

C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest®

MO-076012 20 TESTS

Test inmunocromatográfico en un solo paso para la detección cualitativa de la Glutamato Deshidrogenasa (GDH) en heces humanas



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

INTRODUCCIÓN

Intención de uso

Test inmunocromatográfico en un solo paso para la ayuda al diagnóstico de la infección gastrointestinal causada por *Clostridium difficile* mediante la detección cualitativa de la Glutamato Deshidrogenasa (GDH) en heces humanas.

Los resultados obtenidos con C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest deben ser evaluados por el médico clínico en combinación con otra información clínica disponible del paciente. No deben utilizarse como el único criterio para diagnosticar la infección.

La prueba es cualitativa y su ejecución no está automatizada, aunque la interpretación de los resultados puede hacerse visualmente o mediante un lector de tiras. Esta prueba se usa exclusivamente para diagnóstico *in vitro*.

Es un test para uso por profesionales. No es una prueba diagnóstica en el lugar de asistencia al paciente. No es un test de uso de autodiagnóstico.

Información general

El test está basado en la captura inmunológica de micropartículas coloreadas a su paso a través de una membrana sobre la que se han inmovilizado anticuerpos monoclonales específicos frente a GDH de *C. difficile*.

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 C. difficile toxinas A+B MonlabTest) confirma si la cepa es toxigénica y, por tanto, patógena, causante de la enfermedad.

Población a la que está destinada la prueba

La infección por *C. difficile* puede afectar a todo tipo de personas sin importar edad, sexo o estilo de vida por lo que *a priori* no se excluye ningún sector de la población susceptible a ser analizado con este test.

En aquellos centros sanitarios donde el índice de enfermedades nosocomiales sea más elevado, debería potenciarse el empleo de este test ya que *C. difficile* es el principal agente relacionado con las infecciones adquiridas en el hospital. Así mismo, toda muestra diarreica procedente de individuos con tratamiento antibiótico también debería analizarse con este test.

Incidencia en la población de la enfermedad

C. difficile está presente de manera asintomática hasta en un 5% de la población sana¹ pudiendo aumentar la tasa de portadores hasta un 30% a causa de las hospitalizaciones.

Además, se considera que *C. difficile* es el responsable de aproximadamente un 25% de las diarreas relacionadas con el consumo de antibióticos y es uno de los principales patógenos asociados a las infecciones nosocomiales².

A nivel mundial, la incidencia oscila entre 1,1 y 631,8 por 100.000 habitantes al año. Además, la tasa de la recurrencia de la enfermedad es un hecho y se sitúa alrededor del 15-35% de los casos de infección por *C. difficile*³.

Características de C. difficile y su infección

Clostridium difficile es una bacteria anaerobia gram-positiva con capacidad de formar esporas.

Además de los síntomas diarreicos, la enfermedad puede derivar en colitis pseudomembranosa 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 la infección por *C. difficile* puede ir desde el 6% hasta el 30%, sobre todo si el paciente sufre de colitis pseudomembranosa. *C. difficile* libera dos toxinas de alto peso molecular⁴, la toxina A y la toxina B, siendo los principales factores de virulencia responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad causada por infección por *C. difficile*. 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 microorganismo⁵.

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* toxigénico⁶: 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 toxinas A+B (para las toxinas).

FUNDAMENTO O PRINCIPIOS BÁSICOS DEL TEST

El test GDH 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 una proteína reconocida 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 de la matriz fecal. Tras la extracción, solo 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, dependiendo del contenido de GDH en la muestra. Estas líneas se usan para interpretar el resultado a los 10 minutos de incubación a temperatura ambiente (ver Fig. 1).

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

Existen controles a disposición del usuario para validar los resultados obtenidos, que se pueden adquirir como una referencia comercial independiente.

EQUIPOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El test puede interpretarse visualmente o mediante el uso del lector de tests de inmunocromatografía iPeak® Plus.

