagents contain preservatives. Avoid any contact with skin or mucous membrane. Consult safety data sheet, available on request.
- Components provide in the kit are approved for use in the CerTest GDH+Lactoferrin combo card test. Do not use any other commercial kit component.
- The presence of yellow lines in the results window (control line zone and test line zone), before using the test, is completely normal and does not imply failure of the test functionality.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool samples should be collected in clean containers. The samples can be stored in the refrigerator (2-8°C) for 7 days prior to testing. For longer storage, maximum 6 months, the specimen must be kept frozen at -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 for GDH antigen. Homogenise stool sample as thoroughly as possible prior to preparation.

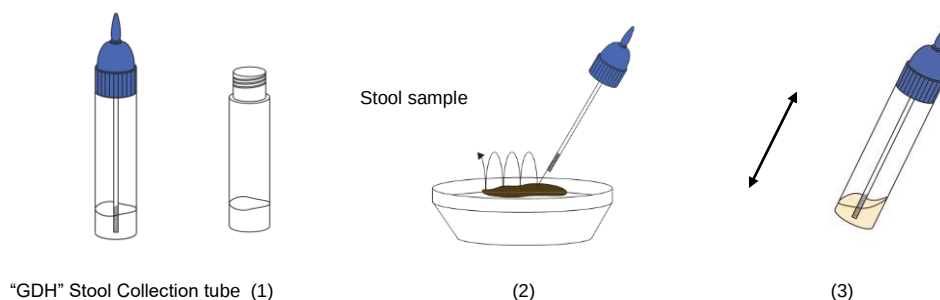
Please take note that there are two different stool collection tubes.

a. "GDH" stool collection tubes (without reducer piece).



Specimen preparation (see illustration):

1. Take out the cap of the stool collection tube (1) and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Then, introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample (2) making sure that, at each insertion, only the stick's screw is covered with the sample to take the appropriate amount of faecal sample and add it to the stool collection tube. Any additional sample that exceeds the stick's screw could cause wrong results. For liquid samples, add approx. 125µL in the stool collection tube using a micropipette.
2. Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (3).

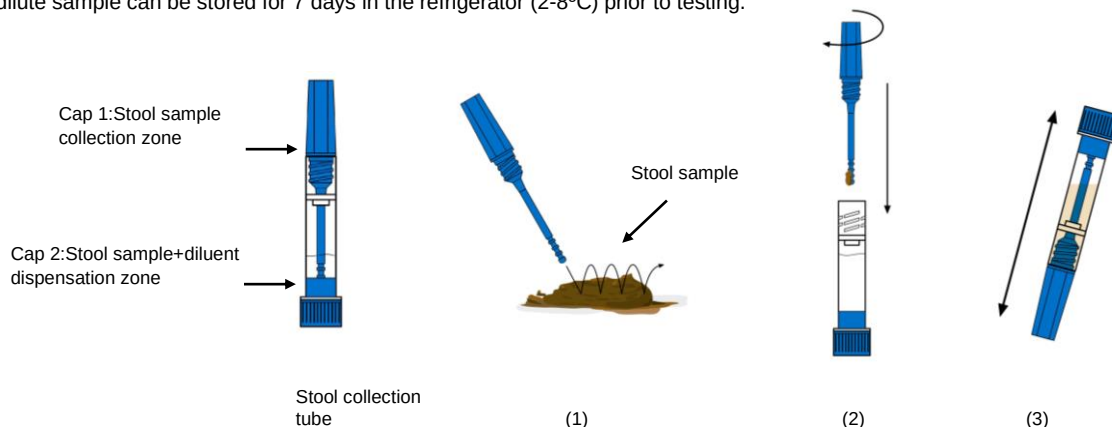


b. “Lactoferrin” stool collection tubes (with a reducer piece).



