

C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest®

MO-076012 20 TESTS

Test inmunocromatográfico en un solo paso para la detección cualitativa de la Glutamato Deshidrogenasa de *Clostridium difficile* en heces humanas



Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*. Conservar a 2 - 30°C.

USO PREVISTO

El inmunoensayo cromatográfico C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest es un test rápido para la detección cualitativa de la Glutamato Deshidrogenasa (GDH) de *Clostridium difficile* en heces humanas. Una señal positiva del test indica la presencia de *Clostridium difficile* en la muestra fecal. Un posterior análisis de la muestra con un test para la detección de las toxinas de *C. difficile* (como puede ser el test MO-076011 C. DIFFICILE TOXINS A+B MonlabTest) confirma si la cepa es toxigénica y, por tanto, patógena, causante de la enfermedad.

El test está basado en la captura inmunológica de micropartículas coloreadas a su paso a través de una membrana sobre la que se ha inmovilizado un anticuerpo monoclonal específico frente a la GDH de *C. difficile*.

RESUMEN

Clostridium difficile es una bacteria anaerobia grampositiva con capacidad de formar esporas y presente de manera asintomática hasta en un 5% de la población sana¹. A causa de las hospitalizaciones, la tasa de portadores puede elevarse hasta un 30%.

Se considera que *C. difficile* es el responsable de aproximadamente un 25% de las diarreas relacionadas con el consumo de antibióticos² entre los que se encuentran la clindamicina, segunda y tercera generación de cefalosporinas, inhibidores de girasa, ampicilina, amoxicilina,... Además de los síntomas diarreicos, la enfermedad puede derivar en colitis pseudomembranosa (PMC) que necesita urgentemente un tratamiento con antibióticos eficaces frente a *C. difficile* (metronidazol, vancomicina) ya que puede llegar a comprometer la vida del individuo. La mortalidad asociada a CDI puede ir desde el 6% hasta el 30%, sobre todo si el paciente sufre de PMC.

C. difficile libera dos toxinas de alto peso molecular³, la toxina A y la toxina B, siendo los principales factores de virulencia responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad CDI.

La Glutamato Deshidrogenasa (GDH) es una enzima producida en grandes cantidades por las cepas de *C. difficile* (toxigénicas y no toxigénicas) lo que la convierte en un excelente marcador para determinar la presencia de este microorganismo⁴.

La Sociedad de Salud Epidemiológica de Norteamérica (SHEA), la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) y la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID) proponen el uso de un protocolo de dos pasos para la identificación de *C. difficile* toxigénico⁵.

Un screening inicial de la muestra con un test para GDH y, si el resultado es positivo, el empleo de un segundo test para la determinación de toxinas de *C. difficile* pues no todas las cepas de este microorganismo producen toxinas. MONLAB ofrece la posibilidad de seguir este protocolo recomendado por algunas de las principales sociedades sanitarias empleando sus tests de GDH y C. DIFFICILE TOXINS A+B (para las toxinas)

PRINCIPIO DEL MÉTODO

C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest utiliza una combinación de:

- partículas de látex rojas conjugadas a anticuerpos específicos frente a la GDH de *C. difficile* que cooperan con otros anticuerpos específicos para GDH situados en la membrana del test, bajo la banda de control.
- partículas de látex azules conjugadas a un antígeno reconocido por un anticuerpo específico para dicho antígeno unido a la membrana conformando la llamada banda de control del test.

En este test la muestra se trata, en primer lugar, con el tampón diluyente de la muestra (incluido en este kit) para conseguir la extracción de la GDH a partir de la matriz fecal. Tras la extracción, sólo se necesita añadir un volumen determinado de sobrenadante en la tira reactiva y esperar 10 minutos.

Cuando la muestra extraída fluye a través de la membrana del test, las partículas coloreadas migran.

En el caso de una muestra positiva, los anticuerpos específicos presentes en la membrana capturarán las partículas coloreadas recubiertas por el antígeno.

Diferentes líneas de color (azul -control- y roja -test-) serán visibles. Estas líneas se usan para interpretar el resultado a los 10 minutos de incubación del test a temperatura ambiente (ver apartado "Interpretación de los Resultados").

C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest se trata de la tira reactiva en el interior de una carcasa de plástico. Las muestras extraídas se añaden directamente a la ventana de muestra de la carcasa señalizada con una flecha.

