

ENGLISH - ESPAÑOL

Ref: RTB25CD  
RTB25CDC  
RTB25CDCN



biotical

# C. difficile A+B Card

Rapid Test to detect  
Clostridium difficile  
A+B Toxins in card  
format.

Prueba rápida para la  
detección de Clostridium  
difficile Toxinas A+B en  
formato de tarjeta.

biotical health  
ready to test

# biotical C. difficile Toxins A+B Card

ENGLISH

## WHAT IS BIOTICAL C. DIFFICILE TOXINS A+B CARD?

---

biotical C. difficile Toxins A+B Card is a coloured chromatographic immunoassay test for the qualitative detection of *Clostridium difficile* Toxin A and B in stool samples. Thanks to its easy handling and high sensitivity, the healthcare professional can make a simple diagnosis and detect the possible presence of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in infected people.

## WHAT IS CLOSTRIDIUM DIFFICILE (*C. difficile*)?

---

*Clostridium difficile* (*C. difficile*) is a Gram-positive anaerobic bacterium. It is the main pathogen linked to diarrhoea associated with antibiotics and / or pseudomembranous colitis in hospitalized patients, the main cause of diarrhoea associated with healthcare in developed countries, and the main origin of morbidity and mortality of nosocomial disease around the world.

Most of the bacterial flora in the colon of a healthy adult is generally resistant to colonization by *C. difficile*. If the bacterial flora is altered (due to the excessive use of antibiotics, for example), resistance to colonization by this bacterium is lost and the microorganism is allowed to multiply in the colon. In addition, its ability to form spores allows it to persist in patients for long periods and facilitates faecal-oral transmission. This colonization causes the release of:

- **Toxins A and B:** toxigenic strains responsible for the clinical manifestations of the clostridium disease, which can range from non-serious watery diarrhoea, pseudomembranous colitis, toxic megacolon, to death. biotical C. difficile Toxins A + B Card will detect the presence of these enzymes.
- **Clostridium difficile Glutamate Dehydrogenase (GDH):** enzyme produced in large quantities by toxigenic (toxins A and B) and non-toxigenic strains, which makes it an excellent marker to determine the presence of the microorganism. (See biotical C. difficile GDH Card).

Toxigenic culture (TC) is the reference technique used to determine *Clostridium difficile* infection. This method comprises the culture and isolation of *C. difficile* from stool sample, followed by identification of the toxin, which requires a very laborious work to obtain a result. However, biotical C. difficile Toxins A+B Card, is a qualitative immunochromatographic test of easy use and with almost immediate results, for the detection of toxigenic *Clostridium difficile* strains in stool samples.



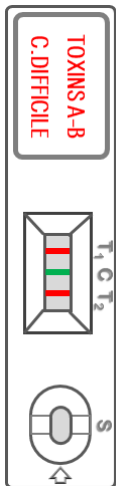
## TABLE OF REFERENCES

In the following table will be able to find all the product references related to the acquired test.

REFERENCE	NAME	CONTENT
RTB25CD	biotal C. difficile toxins A+B Card	25 tests without positive or negative control.
RTB25CDC	biotal C. difficile toxins A+B Card (+PC)	25 tests with positive control, without negative control.
RTB25CDCN	biotal C. difficile toxins A+B Card (+PC +NC)	25 tests with positive and negative control.

## HOW DOES BIOTAL C. DIFFICILE TOXINS A+B CARD WORK?

The card contains inside a test strip with a nitrocellulose membrane that has been previously pre-coated with:



- **In the T1 RED test line (Toxin A):** with mouse monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* TOXINS A.
- **In the C GREEN line (Control):** with rabbit polyclonal antibodies against a specific protein.
- **In the T2 RED test line (Toxin B):** with mouse monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* TOXINS B.
- **Sample area (S):** the pad where the sample is placed has been dispensed with a preparation of reagents of the T1 line (mouse monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* Toxin A) conjugated with latex of **RED** polystyrene; with another preparation of reagents of the T2 line (mouse monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* Toxin B) conjugated to **RED** polystyrene latex; and with another preparation for the control solution (specific binding protein) conjugated to **GREEN** polystyrene latex, forming three conjugate colored complexes.

### TEST LINE (T1/T2):

- **If the sample is positive:** The antigens of the patient's stool sample will react with one (or both) of the red coloured conjugate complexes (anti-*Clostridium difficile* Toxin A monoclonal antibodies latex red microspheres for the line T1 and anti-*Clostridium difficile* Toxin B monoclonal antibodies - red latex microspheres for the line T2) and it will advance by capillary through the membrane. As the sample migrates, so do the conjugate complexes. The antibodies anti-*Clostridium difficile* Toxin A present in the T1 line and / or the antibodies anti-*Clostridium difficile* Toxin B present in the T2 line will capture the complex giving rise in a red line.
- **If the sample is negative:** If the sample is negative and therefore does not contain antigens (or the antigen is present in a concentration below the detection limit), there is no reaction with the red coloured complexes. The anti-*Clostridium difficile* Toxin A and anti-*Clostridium difficile* Toxin B antibodies present in the T1 and T2 line will not capture the red coloured antigen-complex (not formed) and the red lines will not appear.