Para este diagnóstico, se ha evidenciado una concordancia entre la interpretación visual y con el lector de tiras iPeak® Plus del 97,6%.

iPeak® Plus Lateral Flow Reader



IUL, S.A.

Carrer de la Ciutat d'Asunción, 4

08030 Barcelona, ESPAÑA

PRECAUCIONES

- Las muestras de los pacientes (heces) deben ser manipuladas con precaución ya que pueden contener agentes infecciosos. A lo largo de todo el proceso se deben usar guantes desechables.
- El tampón de dilución de la muestra contiene azida de sodio al 0,095% como agente anti-microbiano. 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. El tampón de dilución contiene material de origen animal (albúminas). Todo el material de origen animal utilizado son referencias comerciales y tienen su certificado asociado que evidencia que no son infecciosas.
- No comer, beber, fumar, almacenar o preparar alimentos en la zona donde se manejan los reactivos y las muestras.
- 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 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.
- Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
- Las tiras inmunocromatográficas son de un solo uso. Se utiliza una tira por cada muestra a analizar.
- No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
- En caso de rotura de la caja externa, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.
- En caso de rotura o alteración del envasado primario desechar el test.
- Sacar la tira o el dispositivo de la bolsa de aluminio cuando vaya a realizarse el ensayo, para evitar exponer el producto innecesariamente en exceso a factores ambientales que puedan perjudicarlo.
- 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, el exceso de volumen podría derramarse por el interior del dispositivo y afectar al correcto desarrollo de la cromatografía.
- Es aconsejable que la tira, una vez utilizada se manipule teniendo las mismas consideraciones que con la muestra. Se recomienda gestionarla como material potencialmente peligroso.
- 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.
- Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que estén establecidos el usuario y/o el paciente.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Se puede conservar a cualquier temperatura comprendida entre +2 y +30°C.

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

Se deben utilizar las tiras reactivas una vez atemperadas (si se almacenan refrigeradas) y abierto su envoltorio protector.

El producto mantiene la estabilidad reclamada una vez abierto.



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.
- Se recomienda analizar **muestras frescas sin tratar**. Si se tienen que conservar durante un tiempo, pueden guardarse en el frigorífico (+2-8°C) durante 3 o 4 días. Para tiempos más largos, deben congelarse a -20°C teniendo en cuenta que algunas muestras pierden inmunoreactividad tras haber sido congeladas.
- 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.
- En caso de congelación, descongelar totalmente las muestras a temperatura ambiente antes de proceder a su análisis.
- Evitar ciclos de congelación y descongelación con las muestras fecales ya que se puede alterar el reconocimiento inmunológico de GDH.
- Las muestras se deben homogeneizar bien antes de su preparación.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS FECALES

Nota General: a lo largo del desarrollo del test, deben usarse guantes desechables debido al manejo de muestras infecciosas. Una vez finalizado el trabajo, proceder con la higiene de acuerdo al punto 4 del apartado "Precauciones".

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 estrías 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

Una vez que las muestras se han preparado como se indica en los apartados anteriores, se procede de la siguiente manera:

- Sacar el dispositivo de reacción de la bolsa de aluminio. Desechar la bolsita de desecante puesto que solo sirve para preservar el test de la humedad.
- Invertir el vial y añadir **3 gotas** en la zona para la muestra del dispositivo de reacción (ventana circular señalada con una flecha).
- Esperar **10 minutos** para leer e interpretar el resultado (ver Fig. 1).

LECTURA DE RESULTADOS

Las tiras que se muestran en la Fig. 1 son un ejemplo de los distintos resultados que se pueden obtener con *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest. Se distinguen 2 bandas coloreadas diferentes:

- Banda (azul) superior:** constituye la banda de control que indica un correcto funcionamiento del test.
- Banda (roja) inferior:** indica presencia de la GDH en la muestra. La banda azul de control debe aparecer siempre. La presencia adicional de la banda roja, indica la presencia de GDH en la muestra.
- Tira 1:** Resultado NEGATIVO. Solo aparece una línea transversal **AZUL** alineada con la letra "C" marcada en la carcasa. Esta banda constituye la banda de control y debe aparecer siempre ya que indica que la cromatografía transcurre con normalidad.
- Tira 2:** Resultado POSITIVO. Aparece una banda **AZUL** (control) y una banda **ROJA** alineada con el rótulo "T" marcado en la carcasa. La intensidad depende de la concentración del analito en la muestra.