- Una vez finalizada la tarea, limpiar las superficies de trabajo con agua y jabón y terminar desinfectando con una solución adecuada. Por último, eliminar los guantes y lavar las manos con agua y jabón frotándolas bien.
- No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.
- Antes de usarlos, dejar que todos los componentes del kit y las muestras fecales alcancen la temperatura ambiente, pues reactivos y/o muestras frías pueden reducir la funcionalidad del test. Se recomiendan de 20 a 30 minutos para alcanzar la temperatura ambiente.
- No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
- En caso de rotura del envase, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.
- Es muy importante añadir el volumen correcto de muestra extraída al dispositivo de reacción. Si es inferior al indicado, puede ser que no se realice la cromatografía porque no llegue suficiente muestra a la zona de reacción; si es superior, puede que la cromatografía no curse bien debido a que la muestra no fluya correctamente a lo largo de la membrana por ser más viscosa de lo recomendado.
- El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
- No usar el test si aparece alguna línea de color en la zona de resultados antes de empezar a usarlo.
- Es muy importante tomar la cantidad adecuada de muestra: unos **110 mg** si son **muestras sólidas** (una **bolita** pequeña de unos **5 mm de diámetro**), una cantidad capaz de cubrir las estrías del palito unido al tapón del vial si son **muestras semi-líquidas** (no se pueden tomar con la pipeta) y **110 µl** si son **muestras líquidas** (**4 gotas** si se emplean las pipetas desechables proporcionadas con el kit); estas cantidades se extraen en el tampón de dilución de la muestra suministrado en los viales incluidos en el kit. Un exceso de muestra con respecto a la indicada podría impedir que la cromatografía transcurra de forma correcta; esto es especialmente crítico en el caso de muestras sólidas ya que no es tan sencillo tomar la cantidad recomendada de muestra.
- No tirar la caja externa del kit hasta que se haya utilizado todo el contenido. La caja contiene información esencial respecto al marcado CE del producto y lotificación.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

El kit C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest se puede conservar a cualquier temperatura comprendida entre +2 y +30°C.

Su fecha de caducidad está impresa en los tubos o en los envoltorios de aluminio.

MUESTRAS

- Este test está diseñado para analizar muestras fecales humanas frescas.
- No usar muestras que hayan sido recogidas en medios de transporte o se les hayan añadido agentes de conservación (como formalina, SAF, PVA o similares) o medios de enriquecimiento pues su presencia podría interferir con el test.
- Prestar especial atención cuando se analicen muestras hemorrágicas pues podrían dar problemas de inespecificidad si el contenido en sangre es elevado. Un indicio de esta inestabilización del test suele ser la alteración del color azul de la banda de control (tiende a mostrar un color morado o azul muy oscuro) o la aparición de otras bandas de color indefinido.
- Las muestras se pueden guardar en el frigorífico (+2-8°C) durante 3-4 días. Para tiempos más largos, deben congelarse a -20°C.
- En caso de congelación, descongelar totalmente las muestras a temperatura ambiente antes de proceder a su análisis. Evitar ciclos de congelación y descongelación pues pueden provocar la pérdida de actividad por la degradación del antígeno.
- Las muestras se deben homogeneizar bien antes de su preparación.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS FECALES

Nota General: usar todos los medios de protección requeridos a lo largo del desarrollo del test debido al manejo de muestras infecciosas. Una vez finalizado el trabajo, proceder con la higiene de acuerdo al punto 4 del apartado "Precauciones".

Este tampón es el mismo que se utiliza para el producto MO-076011 C. DIFFICILE TOXINS A+B MonlabTest.

El protocolo de preparación de las muestras fecales es el siguiente:

- Homogeneizar previamente la muestra con el fin de que sea lo más representativa posible.
- Desenroscar el tapón del vial con cuidado de no derramar el tampón de dilución. Si las heces son **sólidas**, tomar con el palito unido al tapón del vial una cantidad aproximada de **110 mg** de heces (una pequeña porción de **5 mm de diámetro**). Si las heces son **semi-líquidas** (no se pueden tomar con la pipeta), tomar una cantidad de muestra de manera que **cubra** por completo las **estrias del palito** unido al tapón del vial. Si las heces son **líquidas**, tomar con ayuda de una pipeta **110 µl** (**4 gotas** si se emplean las pipetas desechables incluidas en el kit).
- Añadir cuidadosamente la muestra en el vial con el tampón de dilución. Enroscar bien el tapón y agitar vigorosamente para asegurar una mezcla homogénea.

PROCEDIMIENTO

- Sacar el dispositivo de reacción de la bolsa de aluminio. Desechar la bolsita de desecante puesto que sólo sirve para preservar el test de la humedad.
- Invertir el vial y añadir **3 gotas** en la zona de adición de muestra (ventana circular señalada con una flecha).
- Esperar **10 minutos** para leer e interpretar el resultado.

LECTURA E INTERPRETACIÓN

C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest puede presentar dos bandas coloreadas:

- Banda azul:** constituye la banda de control y debe aparecer siempre pues indica un correcto funcionamiento del test.
 - Banda roja:** indica presencia de la GDH de *C. difficile* en la muestra.
- La figura 1 muestra los posibles resultados que pueden darse con el test GDH.
- Tira 1:** Resultado **NEGATIVO**. Sólo aparece una línea transversal **AZUL** en la zona central del dispositivo de reacción, alineada con la letra "C" marcada en la carcasa.