Specimen preparation (see illustration):

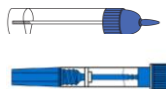
1. Take out the cap 1 of the stool collection tube and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample (1), making sure that, in each insertion, the stick's screw is covered with the sample to take the appropriate amount of stool. Then, introduce the sample in the stool collection tube (2). For liquid samples, add approx. 20µL in the stool collection tube using a micropipette.
2. Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (2). The stool collection tube with dilute sample can be stored for 7 days in the refrigerator (2-8°C) prior to testing.



MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- CerTest GDH+Lactoferrin combo card tests
- Instructions for use
- “GDH” stool collection tubes with diluent
- “Lactoferrin” stool collection tubes with diluent



MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

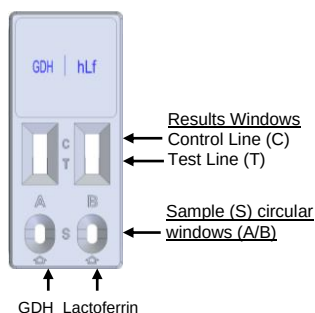
- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

TEST PROCEDURE

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

1. Proceed to shake both stool collection tubes 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 (4) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter A (5). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. Take the “Lactoferrin” stool collection tube, open the cap 2 (6) and dispense 3 drops in the circular window marked with the letter B (7). Avoid adding solid particles with the liquid.
5. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes.

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

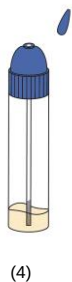


CERTEST GDH+Lactoferrin

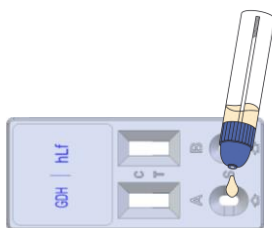
One Step test to detect *Clostridium difficile* antigen GDH and human lactoferrin in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno GDH de *Clostridium difficile* y lactoferrina humana en formato cassette

GDH Strip A-procedure

Add 3 drops in A-circular window



(4)



(5)



(6)

Lactoferrin Strip B-procedure

Add 3 drops in B-circular window



(7)

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

- A: Green → Negative GDH
B: Green → Negative Lactoferrin
- A: Green/Red → Positive GDH
B: Green/Red → Positive Lactoferrin
- A: Green/Red → Positive GDH
B: Green → Negative Lactoferrin
- A: Green → Negative GDH
B: Green/Red → Positive Lactoferrin

INVALID RESULTS

-

	A (GDH)	B (Lactoferrin)	Interpretation of the results
1.	- GREEN	- GREEN	There are no GDH and human lactoferrin presence which might mean no <i>Clostridium difficile</i> infection.
2.	+ GREEN-RED	+ GREEN-RED	There are GDH and human lactoferrin presence which might mean <i>Clostridium difficile</i> infection (clinical severe disease), intestinal inflammation associated with other infections (<i>Campylobacter</i> , <i>Salmonella</i> and <i>Shigella</i> spp.) or non-infectious causes of intestinal inflammation (ulcerative colitis, gastrointestinal bleeding, duodenal ulcer, etc.).
3.	+ GREEN-RED	- GREEN	Infection caused by <i>Clostridium difficile</i> which might mean milder diarrhoea or possible carrier of disease.
4.	- GREEN	+ GREEN-RED	There is human lactoferrin presence which might mean an intestinal inflammation associated with other infections (<i>Campylobacter</i> , <i>Salmonella</i> and <i>Shigella</i> spp.) or non-infectious causes of intestinal inflammation (ulcerative colitis, gastrointestinal bleeding, duodenal ulcer, etc.).
5.	Any other result	Any other result	Invalid result, either A or B, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.



CERTEST GDH+Lactoferrin

One Step test to detect *Clostridium difficile* antigen GDH and human lactoferrin in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno GDH de *Clostridium difficile* y lactoferrina humana en formato cassette