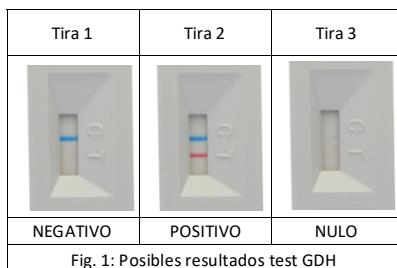


Fig. 1: Posibles resultados test GDH

- Tira 3:** Resultados INVÁLIDOS: No aparece la banda de control **AZUL**, el color **AZUL** de la banda de control aparece claramente alterado 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 de la tira empleada sino de la propia matriz de la muestra.

Toda línea que aparezca pasados los 10 minutos de reacción no tendrá valor diagnóstico.

NOTA: el diagnóstico final y definitivo lo establece el médico clínico. Este test solo 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*.

CONTROL DE CALIDAD

Si no aparece ninguna línea azul el test es inválido, ya sea porque se realizó incorrectamente o porque los reactivos se han deteriorado. En este caso, repetir el análisis ciñéndose estrictamente al protocolo de trabajo detallado en estas hojas de instrucciones.

ADVERTENCIA: Se recomienda la inclusión de controles de resultado conocido para asegurar que los datos obtenidos son correctos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest sirve para ayudar al diagnóstico de la infección gastrointestinal causada por *C. difficile*, detectando la presencia de la Glutamato Deshidrogenasa (GDH) en heces humanas siempre y cuando la carga proteica sea igual o superior al límite de detección del ensayo.
- 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.
- El test ha demostrado una buena correlación con otras técnicas (ELISA y test rápido) tras analizar un elevado número de muestras. Sin embargo, este estudio no excluye posibles interferencias en el funcionamiento del test al analizar otras muestras fecales.
- Es importante controlar el tiempo de reacción. Si el tiempo de reacción es menor al indicado, las muestras que tienen una cantidad de analito superior al límite de sensibilidad se pueden observar claramente pero, las que están en el límite, no aparecerán. Si el tiempo de reacción es mayor al indicado la sensibilidad del test se verá alterada pudiendo dar lugar a interpretaciones erróneas.
- 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").
- 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 en las heces que lo inactivan.
- 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.
- Los resultados del test deben ser interpretados junto con la información disponible de los estudios epidemiológicos, valoración clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.
- 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").
- 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*.
- El cribado 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^{7, 8}, en las que se habla de porcentajes de falsos negativos que, en ocasiones, se acercan al 5%.
- No se han establecido los resultados de la prueba para verificar la eficacia de la erradicación (prueba de curación).

CAPACIDAD DE DETECCIÓN

Se ha determinado empleando una preparación pura de Glutamato Deshidrogenasa nativa obtenida a partir del sobrenadante de un cultivo de *C. difficile* de la compañía tgcBiomics. *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest interpretado visualmente y con el Lector de flujo lateral de IUL alcanza una capacidad de detección de 1,5 ng/mL.

ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Los anticuerpos monoclonales utilizados en el test detectan específicamente epítomos de la Glutamato Deshidrogenasa de *C. difficile*. No se ha detectado reacciones cruzadas con otros antígenos y/o microorganismos presentes en las muestras fecales. Ver el apartado de reactividad cruzada.



SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

1. Evaluación interna

Se ha realizado una comparativa entre el test rápido de MonlabTest y el ELISA C. DIFF CHEK™-60 de Techlab.

El estudio incluye un total de 334 muestras, de las cuales 105 eran positivas y 229 eran negativas por el ELISA.