MATERIAL SUMINISTRADO	MATERIAL NECESARIO PERO NO PROPORCIONADO
- 20 casetes - 20 viales con diluyente (1,5mL) - Pipetas de plástico desechables - Instrucciones de uso	- Vórtex - Cronómetro

PRECAUCIONES

- Las muestras de los pacientes (heces) deben ser manipuladas con cuidado ya que pueden contener agentes infecciosos. A lo largo de todo el proceso se deben usar todos los medios de protección requeridos.
- El tampón de dilución de la muestra contiene azida de sodio como agente antimicrobiano. Evitar el contacto directo con la piel y las mucosas. Desechar de forma apropiada. No usar el tampón si manifiesta indicios de contaminación o precipitación.
- No comer, beber, fumar o almacenar alimentos en la zona donde se manejan los reactivos y las muestras.



- **Tira 2:** Resultado POSITIVO. Aparece una banda AZUL (control) y una banda ROJA 3 mm por debajo de la banda de control, alineada con el rótulo "T" marcado en la carcasa. La intensidad depende de la concentración de GDH en la muestra.

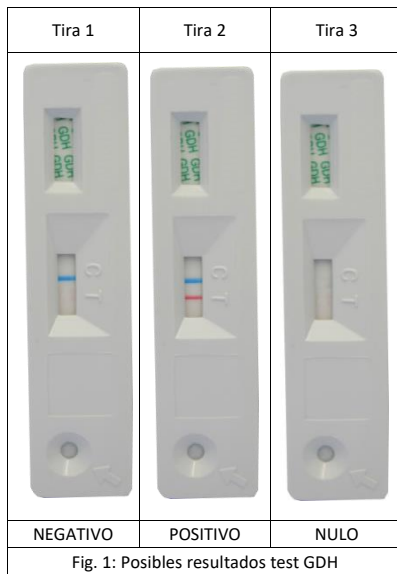


Fig. 1: Posibles resultados test GDH

- **Tira 3:** Resultados INVÁLIDOS: no aparece la banda de control azul, el color azul de la banda de control aparece claramente alterado (azul muy oscuro o morado) o aparecen colores inespecíficos en la banda positiva (diferentes al rojo). Cualquier combinación de colores diferente a las indicadas más arriba, indica un funcionamiento anómalo del test. Algunas de las causas que justifican este hecho pueden ser:
 - algunos de los reactivos se han deteriorado o el test ha caducado.
 - la muestra no se ha preparado de acuerdo a las instrucciones de uso.
 - la muestra tiene un alto contenido en sangre.

Ante un resultado inválido, se recomienda repetir el test con un nuevo casete siguiendo estrictamente las instrucciones de uso descritas en este manual. En el caso de las muestras con sangre, se aconseja el uso de una técnica alternativa si el problema de la inestabilización persiste pues éste no suele depender del casete empleado sino de la propia matriz de la muestra.

Toda línea que por la naturaleza de la muestra pueda aparecer pasados los 10 minutos de reacción no tendrá valor diagnóstico.

NOTA: el diagnóstico final y definitivo lo establece el médico clínico. Este test sólo detecta la GDH de *C. difficile* en una muestra, pero no constituye un argumento para afirmar que la persona padece de una infección por *C. difficile*

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest analiza muestras fecales humanas. El uso de otras muestras no ha sido determinado.
2. Este test es cualitativo, no cuantitativo aunque la intensidad de la banda positiva está relacionada con la cantidad de GDH detectable en la muestra fecal.
3. Con un defecto de muestra pueden aparecer resultados positivos muy débiles. En este caso se debe repetir el test con una cantidad mayor de muestra manteniendo la proporción recomendada con el diluyente de la muestra. Por otro lado, un exceso de muestra puede causar un desarrollo del test muy lento e incluso impedir el correcto desarrollo del test (no se ve la línea control). En este caso se debe repetir el test con una cantidad menor de muestra (ver apartado "Preparación de las muestras fecales").
4. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección por *C. difficile*. Puede ocurrir que la concentración del antígeno en la muestra sea inferior al límite de detección del test o que haya sustancias fijadoras del antígeno o enzimas inactivadoras en las heces.
5. Un resultado positivo debe ser contrastado con otras técnicas que analicen la presencia de toxinas para asegurar que la cepa de *C. difficile* es virulenta. Un resultado positivo no excluye la presencia de otros agentes patógenos.
6. Esta prueba proporciona un diagnóstico presuntivo de infección por *C. difficile*. El diagnóstico final lo establece un clínico especialista tras evaluar las pruebas clínicas y teniendo en cuenta la correlación con la sintomatología del paciente.
7. Se ha observado que algunas muestras fecales con un alto contenido en sangre pueden interferir negativamente con el test, pudiendo aparecer problemas de inespecificidad con muestras que son negativas para *C. difficile*. Esta inestabilización del test suele ir acompañada de una alteración en la coloración de la banda de control; en lugar de un color azul claro, aparece un color azul muy oscuro o incluso morado (ver apartado "Lectura de Resultados").
8. Se han descrito índices de colonización en niños por parte de *C. difficile* de hasta el 50%. También se dan elevados índices de colonización en pacientes con fibrosis quística. Normalmente, estos dos grupos de pacientes permanecen asintomáticos por lo que no requieren tratamiento específico. Prestar especial atención a estos resultados positivos sin relevancia clínica ya que los pacientes afectados no requieren tratamiento frente a *C. difficile*.
9. El screening con un test de GDH como primer paso para la detección de cepas *Clostridium difficile* toxigénicas presenta una limitación a nivel de sensibilidad, tal y como indican diversas publicaciones^{6,7}, en las que se habla de porcentajes de falsos negativos que, en ocasiones, se acercan al 5%.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Para determinar la sensibilidad de C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest se usó una preparación pura de Glutamato Deshidrogenasa Nativa obtenida a partir del sobrenadante de un cultivo de *C. difficile*. C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest alcanzó una sensibilidad en torno a 0,8 ng/mL.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest se evaluó externamente frente al test comercial Cdiff Quik Chek de TechLab por ser un test rápido de referencia en la detección de la GDH de *C. difficile*. Se analizaron un total de 42 muestras positivas y 73 muestras negativas según el test de TechLab.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

