
CERTEST
Clostridium difficile
antigen GDH

ONE STEP *Clostridium difficile*
antigen GDH CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.

CerTest
BIOTEC



CERTEST *Clostridium difficile* antigen GDH

One Step test to detect *Clostridium difficile* antigen GDH in card format/
Prueba de un solo paso para detección del antígeno GDH de *Clostridium difficile* en formato cassette

ESPAÑOL

USO PREVISTO

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

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

INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

FUNDAMENTO DEL TEST

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

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

Si la muestra es positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-GDH-microesferas rojas de látex) el cual ha sido secado previamente en el material absorbente. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados. Los anticuerpos anti-GDH presentes en la membrana (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá. Esta línea se utilizará para interpretación del resultado.

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

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

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).



CERTEST *Clostridium difficile* antigen GDH

*One Step test to detect Clostridium difficile antigen GDH in card format/
Prueba de un solo paso para detección del antígeno GDH de Clostridium difficile en formato cassette*

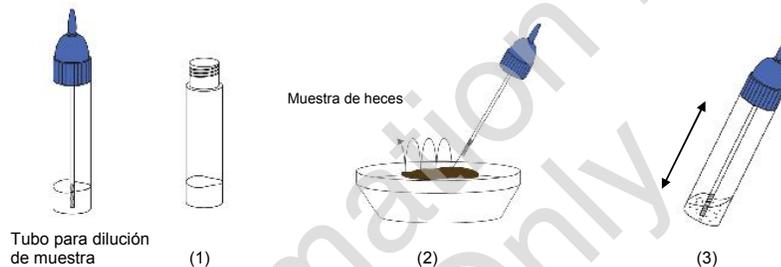
- Los reactivos contienen conservantes. Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consultar fichas de seguridad, disponibles bajo petición.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH test. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No comer, ni beber o fumar en la zona de trabajo.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio. Las muestras se deben conservar en frío (2-8°C), máximo durante 7 días, hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 1 año, 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, por lo que, se debe descongelar únicamente la cantidad necesaria de muestra para hacer la prueba. Homogeneizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Preparación de la muestra (ver dibujo):

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



MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH card tests
- Instrucciones de uso
- Tubos para dilución de muestra con diluyente

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Recipiente para recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro

PROCEDIMIENTO

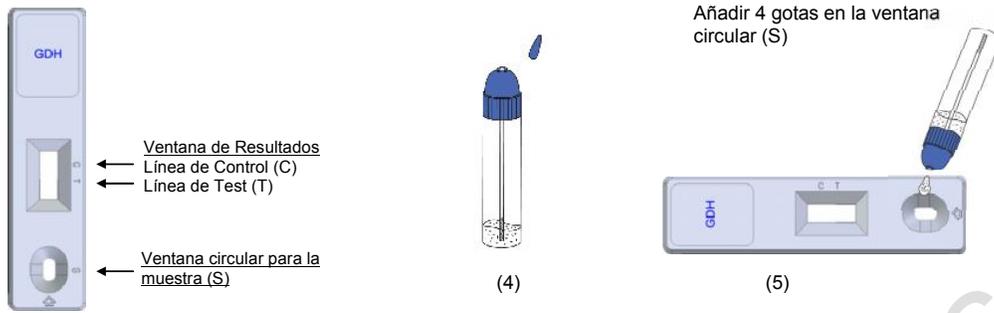
Previamente los tests, las muestras de heces y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

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

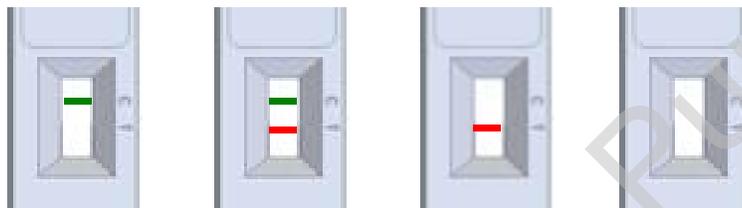
Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas, agitar con el palito la muestra en la ventana (S). Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados.