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

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

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

QUALITY CONTROL

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

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours after opening the sealed bag.
2. An excess of sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the diluent and repeat the test.
3. The intensity of test line may vary from very strong at high antigens concentration to faint when the antigens concentration is close to the detection limit value of the test.
4. CerTest 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. 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.
6. 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.
7. Positive results determine the presence of *Clostridium difficile* and human lactoferrin in faecal samples and corroborate an intestinal inflammation associated with advanced *Clostridium difficile* infection (severe disease); nevertheless, it can be due to toxigenic or non-toxigenic strains of *Clostridium difficile*. A positive result should be followed up with additional laboratory techniques (toxigenic culture) to determine the strain. A confirmed infection should only be made by a physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated and must be based in the correlation of the results with further clinical observations.
8. A negative result is not meaningful because of it is possible the antigens concentration in the stool samples is lower than the detection limit value. If the symptoms or situation still persist, a *Clostridium difficile* determination should be carried out on a sample from an enrichment culture. Negative results do not exclude inflammation, some diseases such as celiac sprue and microscopic colitis polyps that involve mainly monocuclear inflammation.
9. Bloody stool samples can contain components that may cause non-specific reactions in the test. Every bloody stool sample whose result is positive should be followed up with other techniques of diagnosis to confirm the result.
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.

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.

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity

Detection limit value of CerTest GDH+Lactoferrin (GDH strip) is: 0.78 – 0.10 ng/mL for *Clostridium difficile* GDH recombinant protein.

Cut-off value of CerTest GDH+Lactoferrin (Lactoferrin strip) is: 100ng/mL (10µg hLf/g faeces) for human lactoferrin.

Clinical sensitivity and specificity

An evaluation, with faecal samples, was performed comparing the results obtained by an immunochromatographic test (CerTest GDH+Lactoferrin, CerTest) and an Evaluation Criteria (for strip A:GDH). The evaluation criteria: three lateral flow test were evaluated (CerTest GDH+Lactoferrin (strip: GDH) and other two rapid test from the competitors), the discrepant result were confirmed by qPCR technique.



CERTEST GDH+Lactoferrin

*One Step test to detect Clostridium difficile antigen GDH and human lactoferrin in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno GDH de Clostridium difficile y lactoferrina humana en formato cassette*

CerTest GDH+Lactoferrin (strip B: Lactoferrin) were evaluated with a commercial ELISA test (Human Lactoferrin ELISA kit, ICL). The results were as follows:

		Evaluation Criteria		
IC test: CerTest GDH+Lactoferrin (Strip A: GDH)		+	-	Total
	+	51	0	51
	-	0	75	75
	Total	51	75	126

CerTest GDH+Lactoferrin (Strip A: GDH) vs Evaluation Criteria		
	Mean Value	95% CI (confidence interval)
Sensitivity	100.0%	93.0 – 100.0%
Specificity	100.0%	95.2 – 100.0%
PPV	100.0%	93.0 - 100.0%
NPV	100.0%	95.2 –100.0%

Data for cut-off value 10 µg hLf/g

		ELISA test: Human Lactoferrin ELISA kit		
IC test: CerTest GDH+Lactoferrin (Strip B: Lactoferrin)		-	-	Total
	+	27	13	40
	-	3	47	50
	Total	30	60	90

CerTest GDH+Lactoferrin (Strip B: Lactoferrin) vs Human Lactoferrin ELISA kit		
	Mean Value	95% CI (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%

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

The results showed a high sensitivity and specificity to detect *Clostridium difficile* glutamate dehydrogenasa (GDH) and human lactoferrin using CerTest GDH+Lactoferrin.



CERTEST GDH+Lactoferrin

One Step test to detect *Clostridium difficile* antigen GDH and human lactoferrin in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno GDH de *Clostridium difficile* y lactoferrina humana en formato cassette

Cross reactivity

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of CerTest GDH+Lactoferrin; no cross reactivity against gastrointestinal pathogens, other organism, substances and/or faecal markers occasionally present in faeces:

For Strip A: GDH

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

For strip B : Lactoferrin

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



ESPAÑOL**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 lactoferrina (hLf) humana 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 actividad inflamatoria intestinal.

INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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). Puede no existir presencia de diarrea asociada a la infección inflamatoria en la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

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*.