115 muestras fecales		CDIFF QUIK CHEK	
		Pos	Neg
GDH MonlabTest	Pos	42	3
	Neg	0	70
		42	73

Concordancia: $(70 + 42) / 115 = 97,4\%$

Sensibilidad: $42 / (42 + 0) > 99,9\%$

Especificidad: $70 / (70 + 3) = 95,9\%$

Las 3 muestras discordantes se analizaron con el cultivo anaerobio de *C. difficile* comprobándose que dos de los supuestos falsos positivos son en realidad muestras positivas. De manera, que teniendo en cuenta el análisis de las discordantes con el cultivo anaerobio, se obtienen los siguientes valores:

Sensibilidad: $44 / (44 + 0) > 99,9\%$

Especificidad: $70 / (70 + 1) = 98,6\%$

REPETIBILIDAD

Diez réplicas de cada una de las tres concentraciones establecidas como NC ("negative control"), LPC ("low positive control") y PC ("positive control") del estándar interno se midieron el mismo día por la misma persona. Se obtuvo una repetitividad del 100% con las tres concentraciones críticas lo que indica una alta precisión intra-ensayo del test.

REPRODUCIBILIDAD

PRECISIÓN INTERDÍA: Con un mismo lote del test GDH se mide una curva de sensibilidad a lo largo de cinco días espaciados en el tiempo. Los resultados fueron muy reproducibles, diferencias inferiores a media dilución 1/2 a lo largo de los cinco días de medida.

PRECISIÓN INTER-OPERADOR: Cinco personas midieron por duplicado una curva de sensibilidad. Se observaron diferencias que, en ningún caso, fueron superiores a una dilución 1/2.

PRECISIÓN INTER-LOTE: Con cuatro lotes distintos del test GDH se midió una curva de sensibilidad por duplicado. El análisis lo realizó una única persona el mismo día. Sólo se apreciaron diferencias inferiores a una dilución 1/2, asumibles y tolerables por el ensayo realizado.

Las diferencias encontradas en los distintos apartados de "Reproducibilidad" son asumibles en una técnica inmunocromatográfica cualitativa con una variabilidad inherente a la misma.

EFECTO HOOK

No se observó inhibición de la señal positiva al probar concentraciones crecientes del analito (una preparación nativa de GDH) hasta 4000 ng/mL, lo que supone analizar una concentración máxima de hasta 1333 veces el LPC del test (3 ng/mL).

INTERFERENCIAS

Las siguientes sustancias no mostraron ningún efecto en los resultados del test cuando fueron añadidas a muestras fecales (positivas y negativas) a las concentraciones indicadas en la siguiente tabla:

Racecadotril	5% (p/v)	Ibuprofeno	20% (p/v)
Cimetidina	10% (p/v)	Ac. Acetilsalicílico	30% (p/v)
Loperamida	5% (p/v)	Edulcorante	5% (p/v)
Metronidazol	5% (p/v)	Ac. palmítico	40% (p/v)
Omeprozol	3% (p/v)	Sulfato de Bario	5% (p/v)
Ampicilina	15% (p/v)	Mucina	5% (p/v)
Sangre humana	20% (v/v)		

REACTIVIDAD CRUZADA

Este estudio se desarrolló en dos centros diferentes:













- **MONLAB:** C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest se testó frente a heces fuertemente positivas para los siguientes microorganismos sin encontrar problemas de reactividad cruzada: *Adenovirus - Rotavirus - Norovirus - Astrovirus - Helicobacter pylori - Campylobacter jejuni - Escherichia coli O157 - Entamoeba histolytica - Giardia lamblia - Cryptosporidium parvum*.
- **CENTRO EXTERNO:** C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest se testó frente a distintos microorganismos susceptibles de estar presentes en el tracto intestinal en un momento dado a una concentración suficientemente elevada. Los exámenes fueron realizados con suspensiones de bacterias a una concentración de 10^8 cfu/mL. C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest no presentó reactividad cruzada con ninguno de los microorganismos indicados a continuación: *Aeromonas hydrophila, Bacillus pumilus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Citrobacter koseri, Clostridium perfringens, Clostridium sordellii, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli 1, Escherichia coli 2, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Morganella morganii, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enteritidis, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Serratia marcescens, Shigella dysenteriae, Shigella flexnerii, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica*.