Los resultados obtenidos mediante la interpretación visual del test fueron los siguientes:

GDH		ELISA C.DIFF CHEK™ -60	
		Positivo	Negativo
C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest	Positivo	103	0
	Negativo	2	229

Concordancia Sensibilidad = $103/(103+2)*100= 98,1\%$
Concordancia Especificidad = $229/(0+229)*100= 99,9\%$

2. Evaluación externa

Se ha realizado una comparativa entre el test rápido MonlabTest y el test rápido C. DIFF QUIK CHEK® de Techlab en un hospital de Barcelona. El estudio incluye un total de 115 muestras, de las cuales 42 eran positivas y 73 eran negativas por el test rápido de Techlab.

Los resultados obtenidos mediante la interpretación visual del test fueron los siguientes:

GDH		C.DIFF QUIK CHEK®	
		Positivo	Negativo
C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest	Positivo	42	3
	Negativo	0	70

Concordancia Sensibilidad = $42/(42+0)*100= 99,9\%$
Concordancia Especificidad = $70/(70+3)*100= 95,9\%$

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.

REPETIBILIDAD

- PRECISIÓN INTRA-ENSAYO: Se analizaron visualmente y con el lector de tiras de IUL cinco réplicas de una serie de diluciones 1/2 del estándar interno empleando un lote del producto C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest, el mismo día por la misma persona. Se obtuvo una repetitividad del 100% lo que indica una alta precisión intra-ensayo del test.

REPRODUCIBILIDAD

- PRECISIÓN INTERDÍA: Con un mismo lote de C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest se midió visualmente una curva de diluciones del estándar a lo largo de cinco días espaciados en el tiempo. Los resultados fueron muy reproducibles ya que apreciaron diferencias inferiores a una dilución 1/2, asumibles y tolerables por el ensayo realizado.
- PRECISIÓN INTER-OPERADOR / INTER- LABORATORIO: Cinco personas midieron visualmente una curva de diluciones del estándar por duplicado. Se observaron diferencias que no superaron, en ningún caso, una dilución 1/2, lo cual es asumible y tolerable por la técnica.
- PRECISIÓN INTER-LOTE: Con cuatro lotes distintos de C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest se midió visualmente una curva de diluciones del estándar por duplicado. El análisis lo realizó una única persona el mismo día. Las diferencias observadas fueron iguales a una dilución 1/2, lo cual es asumible y tolerable por la técnica.

EFFECTO HOOK O PROZONA

Se ha comprobado que el test C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest, interpretado visualmente, no presenta efecto Hook evaluando concentraciones crecientes del estándar hasta 4.000 ng/mL.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

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

Racemadolil	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)
Omeprazol	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 pumillus*, *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*.

MODIFICACIONES RESPECTO A LA VERSIÓN ANTERIOR DE ESTE DOCUMENTO

Se mejora la estructura de la información general proporcionada al comienzo de las instrucciones, desglosando los diferentes puntos para ser coherentes con los requisitos del Reglamento IVDR.

En cuanto a los parámetros de funcionamiento del test, se han incluido modificaciones en los siguientes apartados: "Precauciones", "Muestras", "Limitaciones del procedimiento", "Capacidad de detección", "Especificidad analítica", "Sensibilidad y especificidad diagnóstica", "Repetibilidad", "Reproducibilidad", "Efecto Hook o prozona", anteriormente "Efecto Hook", "Sustancias interferentes" y "Reactividad cruzada".

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- 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.
- Finn E, Andersson FL and Madin-Warburton M. Burden of *Clostridioides difficile* infection (CDI) – a systematic review of the epidemiology of primary and recurrent CDI. BMC Infectious Diseases 2021; Vol: 21 pp: 456.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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		Límite de temperatura
	Código		Fecha de caducidad
	Número de lote		Precaución

Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*



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.

INTRODUCTION

Intended use

A single-step immunochromatographic test to aid in the diagnosis of the gastrointestinal infection caused by *Clostridium difficile*, by means of the qualitative detection of Glutamate Dehydrogenase (GDH) from *Clostridium difficile* in human stool samples.