FUNDAMENTO DEL TEST

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

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

Tira B consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a lactoferrina 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) 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-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 presentes en la membrana de la tira B (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá en ambas tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no presenta antígenos de GDH ni lactoferrina humana o los antígenos están presentes en una concentración inferior al valor del límite de detección y no se producirá reacción con ningún complejo coloreado rojo. Los anticuerpos anti-GDH y lactoferrina presentes en las membranas (líneas de test) no capturarán el antígeno-complejo coloreado rojo (no formado) y no aparecerá una línea roja. Independientemente de que la muestra sea positiva o no, la mezcla continuará moviéndose a través de las membranas hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en las líneas de control. Estos anticuerpos anti-proteína específica presentes en ambas membranas capturarán el complejo conjugado de control y las líneas de control verdes siempre aparecerán. La aparición de estas líneas se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente, 2) que el flujo ha sido apropiado y 3) como control interno de los reactivos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

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

PRECAUCIONES

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

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio. Las muestras se deben conservar en frío (2-8°C), durante 7 días, hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 6 meses, deben mantenerse congeladas a -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 para GDH, por lo que, se debe descongelar únicamente la cantidad necesaria de muestra para hacer la prueba. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

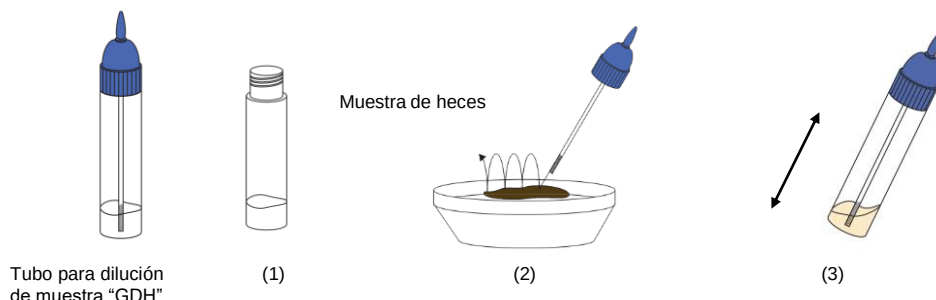
Por favor, observe que hay dos tubos de dilución de muestra diferentes.

- a. Tubo para dilución de muestra "GDH" (sin reductor).



Preparación de la muestra (ver dibujo):

1. Abrir el tubo para dilución de muestra (1) y con ayuda del palito tomar suficiente cantidad de muestra de las heces recogidas. Para ello se introducirá el palito una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra (2), asegurándose de que, en cada inserción, la hélice del palito se cubra con la muestra para tomar la cantidad adecuada de heces y posteriormente se introducirá la muestra en el tubo para dilución de muestra. Si se añade cantidad de muestra adicional que sobrepase la hélice del palito se podrían originar resultados erróneos. Para muestras líquidas, añadida aprox. 125µL en el tubo para dilución de muestra utilizando una micropipeta.
2. Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (3).



b. Tubo para dilución de muestra "Lactoferrina" (con reductor).



Preparación de la muestra (ver dibujo):

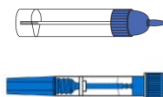
1. Abrir el tapón 1 del tubo para dilución de muestra y con ayuda del palito tomar suficiente cantidad de muestra de las heces recogidas. Para ello se debe introducir el palito una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra (1), asegurándose de que, en cada inserción, la hélice del palito se cubra con la muestra para tomar la cantidad adecuada de heces. A continuación, introducir la muestra en el tubo para dilución de muestra (2). Para muestras líquidas, añada aprox. 20µL en el tubo para dilución de muestra utilizando una micropipeta.
2. Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente (2). Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (3). Este tubo que contiene la muestra diluida puede conservarse en frío (2-8°C) durante 7 días antes de realizar la prueba.



MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest GDH+Lactoferrin combo card tests
- Instrucciones de uso
- Tubos para dilución de muestra "GDH" con diluyente
- Tubos para dilución de muestra "Lactoferrina" con diluyente



MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Recipiente para recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro

PROCEDIMIENTO

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

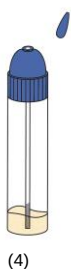
1. Agitar ambos tubos para dilución de muestra para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el test CerTest GDH+Lactoferrin de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el tubo para dilución de muestra "GDH", cortar la punta del tapón (4) y añadir 3 gotas del líquido en la ventana circular marcada con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

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



Procedimiento para la tira A de GDH

Añadir 3 gotas en la ventana circular (A)



(4)



(5)



(6)

Procedimiento para la tira B de Lactoferrina

Añadir 3 gotas en la ventana circular (B)



(7)

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

- A: Verde→Negativo GDH
B: Verde→Negativo Lactoferrina
- A: Verde/Rojo→Positivo GDH
B: Verde/Rojo→Positivo Lactoferrina
- A: Verde/Rojo→Positivo GDH
B: Verde→Negativo Lactoferrina
- A: Verde→Negativo GDH
B: Verde/Rojo→Positivo Lactoferrina

RESULTADOS INVÁLIDOS

-

	A (GDH)	B (Lactoferrina)	Interpretación de los resultados
1.	- VERDE	- VERDE	No hay presencia de GDH ni de lactoferrina humana lo que podría indicar que no existe infección causada por <i>Clostridium difficile</i> .
2.	+ VERDE-ROJO	+ VERDE-ROJO	Existe presencia de GDH y lactoferrina humana lo que podría indicar infección por <i>Clostridium difficile</i> (enfermedad clínica severa), inflamación asociada con otras infecciones (<i>Campylobacter</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Shigella spp.</i>) o causas no infecciosas de la inflamación intestinal (colitis ulcerosa, hemorragia gastrointestinal, úlcera duodenal, etc.).
3.	+ VERDE-ROJO	- VERDE	Infección causada por <i>Clostridium difficile</i> , que podría llevar asociada una diarrea de tipo leve o bien tratarse de un paciente portador de la enfermedad.
4.	- VERDE	+ VERDE-ROJO	Presencia de lactoferrina humana en la muestra que podría significar una inflamación asociada con otras infecciones (<i>Campylobacter</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Shigella spp.</i>) o causas no infecciosas de la inflamación intestinal (colitis ulcerosa, hemorragia gastrointestinal, úlcera duodenal, etc.).
5.	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado	Cualquier resultado inválido, en A o en B: se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

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

OBSERVACIONES

La intensidad de las líneas de color rojo en 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.

CONTROL DE CALIDAD

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

LIMITACIONES

1. Una vez abierto, el test no debe usarse después de 2 horas.
2. Un exceso de muestra de heces puede dar resultados erróneos, dando líneas no muy definidas de color pardo, que no tienen ningún valor diagnóstico. Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
3. La intensidad de la línea del test puede variar desde muy fuerte a alta concentración de antígenos a débil cuando la concentración de antígenos está cerca del valor del límite de detección del test.
4. CerTest 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. Las muestras de heces de pacientes que presenten 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.
6. La lactoferrina es un componente de la leche materna, este test dará positivo en lactantes y no debería utilizarse para evaluar neonatos lactantes.
7. Los resultados positivos determinan la presencia de *Clostridium difficile* y lactoferrina humana en muestras fecales y corrobora una inflamación intestinal asociada con una avanzada infección por *Clostridium difficile* (enfermedad grave); sin embargo, ésta puede ser debida a cepas toxigénicas o no toxigénicas de *Clostridium difficile*. 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.
8. Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de antígeno en la muestra de heces sea inferior al valor del límite de detección. Si los síntomas o la situación persisten, para la determinación de *Clostridium difficile* se debería repetir la prueba con la muestra previamente sometida a enriquecimiento. Los resultados negativos no excluyen de la presencia de inflamación, algunas enfermedades como la enfermedad celiaca y los pólipos microscópicos de colitis pueden presentar principalmente una inflamación mononuclear.
9. Las muestras de heces sanguinolentas contienen componentes de la sangre. Estos componentes 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.

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.