BIBLIOGRAFÍA

1. Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF, Gerding DN, Johnson S, Just I, Lyster DM, Popoff MR, Rood JI, Sonenshein AL, Thelestam M, Wren BW, Wilkins TD and von Eichel-Streiber C. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. J Med Microbiol. Feb 2005, Vol: 54(Pt 2) pp: 113-117.
2. Vonberg RP, Reichardt C, Behnke M, Schwab F, Zindler S and Gastmeier P. Costs of nosocomial *Clostridium difficile* associated diarrhoea. J Hosp Infect. Sep 2008, Vol: 70(1) pp:15-20.
3. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A and Minton NP. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature. Oct 2010, Vol: 467(7316) pp: 711-713.
4. Shetty N, Wren MW, Coen PG. *The role of glutamate dehydrogenase for the detection of Clostridium difficile in faecal samples: a meta-analysis.* J Hosp Infect. 2011. Jan 77 (1): 1-6.
5. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH; Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. *Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA).* Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2010. May; 31 (5): 431-55.
6. Wilcox MH, Planche T, Fang FC and Gilligan P. *What is the current role of algorithmic approaches for diagnosis of Clostridium difficile infection.* J Clin Microbiol. 2010 Dec 48 (12): 4347-53
7. Wren MW, Sivapalan M, Kinson R and Shetty NR. *Laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection. 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.

PRESENTACIÓN SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS IVD

 Fabricante	 Uso de diagnóstico <i>in vitro</i>
 No reutilizar	 Consultar las instrucciones de uso
 Contiene suficiente para <n> ensayos	 Mantener seco
 Código	 Límite de temperatura
 Número de lote	 Fecha de caducidad
 Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Tampón de dilución



C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest®

MO-076012 20 TESTS

One-step immunochromatographic test for the qualitative detection of Glutamate Dehydrogenase (GDH) from *C. difficile* in human faeces



For *in vitro* use only. Store at 2 - 30°C.

INTENDED USE

C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest immunochromatographic assay is a rapid test for the qualitative detection of glutamate dehydrogenase (GDH) from *Clostridium difficile* in human stool samples. A positive signal in the test indicates the presence of *C. difficile* in the stool sample. Subsequent analysis of the sample with a test for detecting *C. difficile* toxins (such as MO-076011 C. DIFFICILE TOXINS A+B MonlabTest) confirms whether the strain is toxigenic and, therefore, pathogenic and disease-causing. The test is based on the immunological capture of coloured microparticles as they pass through a membrane on which specific monoclonal antibodies against GDH from *C. difficile* have been immobilised.

SUMMARY

Clostridium difficile is a spore-forming gram-positive anaerobic bacterium that can be present asymptomatically in up to 5% of the healthy population¹. This carrier rate can increase up to 30% as a result of hospitalisation and treatments with antibiotics to which this bacterium is resistant.

Therefore *C. difficile* is considered to be responsible for approximately 25% of the diarrhoea associated with the consumption of antibiotics², including clindamycin, second- and third-generation of cephalosporins, girase inhibitors, ampicillin, amoxicillin and so forth. In addition to the diarrhoea symptoms, the disease can lead to pseudomembranous colitis (PMC), which requires urgent treatment with antibiotics effective against *C. difficile* (metronidazole, vancomycin) as the patient's life may be compromised. CDI-related mortality can be between 6% and 30%, especially if the patient suffers from PMC.

C. difficile releases two high molecular weight toxins³, toxin A and toxin B, which are the main virulence factors responsible for the clinical signs of CDI disease. Glutamate dehydrogenase (GDH) is an enzyme produced in large quantities by toxigenic and nontoxigenic strains of *C. difficile*, thus making it an excellent marker for determining the presence of this microorganism⁴.

The Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) propose the use of a two-step protocol for identifying toxigenic *C. difficile*⁵ involving an initial screening of the sample with a GDH test and, if the result is positive, use of a second test to detect toxins from *C. difficile*, as not all strains of this microorganism produce them. MONLAB offers the possibility of following this protocol recommended by some of the leading healthcare societies using its GDH and C. DIFFICILE TOXINS A+B (for toxin presence) tests.

PRINCIPLE

C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest uses a combination of:

- 1) red latex particles conjugated to specific antibodies against GDH from *C. difficile* that cooperate with other specific anti-GDH antibodies located on the test membrane under the control band.
- 2) blue latex particles conjugated to an antigen recognized by a specific antibody for that antigen bound to the membrane; this is the control band.

In this test the sample is first treated with the sample dilution buffer (included in the kit) to extract GDH from the faecal matrix. After the extraction, a specific volume of the supernatant is added to the reactive strip.

When the extracted sample flows through the test membrane the coloured particles migrate. In the case of a positive sample, the specific antibodies present in the membrane capture the coloured antigen-coated particles.