The results obtained with C. DIFFICILE Ag (GDH) MonlabTest should be evaluated by the clinician in combination with other available clinical information from the patient. They should not be used as the only criterion for diagnosing the infection.

The test is qualitative and its execution is not automated, although the results interpretation can be done visually or by using a strip reader.

This test is exclusively for *in vitro* diagnostic use.

This test is for professional use. This is not a diagnostic test for use at the patient care location. This is not a self- diagnostic test.

General information

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.

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 *C. difficile* toxins A+B MonlabTest) confirms whether the strain is toxigenic and, therefore, pathogenic and disease-causing.

The testing population

C. difficile infection can affect all types of people regardless of age, sex or lifestyle, so a priori no sector of the population susceptible to be analysed with this test is excluded.

In those medical centres in which the incidence of nosocomial diseases is higher, the use of this test should be encouraged, as *C. difficile* is the main agent related to the infections acquired when being at hospital. In the same way, any diarrhoeic sample that comes from individuals under antibiotic treatment should be evaluated with this test.

Incidence of the disease

C. difficile can be present asymptotically in up to 5% of the healthy population¹. This carrier rate can increase up to 30% as a result of hospitalisation.

Besides, *C. difficile* is considered to be responsible for approximately 25% of the diarrhoea associated with the consumption of antibiotics and it is one of the main pathogens related to nosocomial infections².

Incidence worldwide oscillates between 1.1 and 631.8 for every 100,000 persons a year. Furthermore, there is clear evidence for disease recurrence, which is around 15-35% for cases with a *C. difficile* infection³.

Characteristics of *C. difficile* and its infection

Clostridium difficile is a spore-forming gram-positive anaerobic bacterium.

In addition to the diarrhoea symptoms, the disease can lead to pseudomembranous colitis, which requires urgent treatment with antibiotics effective against *C. difficile* (metronidazole, vancomycin) as the patient's life may be compromised. Mortality associated with *C. difficile* infection can be between 6% and 30%, especially if the patient suffers from pseudomembranous colitis.

C. difficile releases two high molecular weight toxins⁴, toxin A and toxin B, which are the main virulence factors responsible for the clinical manifestations of disease caused by *C. difficile* infection.

Glutamate dehydrogenase (GDH) is an enzyme produced in large quantities by toxigenic and non-toxigenic strains of *C. difficile*, thus making it an excellent marker for determining the presence of this microorganism⁵.

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*⁶ 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 Toxins A+B (for toxin presence) tests.

BASIC PRINCIPLES OF THE TEST

The GDH test uses a combination of:

- 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,
- blue latex particles conjugated to an antigen recognised 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 depending on the content of GDH in the sample. These lines are used to interpret the result after incubation at room temperature for 10 minutes (see Fig.1).

MATERIALS PROVIDED WITH THE KIT

- 20 cassettes
- 20 vials with diluent (1,5mL)
- Disposable plastic pipettes
- Instructions for use

MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT

- Vortex
- Timer

Controls are available for the user to validate the results and can be purchased as a separate trade reference.

EQUIPMENT UNITS FOR THE RESULT INTERPRETATION

The test can be interpreted visually or using iPeak® Plus immunochromatographic test reader. For this diagnosis, there is evidence of a 97.6% agreement between visual interpretation and the iPeak® Plus strip reader