CERTEST *Clostridium difficile* antigen GDH

One Step test to detect *Clostridium difficile* antigen GDH in card format/
Prueba de un solo paso para detección del antígeno GDH de *Clostridium difficile* en formato cassette



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



1. NEGATIVO 2. POSITIVO 3. INVÁLIDO 4. INVÁLIDO

	GDH	Interpretación de resultados
1.	- VERDE	No hay presencia de <i>Clostridium difficile</i> . No hay infección causada por <i>Clostridium difficile</i> .
2.	+ VERDE-ROJO	Hay presencia de <i>Clostridium difficile</i> . Infección por <i>Clostridium difficile</i> , que podría llevar asociada una diarrea de tipo leve o grave (colitis) provocada por <i>Clostridium difficile</i> , o bien tratarse de un paciente asintomático portador de la enfermedad.
3.	Cualquier otro resultado	Resultado inválido, se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

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.

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 antígeno presente en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de antígeno pueden ser determinados por la misma.

CONTROL DE CALIDAD

El control interno de funcionamiento viene incluido en la prueba. La línea verde que aparece en 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.



CERTEST *Clostridium difficile* antigen GDH

One Step test to detect *Clostridium difficile* antigen GDH in card format/
Prueba de un solo paso para detección del antígeno GDH de *Clostridium difficile* en formato cassette

LIMITACIONES

- Una vez abierto, el test no debe usarse después de 2 horas.
- Un exceso de muestra de heces puede dar resultados erróneos, dando líneas no muy definidas de color pardo, que no tienen ningún valor diagnóstico. Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
- La intensidad de la línea del test puede variar desde muy fuerte a alta concentración de antígeno a débil cuando la concentración de antígeno está cerca del valor del límite de detección del test.
- CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH debería utilizarse sólo con muestras de heces humanas. El uso de otras muestras no ha sido determinado. La calidad del test depende de la calidad de la muestra; por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras fecales.
- Los resultados positivos determinan la presencia de *Clostridium difficile* en muestras de heces; sin embargo, ésta puede ser debida a cepas toxigénicas o no-toxigénicas de *Clostridium difficile*. Un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas diagnósticas (cultivo toxigénico) para determinar la cepa. La infección debe confirmarse por un especialista o médico cualificado, tras evaluar las pruebas clínicas y los hallazgos de laboratorio teniendo en cuenta la correlación que puede existir con todas las observaciones clínicas.
- Un resultado negativo no se puede considerar como concluyente, puede darse que la concentración de antígeno en muestras fecales sea inferior al valor del límite de detección. Si los síntomas o la situación persisten, para la determinación de *Clostridium difficile* se debería repetir la prueba con la muestra previamente sometida a enriquecimiento.

VALORES ESPERADOS

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

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad analítica (límite de detección)

El límite de detección de CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH es 0,8ng/mL.

Sensibilidad y especificidad clínica

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

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

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH vs <i>C. DIFF QUIK CHEK Complete®</i>	>99%	>99%	>99%	>99%





CERTEST *Clostridium difficile* antigen GDH

One Step test to detect *Clostridium difficile* antigen GDH in card format /
Prueba de un solo paso para detección del antígeno GDH de *Clostridium difficile* en formato cassette

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

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

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest <i>Clostridium difficile</i> antigen GDH vs Wampole™ C. Diff Chek™-60	>95%	>99%	>99%	96%

Los resultados mostraron que CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Clostridium difficile* glutamato deshidrogenasa (GDH).

Reacciones cruzadas

Se realizó una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas del test CerTest *Clostridium difficile* antigen GDH; no se detectó reacción cruzada con patógenos gastrointestinales ocasionalmente presentes en las heces:

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





CERTEST *Clostridium difficile* antigen GDH

One Step test to detect *Clostridium difficile* antigen GDH in card format /
Prueba de un solo paso para detección del antígeno GDH de *Clostridium difficile* en formato cassette

REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

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

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

 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	 DIL Sample diluent Diluyente de muestra	 Catalogue number Número de referencia