Different coloured lines (blue for control and red for test) will be visible. These lines are used to interpret the result after incubation at room temperature for 10 minutes (see "Reading the results" section).

In C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest the reactive strip is presented inside a plastic cassette. The extractions are added directly to the sample window that is marked with an arrow on the casing.

MATERIALS PROVIDED	MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT
<ul style="list-style-type: none"> - 20 cassettes - 20 vials with diluent (1,5mL) - Disposable plastic pipettes - Instructions for use 	<ul style="list-style-type: none"> - Vortex - Timer

PRECAUTIONS

1. Patient samples (faeces) should be handled with care as they may contain infectious agents. All the necessary protections should be used throughout handling (disposable gloves, goggles, laboratory coat and others).
2. The sample diluent buffer contains sodium azide as an antimicrobial agent. Avoid direct contact with the skin and mucous membranes. Dispose of appropriately. The buffer should not be used if there are signs of contamination or precipitation.
3. Do not eat, drink, smoke, store or prepare food in areas where the reagents and the samples are handled.
4. Once the task has been completed, clean the work surfaces with soap and water and finish by disinfecting with a suitable solution. Lastly, remove gloves and wash hands with soap and water rubbing them well.
5. Do not exchange components between kits with different lot numbers.
6. Allow kit components and stool samples to reach room temperature before use, as cold reagents and/or samples may reduce test performances. About 20-30 minutes are usually sufficient for reaching room temperature.
7. Do not use kit components beyond their expiry date.

8. If the package is broken, the product may still be used providing none of its components have been damaged.
9. It is very important to add the correct volume of extracted sample to the reaction device. If the volume added is less than indicated, the chromatography may not take place as insufficient sample reaches the reaction zone, whereas if the volume added is higher than indicated, the chromatography may not run correctly as the sample is unlikely to flow through the membrane due to a higher than recommended viscosity.
10. All products are for single use only and should be discarded according to current legislation.
11. Do not use the test if any coloured lines appear in the result area prior to performing the test.
12. It is critical to collect the correct sample quantity: approximately **110 mg** of a **solid sample** (a small ball of **5 mm** in diameter). If the sample is **semi-liquid** (unable to take it with a pipette), take a sample amount so that it completely **covers the grooves of the stick** attached to the vial cap and **110 µl** of a **liquid sample** (**4 drops** if the disposable pipettes included in the kit are used). These quantities are extracted in the sample diluent supplied with the vials provided in the kit. An excess of sample in relation to the amount of buffer added prevents the chromatography from running correctly; this is especially critical in the case of solid samples, since it is harder to obtain an appropriate quantity.
13. Do not discard the external box of the kit until its content has been totally used. The external box contains essential information regarding the EC marking and lotification.

STORAGE AND STABILITY

The C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest can be stored at any temperature between +2 and +30°C.

Its expiry date is printed on the tube or on the aluminium wrap.

SAMPLES

- This test is designed to analyse fresh human stool samples.
- Do not use samples that have been collected in any transport medium or to which enrichment media/preserving agents have been added (e.g. formalin, SAF, PVA or similar) as they may interfere with the test.
- Pay special attention when analysing haemorrhagic samples since they may cause non-specificity problems if the blood content is high. An indication of this instability of the test is usually a change in the blue colour of the control band (tends to show a purple or very dark blue colour) or the appearance of other bands of an undefined colour.
- Samples can be stored in the refrigerator (+2-8°C) for 3-4 days. For longer time periods, they should be frozen at -20°C.
- If frozen, ensure that the samples have fully thawed at room temperature prior to proceeding with their analysis. Avoid freeze/thaw cycles as this can result in loss of activity due to degradation of the antigen.
- Samples must be well homogenised prior to preparation.

STOOL SAMPLES PREPARATION

General remark: all the necessary protections should be used throughout the test procedure due the handling of infectious samples. Once finished, do not forget to comply with the hygiene procedures detailed in point 4 of the "Precautions" section.

The sample diluent buffer is the same as for the MO-076011 C. DIFFICILE TOXINS A+B MonlabTest product.

The protocol for faecal samples preparation is:

1. Homogenize previously the sample to get an aliquot as much representative as possible.
2. Unscrew the cap from the vial with caution in order not to spill the sample diluent buffer. With **solid samples**, take with the stick attached to the vial cap an approximate amount of **110 mg** of feces (a small portion of **5 mm** in diameter). If the sample is **semi-liquid** (unable to take it with a pipette), take a sample amount so that it completely **covers the grooves of the stick** attached to the vial cap. With **liquid samples**, take a volume of **110 µl** (**4 drops** if the disposable pipettes included in the kit are used).
3. Carefully add the sample into the vial containing the dilution buffer. Screw the cap well and shake vigorously to ensure a homogeneous mixture.

PROCEDURE

1. Take out the reaction device from the aluminium pouch. Discard the desiccant bag as it only serves to preserve the test from moisture.
2. Put the vial upside down and add **3 drops** to the sample area of the reaction device (round window marked with an arrow).
3. Wait for **10 minutes** and read the results.