iPeak® Plus Lateral Flow Reader



Carrer de la Ciutat d'Asunción, 4
08030 Barcelona, ESPAÑA

PRECAUTIONS

1. Patient specimens (faeces) should be handled with caution as they may contain infectious agents. The use of disposable gloves throughout the entire procedure is required.
2. The sample dilution buffer contains sodium azide as anti-microbial agent. Avoid direct contact with skin and mucous membranes. Dispose of appropriately. Do not use the buffer if signs of contamination or precipitation are present. The sample dilution buffers contains material from animal origin (albumins). All the materials from animal origin are commercial references and have the certificate that evidences they are not infectious.
3. Do not eat, drink, smoke or prepare or store food in areas where reagents or samples are handled.
4. Once completed the procedure, clean work surfaces with soap and water and finish disinfecting with a suitable solution. Finally, discard the gloves and then wash hands first with soap and water rubbing them well.
5. Do not exchange components from one kit lot to another.
6. Before use, allow all kit components and stool samples to reach room temperature, as cold reagents and/or samples can reduce test functionality. Twenty to 30 minutes are recommended to reach room temperature.
7. All reagents are for *in vitro* use exclusively.
8. The immunochromatographic strips are single use. A strip is used per sample to be evaluated.
9. Do not use kit components beyond their expiration date.
10. In case of external package damage, the product may be used if none of its components has been damaged.
11. In case of damage or alteration of the primary packaging discard the test.
12. Open the primary packaging of the strip, the aluminium pouch when the assay is going to be performed in order to unnecessarily expose the test in excess to external environmental factors that may work against it.
13. Is very important to add the correct volume of extracted sample to the reaction device. If the amount is lower than required, the chromatography may not be completed as the sample does not reach the reaction area; if higher than indicated, excessive volume could spill inside the device, and the chromatography may not develop correctly.
14. Once it is used, it is advisable to manipulate the strip taking into account the same considerations as far the sample. The strips have to be manipulated with the proper precautions and should be managed as biohazardous material.
15. Used product should be disposed of according to applicable laws.
16. Do not use the test if any coloured lines appear in the result area before using the test.
17. 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.
18. 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 component lots.
19. Any serious incident related to the product must be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and / or the patient are established.

STORAGE AND STABILITY

Product may be stored at any temperature between +2 and +30°C.

The expiry date is printed on the aluminium packages. The reagent strips must be used once the protective packaging has been opened after reaching room temperature (if stored refrigerated). The product maintains the claimed stability once open.

SAMPLES

- This test is designed for the analysis of human faecal samples.
- Do not use samples collected in transport media or added with preservatives (such as formalin, SAF, PVA or similar) or enrichment media as their presence could interfere with the proper performance of the test.
- The use of fresh untreated samples is recommended. If they have to be stored for some time, they can be stored in the refrigerator (+2-8°C) for 3 or 4 days. For a longer storage, they should be frozen at -20°C, considering that some samples lose immunoreactivity after being frozen.



- 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.
- In case of freezing, thaw the samples completely at room temperature prior to analysis.
- Avoid freezing-thawing cycles for the faecal samples as the immunological recognition of the antigen can be altered.
- Samples must be well homogenised prior to preparation.

PREPARATION OF SAMPLES

General Note: disposable gloves should be used throughout the test procedure due the handling of infectious samples. Once the work is concluded, do not forget to comply with the hygiene procedures detailed in point 4 of the "Precautions" section.

The protocol for faecal samples preparation is:

- Homogenize previously the sample to get an aliquot as much representative as possible.
- 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 faeces (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).
- Carefully add the sample into the vial containing the dilution buffer. Screw the cap well and shake vigorously to ensure a homogeneous mixture.

PROCEDURE

Once the samples have been prepared as described in previous sections, the procedure is as follows:

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

READING OF RESULTS

The strips shown in Figure 1 are an example of the different results that can be obtained with *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest. 2 different coloured bands can be distinguished:

- Upper (blue) line:** is the control line indicating a proper test performance.
- Lower (red) line:** indicates the presence of GDH in the sample.

The control blue line should always appear. The additional presence of the red line indicates the presence of GDH in the sample.

- Strip 1:** NEGATIVE result. A single transverse **BLUE** line appears aligned with the letter "C" marked on the plastic cassette or casing. This is the control line and should always appear indicating that chromatography takes place normally.
- Strip 2:** POSITIVE result. A **BLUE** line (control) and a **RED** line aligned with the label "T" marked on the casing appear. The line intensity depends on the analyte concentration in the sample.