En varios estudios se ha determinado que el valor de cut-off de lactoferrina sea igual o mayor que 10µg hLf/g heces, para permitir detectar pacientes adultos con una patología inflamatoria intestinal los cuales requerirán para su diagnóstico un procedimiento adicional invasivo.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad analítica

El límite de detección de CerTest GDH+Lactoferrin (tira GDH) es: 0,78-0.10ng/mL para *Clostridium difficile* GDH proteína recombinante.

El valor de cut-off de CerTest GDH+ Lactoferrin (tira Lactoferrin) es: 100ng/mL (10µg hLf/g heces) para lactoferrina humana.

Sensibilidad y especificidad clínica

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras de heces, comparando los resultados obtenidos por un test inmunocromatográfico (CerTest GDH+Lactoferrin, CerTest), y un criterio de evaluación (para la tira A: GDH). Criterio de evaluación: tres lateral flow tests se evaluaron (CerTest GDH+Lactoferrin (tira: GDH) y otros dos test de la competencia). Los resultados discrepantes fueron confirmados por la técnica qPCR.

CerTest GDH+Lactoferrin (tira B: Lactoferrin) fue evaluada con un test ELISA comercial (Human Lactoferrin ELISA kit, ICL).

Los resultados se muestran a continuación:

		Criterio de evaluación		
IC test: CerTest GDH+Lactoferrin (Tira A: GDH)		+	-	Total
	+	51	0	51
	-	0	75	75
	Total	51	75	126

CerTest GDH+Lactoferrin (Tira A: GDH) vs Criterio evaluación		
	Valor Medio	95% Intervalo Confianza
Sensibilidad	100.0%	93.0 – 100.0%
Especificidad	100.0%	95.2 – 100.0%
VPP	100.0%	93.0 - 100.0%
VPN	100.0%	95.2 –100.0%

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

		ELISA test: Human Lactoferrin ELISA kit		
IC test: CerTest Lactoferrin (Tira B: Lactoferrin)		+	-	Total
	+	27	13	40
	-	3	47	50
	Total	30	60	90

CerTest Lactoferrin (Tira B: Lactoferrin) vs Human Lactoferrin ELISA kit		
	Valor Medio	95% intervalo de confianza
Sensibilidad	90.0%	73.5 – 97.9%
Especificidad	78.3%	65.8 – 87.9%
VPP	67.5%	50.9 – 81.4%
VPN	94.0%	83.5 –98.7%

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).

Los resultados mostraron que CerTest GDH+Lactoferrin presentan una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Clostridium difficile* antígeno GDH y lactoferrina humana.

Reacciones cruzadas

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

Para la tira A: GDH

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

Para la tira B: Lactoferrin

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

REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

1. WREN, M.W.D, et al. "Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. An evaluation of tests for faecal toxin, glutamate dehydrogenase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory". British Journal of Biomedical Science, 66 (1), 2009.
2. VAISHNAVI, Ch., "Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases". Indican J. Med. Res. 131, April 2010, pp 487-499.
3. Angriman I. et al. Enzymes in feces: Useful markers of chronic inflammatory bowel disease. Clinica Chimica Acta 381 Feb 2007, p. 63-68.
4. Guerrant R. et al. Measurement of Fecal Lactoferrin as a Marker of Fecal Leukocytes. Journal of Clinical Microbiology, Vol 30 No 5; May 1992, p. 1238-1242.
5. Langhorst, M.D. et al. Noninvasive Markers in the Assessment of Intestinal Inflammation in Inflammatory Bowel Diseases: Performance of Fecal Lactoferrin, Calprotectin and PMN-Elastase, CRP, and Clinical Indices. Am. J. Gastroenterol. 2008; Vol 103, p. 162-169.



CERTEST GDH+Lactoferrin

*One Step test to detect Clostridium difficile antigen GDH and human lactoferrin in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección del antígeno GDH de Clostridium difficile y lactoferrina humana en formato cassette*

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

	In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico in vitro		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test		Sample diluent Diluyente de muestra		Catalogue number Número de referencia
	Do not re-use No reutilizar		CE marking/ Marcado CE						





CerTest
BIOTEC S.L.

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



F-368 rev00