INTERPRETATION OF THE RESULTS

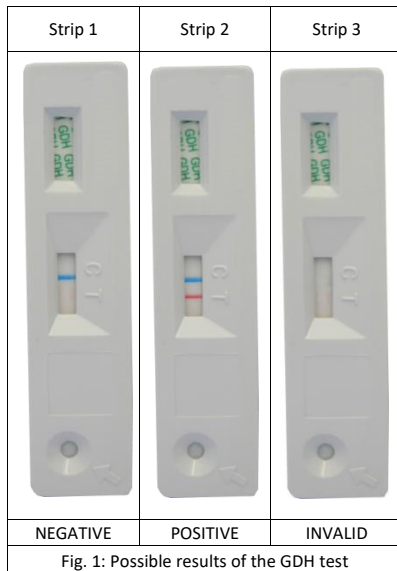
The C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest may present two coloured bands:

- **Blue band:** this is the control band and must always appear as it indicates that the test has worked correctly.
- **Red band:** this is the positive band and indicates the presence of GDH from *C. difficile* in the sample.

Figure 1 shows the possible results that can be obtained with the GDH test.

- **Strip 1:** NEGATIVE result. There is only a single horizontal **BLUE** line in the central region of the reaction device, it is aligned with the letter "C" that appears on the housing.
- **Strip 2:** POSITIVE result. A **BLUE** (control) band appears together with a **RED** band 3 mm below the control band, aligned with the letter "T" that appears on the housing. The intensity depends on the concentration of GDH in the sample.





- **Strip 3: INVALID** results: no blue control band appears, the blue colour of the control band is clearly different (very dark blue or purple), or non-specific colours (other than red) appear in the positive band. Any combination of colours other than those indicated above indicates abnormal functioning of the test. This may be due to any of the following reasons:
 - one or more of the reagents has deteriorated or the test has expired.
 - the sample was not prepared according to the instructions for use.
 - the sample has a high blood content.

In the event of an invalid result, it is recommended to run another test, strictly following the protocol described in this manual. In the case of samples with blood, it is recommended to use an alternative technique if the problem persists as this usually depends on the sample matrix itself rather than on the strip used.

Any line that may appear after 10 minutes has no diagnostic value.

NOTE: the final and definitive diagnosis should be made by a physician. This test only detects GDH from *C. difficile* in a sample. It does not constitute an argument to state that the person is suffering from a *C. difficile* infection.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest uses human stool samples. Use with other samples has not been determined.
2. The test is qualitative, not quantitative although the intensity of the positive band is related to the amount of GDH detectable in the stool sample.
3. A defect in sample amount may lead to very weak positive results. In this case, the test must be repeated with a larger quantity of sample, maintaining the recommended proportion with respect to sample diluent. An excess of sample can cause the test to develop very slowly and even prevent the test from developing correctly (the control band is not visible). In this case, the test must be repeated with a smaller quantity of sample (see section "Stool sample preparation").
4. A negative result does not exclude the possibility of infection by *C. difficile*. It may be the case that the antigen concentration in the sample is lower than the limit of detection for the test or that antigen-binding substances or inactivating enzymes may be present in the stools.
5. A positive result must be compared with other techniques that analyse the presence of toxins to ensure that the *C. difficile* strain is virulent. A positive result does not exclude the presence of other pathogens.
6. This test provides a presumed diagnosis of *C. difficile* infection. The final diagnosis is established by a specialised physician after evaluation of the clinical tests and taking into account the correlation with the patient's symptoms.
7. It has been observed that some stool samples with a high blood content may interfere negatively with the test, with possible non-specificity problems for samples that are negative for *C. difficile*. This instability of the test is usually accompanied by a change in the colour of the control band; instead of a light blue colour, a very dark blue or purple colour appears (see the "Reading the Results" Section).
8. *C. difficile* colonisation rates of up to 50% have been reported in infants. A high rate has also been reported in cystic fibrosis patients. Normally, these two groups of patients remain asymptomatic and do not require specific treatment. These positive results that are of no clinical significance should be treated with caution as affected patients do not require treatment for *C. difficile* infection.
9. The GDH screening as a first step for detecting toxigenic *C. difficile* strains presents a sensitivity limitation as it is indicated by various papers^{6,7}, in which false negative rates up to 5% are indicated.

ANALYTICAL SENSITIVITY

A pure preparation of Native glutamate dehydrogenase obtained from the supernatant of a *C. difficile* culture was used to determine the sensitivity of the *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest. It achieved a sensitivity of around 0.8 ng/mL.

DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest was externally evaluated against the commercial test CDIFF QUIK CHEK by TechLab, as it is a reference test in the rapid detection of the *C. difficile* GDH. A total of 42 positive samples and 73 negative samples according to the TechLab test were analysed.