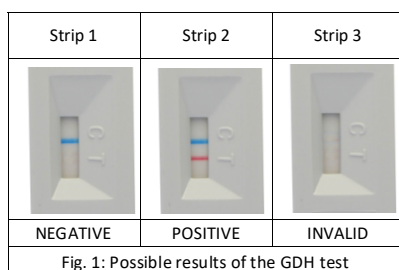


Fig. 1: Possible results of the GDH test

- Strip 3:** INVALID results. The control line does not appear, the **BLUE** colour of this line is clearly altered or non-specific colours (other than red) appear in the positive line. Any combination of colours other than those indicated above indicates abnormal functioning of the test. Possible reasons are:
 - some reagents have got damaged or the test has expired.
 - the sample was not prepared according to the instructions of 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 appears beyond 10 minutes, has no diagnostic value.

NOTE: the final and definitive diagnosis is established by the clinician. This test only detects GDH from *C. difficile* in a sample but is not an argument to conclude that the person has been infected by *C. difficile*.

QUALITY CONTROL

The test is invalid if no blue line appears, whether because the test was not performed properly, or the reagents have deteriorated. If this happens, repeat the analysis, following the work protocol indicated in these instruction sheets closely.

WARNING: Including controls with an established result is recommended to ensure that the data obtained are correct.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest is intended to aid in the diagnosis of gastrointestinal infection caused by *C. difficile* by detecting the presence of Glutamate Dehydrogenase (GDH) in human faeces as long as the protein load is equal or above the detection limit of the test.
- This is a qualitative, not quantitative test, although the intensity of positive bond relates to the amount of GDH in the stool sample.

- The test has shown good correlation with other techniques (ELISA and rapid test) after analysing a large amount of samples. However, this study does not exclude potential interference in test performance when analysing other faecal samples.
- It is important to control reaction time. If reaction time is less than that indicated, samples containing an analyte concentration significantly higher than the sensitivity limit can be seen clearly, but those that are at the limit will not appear. If the reaction time is longer than indicated, the sensitivity of the test will be affected and can give rise to incorrect interpretations.
- 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 bond is not visible). In this case, the test must be repeated with a smaller quantity of sample (see section "Stool sample preparation").
- 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 enzymes in the faeces inactivate the antigen.
- 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.
- The test results should be interpreted alongside available data from epidemiological studies, the patient's clinical evaluation, and other diagnostic procedures.
- 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 bond; instead of a light blue colour, a very dark blue or purple colour appears (see the "Reading the Results" Section).
- 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.
- The GDH screening as a first step for detecting toxigenic *C. difficile* strains presents a sensitivity limitation as it is indicated by various papers^{7,8}, in which false negative rates up to 5% are indicated.
- The performance of the test has not been established to verify the efficacy of the eradication (test of cure).

DETECTION CAPABILITY

A pure preparation of native glutamate dehydrogenase obtained from the supernatant of a *C. difficile* culture from tgcBionics was used. *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest interpreted visually and with the IUL Lateral Flow Reader, achieves a detection capacity of 1,5 ng/mL.

ANALYTICAL SPECIFICITY

Monoclonal antibodies used in GDH test offer a unique specificity for the detection of the Glutamate dehydrogenase (GDH) from *C. difficile*, without expected cross-reactions with other antigens and/or micro-organisms present in stool samples have been detected. See the cross-reactivity section.

DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

1. Internal Evaluation

A comparison between the rapid test of MONLAB and the ELISA *C. DIFF* CHEK™-60 of Techlab was done. The study included a total of 334 samples, of which 105 were positive and 229 were negative by ELISA.

The results obtained by visual interpretation of the test were as follows:

GDH		ELISA <i>C. DIFF</i> CHEK™-60	
		Positive	Negative
<i>C. DIFFICILE</i> Ag (GDH) MonlabTest	Positive	103	0
	Negative	2	229
Sensitivity concordance = $103/(103+2) \times 100 = 98,1\%$			
Specificity concordance = $229/(0+229) \times 100 > 99,9\%$			

2. External evaluation

A comparison between the rapid test MonlabTest and the rapid test *C. DIFF* QUIK CHEK® of Techlab was done in a hospital in Barcelona. The study included a total of 115 samples, of which 42 were positive and 73 were negative by the Techlab rapid test.

The results obtained by visual interpretation of the test were as follows:

GDH		<i>C. DIFF</i> QUIK CHEK®	
		Positive	Negative
<i>C. DIFFICILE</i> Ag (GDH) MonlabTest	Positive	42	3
	Negative	0	70
Sensitivity concordance = $42/(42+0) \times 100 > 99,9\%$			
Specificity concordance = $70/(70+3) \times 100 = 95,9\%$			

The 3 discordant samples were re-analysed by the *C. difficile* anaerobic culture, verifying that two of the false positives of the Monlab test are in fact positive samples.



REPEATABILITY

- INTRA-ASSAY PRECISION: Five replicates from a series of 1/2 dilutions of a characterised internal standard were analysed visually and with the IUL Lateral Flow Reader. The measurements were taken using 1 batch of the *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest product on the same day by the same person. 100% repeatability was obtained, indicating a high intra-assay precision of the test.

REPRODUCIBILITY

- INTER-DAY PRECISION: Using the same batch of *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest, a dilution curve of the standard was measured visually over five days spaced in time. The results were very reproducible as differences of less than ½ dilution were observed, acceptable and tolerable for the assay.
- INTER-OPERATOR / INTER-LABORATORY PRECISION: Five persons measured visually a dilution curve of the standard in duplicate. The differences were not observed to be more than one 1/2 dilution in any case, which is acceptable and tolerable for the technique.
- INTER-LOT PRECISION: Using four batches of *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest, a dilution curve of the standard was measured visually in duplicate. The analysis was performed by one person on the same day. The differences were observed to be equal than one 1/2 dilution, which is acceptable and tolerable for the technique.

THE HOOK OR PROZONE EFFECT

There is evidence that *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest does not present a Hook effect when evaluating increasing concentrations of the standard up to 4,000 ng/mL.

INTERFERING SUBSTANCES

The following substances did not affect the test visual 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)	Edulcorant	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

This study was developed in two different places, with visual interpretation of the results:

- MONLAB:** *C. DIFFICILE* Ag (GDH) MonlabTest was evaluated against strongly positive samples for the following micro-organisms, without finding problems of cross-reactivity: Adenovirus, Rotavirus, Norovirus, Astrovirus, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*.
- EXTERNAL 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 10⁸ cfu/mL. The GDH test showed no cross reactivity with any of the micro-organisms listed below:
Aeromonas hydrophila, *Bacillus pumillus*, *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*.

MODIFICATIONS REGARDING THE PREVIOUS VERSION OF THIS DOCUMENT

The structure of the general information provided at the beginning of the instructions is improved, itemising the different points in order to be in line with IVDR Regulation requisites.

Regarding the test's performance parameters, the following sections have been amended: "Precautions", "Samples", "Sample preparation", "Limitations of the procedure", "Detection capability", "Analytical specificity", "Diagnostic sensitivity and specificity", "Repeatability", "Reproducibility", "The Hook or prozone effect", previously "Hook effect", "Interfering substances" and "Cross-reactivity".

REFERENCES

- 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.
- 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.
- Finn E, Andersson FL and Madin-Warburton M. Burden of *Clostridioides difficile* infection (CDI) – a systematic review of the epidemiology of primary and recurrent CDI. BMC Infectious Diseases 2021, Vol: 21 pp: 456.
- 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.
- 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.

- 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.
- Wilcox MH, Planché 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
- 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.

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		Store at
	Catalogue number		Expiry date
	Lot number		Precaution

This product fulfils the requirements of Directive 98/79/EC on *in vitro* diagnostic medical devices