The following results were obtained:

115 stool samples		CDIFF QUIK CHEK	
		Pos	Neg
GDH MonlabTest	Pos	42	3
	Neg	0	70
		42	73

Concordance: $(70 + 42) / 115 = 97.4\%$

Sensitivity: $42 / (42 + 0) > 99.9\%$

Specificity: $70 / (70 + 3) = 95.9\%$

The 3 discordant samples were re-analysed by the *C. difficile* anaerobic culture, verifying that two of the false positives are in fact positive samples. Taking into account the analysis of the discordant results, the following values are obtained:

Sensitivity: $44 / (44 + 0) > 99.9\%$

Specificity: $70 / (70 + 1) = 98.6\%$

REPEATABILITY

Ten replicates of each of the three concentrations established as NC (Negative Control), LPC (Low Positive Control), and PC (Positive Control) were measured on the same day by the same person. A repeatability of 100% was obtained with the three critical concentrations, thus indicating a high intra-assay precision for the test.

REPRODUCIBILITY

INTER-DAY PRECISION: Using the same batch of the GDH test, a series of two-fold dilutions was measured over the course of five separate days. The results were highly reproducible, with differences of less than one two-fold dilution over the five measurement days.

INTER-OPERATOR PRECISION: Five people measured a series of two-fold dilutions in duplicate. In no case were the differences observed greater than one two-fold dilution.

INTER-BATCH PRECISION: A series of two-fold dilutions was measured in duplicate using four different batches of the GDH test. The analysis was performed by the same operator on the same day. Differences of less than one two-fold dilution were found, which is acceptable and tolerable for the assay performed.

The differences found in the different "Reproducibility" sections are acceptable for a qualitative immunochromatographic technique with its inherent variability.

HOOK EFFECT

No inhibition of the positive signal was observed upon testing increasing analyte concentrations (using a native GDH preparation) up to 4000 ng/mL, which represents analysis of a maximum concentration of up to 1333-times the LPC for the test (3 ng/mL).

INTERFERING SUBSTANCES

The following substances did not affect the test results when added to stool samples (positive and negative) at the concentrations shown in the following table:

Racecadotril	5% (p/v)	Ibuprofen	20% (p/v)
Cimetidine	10% (p/v)	Acetylsalicylic acid	30% (p/v)
Loperamide	5% (p/v)	Edulcorated	5% (p/v)
Metronidazole	5% (p/v)	Palmitic Acid	40% (p/v)
Omeprazole	3% (p/v)	Barium Sulphate	5% (p/v)
Ampicillin	15% (p/v)	Mucin	5% (p/v)
Human blood	20% (v/v)		

CROSS-REACTIVITY WITH OTHER MICROORGANISMS

This study was developed in two different places:

- **MONLAB:** *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest was evaluated against strongly positive samples for the following microorganisms, without finding problems of cross-reactivity:

Adenovirus - Rotavirus - Norovirus - Astrovirus - Helicobacter pylori - Campylobacter jejuni - Escherichia coli O157 - Entamoeba histolytica - Giardia lamblia - Cryptosporidium parvum.

- **EXTERN CENTER:** *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest was evaluated against different micro-organisms likely to be present in the intestinal tract at any time at concentrations high enough. Tests were carried out on bacterial suspensions at concentration of 10^8 cfu/mL. The *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest showed no cross reactivity with any of the micro-organism listed below:

Aeromonas hydrophila, Bacillus pumilus, Campylobacter jejuni, Candida albicans, Citrobacter koseri, Clostridium perfringens, Clostridium sordellii, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli 1, Escherichia coli 2, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Morganella morganii, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enteritidis, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Serratia marcescens, Shigella dysenteriae, Shigella flexnerii, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica.













REFERENCES

1. Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF, Gerding DN, Johnson S, Just I, Lyrer DM, Popoff MR, Rood JJ, Sonenshein AL, Thelestam M, Wren BW, Wilkins TD and von Eichel-Streiber C. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. J Med Microbiol. Feb 2005, Vol: 54(Pt 2) pp: 113-117.
2. Vonberg RP, Reichardt C, Behnke M, Schwab F, Zindler S and Gastmeier P. Costs of nosocomial *Clostridium difficile* associated diarrhoea. J Hosp Infect. Sep 2008, Vol: 70(1) pp:15-20.
3. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A and Minton NP. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature. Oct 2010, Vol: 467(7316) pp: 711-713.
4. Shetty N, Wren MW, Coen PG. The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: a meta-analysis. J Hosp Infect. 2011. Jan 77 (1): 1-6.



5. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH; Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. *Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA)*. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2010. May; 31 (5): 431-55.
6. Wilcox MH, Planche T, Fang FC and Gilligan P. *What is the current role of algorithmic approaches for diagnosis of Clostridium difficile infection*. J Clin Microbiol. 2010 Dec 48 (12): 4347-53
7. Wren MW, Sivapalan M, Kinson R and Shetty NR. *Laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection. 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.

PRESENTATION SYMBOLS USED FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS

	Manufactured by		For <i>in vitro</i> diagnostic use
	Do not re-use		Please read pack insert
	Contains sufficient for <n> tests		Dry storage
	Catalogue number		Store at
	Lot number		Expiry date
	This product fulfils the requirements of Directive 98/79/EC on <i>in vitro</i> diagnostic medical devices		Dilution buffer