### CONTROL LINE (C):

- **Regardless of whether the sample is positive or not,** to verify that the test has been performed correctly (sufficient sample volume, appropriate flow, internal control of the reagents, etc.) the mixture will continue moving through the membrane towards the immobilized antibodies against the specific protein located in the control line (C). These specific anti-protein antibodies present in the membrane will capture the control conjugate complex and the green control line will always appear.



## STORAGE AND STABILITY

---

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

## GENERAL PRECAUTIONS

---

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- Used tests should be managed as sanitary waste (sanitary waste container).
- Reagents contain preservatives. Avoid any contact with skin or mucous membrane. Consult safety data sheet, available on request.
- Components provided in the kit are approved for use in the test that are supplied. Do not use any other commercial kit component if compatibility is not specified.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.
- Pale yellow or orange bands may appear in the test strip results window, at the positions where the coloured test and control lines should appear, before the test is performed. These bands are completely normal and correspond to the capture antibodies of the test. The existence of these bands does not alter the state of conservation and functionality of the kit.

## MATERIALS

---

### MATERIALS PROVIDED

- Cassette or Test Card.
- Instructions for use.
- Tubes for the sample dilution with sample diluent.
- Positive Control (only RTB25CDC & RTB25CDCN references).
- Negative Control (only RTB25CDCN reference).

### MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

- Specimen collection container.
- Disposable gloves.
- Timer.

The kit contains materials for the analysis of a maximum of 25 samples or controls.

## SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

---

Samples should be collected in a clean container. Samples must be kept cold (2-8°C), for a maximum of 1 day, until they are used. To preserve the samples for a long time, a maximum of 6 months, they must be kept frozen at -20°C. In this case, the sample must be completely thawed and brought to room temperature before it can be used in the test. Freeze and thaw cycles are not recommended, so only the amount of sample needed to perform the test should be thawed. Homogenize the sample vigorously before its preparation.



Specimen preparation (see illustration):

- Take out the cap of the stool collection tube ① and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Then, introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample ②, to collect faecal sample and add it to the stool collection tube (125mg approx). For liquid samples, add approx. 125µL in the stool collection tube using a micropipette.
- Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion ③. Use only fresh samples or fresh frozen samples without preservatives or fixatives.



TEST PROCEDURE



- Proceed to **shake the stool collection tube** in order to assure good sample dispersion.
  - Remove the test card from its sealed bag just before using it.
  - Take the stool collection tube, **cut the end of the cap** ④
  - **Dispense 4 drops** from the testing tube in the circular window marked with the letter S ⑤. Avoid adding solid particles with the liquid.
  - **Read the results at 10 minutes.** The results will not be valid after 10 minutes.
- If the test does not run due to solid particles, stir the sample added in the sample window (S) with the stick. If it does not work, dispense a drop of diluent until seeing the liquid running through the reaction zone.

## INTERPRETATION OF RESULTS

(Please refer to the illustration below)



Toxin A NEGATIVE  
Toxin B NEGATIVE



Toxin A POSITIVE  
Toxin B NEGATIVE



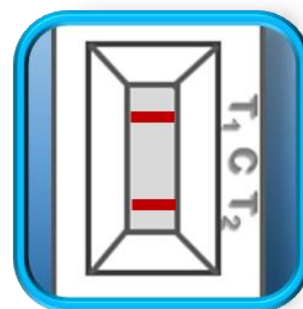
Toxin A NEGATIVE  
Toxin B POSITIVE



Toxin A POSITIVE  
Toxin B POSITIVE



INVALID



INVALID



INVALID



INVALID

	biological Test	Interpretation of the results
1	T1 = NO LINE C = GREEN T2 = NO LINE	<b>NEGATIVE FOR CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXINS A+B</b> Only the <b>GREEN</b> line appears across the results window in the site marked with the letter C (control line). No presence of CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXINS A+B is detected in the sample.
2	T1 = RED C = GREEN T2 = NO LINE	<b>POSITIVE FOR CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXIN A</b> In addition to the <b>GREEN</b> control line, a <b>RED</b> line also appears in the site marked with the letter T1 (test line) in the results window. CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXINS A presence is detected in the sample.
3	T1 = NO LINE C = GREEN T2 = RED	<b>POSITIVE FOR CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXIN B</b> In addition to the <b>GREEN</b> control line, a <b>RED</b> line also appears in the site marked with the letter T2 (test line) in the results window. CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXIN B presence is detected in the sample.



	biotal Test	Interpretation of the results
4	T1 = RED C = GREEN T2 = RED	<b>POSITIVE FOR CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXINS A + B</b> In addition to the GREEN control line, two RED lines also appears in the site marked with the letter T1 and T2 in the results window. CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXINS A + B presence is detected in the sample.
5-8	Any other result	<b>INVALID</b> Total absence of the control line (GREEN) regardless the appearance or not of the test line (RED) causes an invalid result. Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the assay with a new test. If the result still persists, discontinue using the test kit and contact your local distributor.

## NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

The intensity of the red coloured bands in the tests lines (T1 and T2) in the results windows will vary depending on the concentration of antigens present in the specimen. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in antigens can be determined by this qualitative test.

## QUALITY CONTROL

Internal procedural control is included in the test. A green line appearing in the control line (C) in the results window as an internal control, which confirms sufficient specimen volume and correct procedural technique.

The following sections (**POSITIVE CONTROL** & **NEGATIVE CONTROL**) only apply if the corresponding positive and negative controls are available (sold separately or with kits references **RTB25CDC** & **RTB25CDCN**).

## POSITIVE CONTROL: INTENDED USE & COMPOSITION

biotal C. difficile Toxin A and Toxin B Positive Control are an external quality control for the test line of Toxins A and B, respectively, of *Clostridium difficile* in biotal products. This control swab should be used to assess that the reagents and the test performance are adequate.

biotal C. difficile Toxin A Positive Control is manufactured with inactivated *Clostridium difficile* toxin A, dried on swab, contains a preservative.

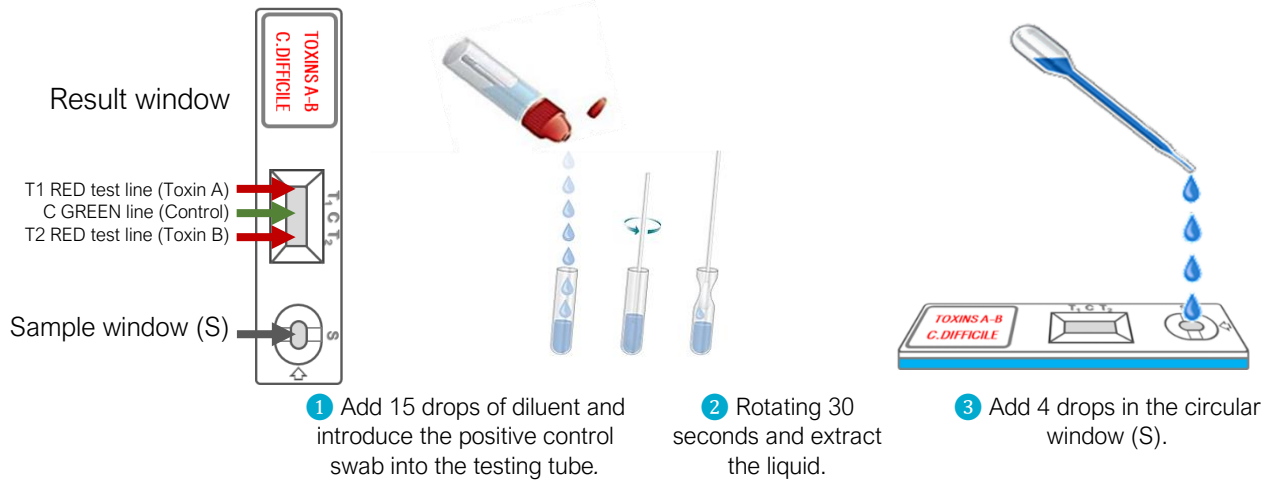
biotal C. difficile Toxin B Positive Control is manufactured with inactivated *Clostridium difficile* toxin B, dried on swab, contains a preservative.








## POSITIVE CONTROLS: TESTING PROCEDURE

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



- **Add 15 drops of diluent** and immediately introduce the positive control swab into the testing tube **1**.
- Mix the solution by **rotating the positive control swab** forcefully against the side of the testing tube at least **30 seconds** **2**. Extract as much liquid as possible from the swab, squeezing the sides of the testing tube as the swab is withdrawn. Discard the swab.
- Remove the biological device from its sealed bag just before using it.
- Use a separate pipette and test for each control. **Dispense 4 drops** from the testing tube in the circular window marked with the letter S **3**.
- **Read the result at 10 minutes**. do not read the test result later than 10 minutes.

## POSITIVE CONTROL – INTERPRETATION OF RESULTS

biological Test	Interpretation of the results
 <p>T1 = <b>RED LINE</b> C = <b>GREEN LINE</b> T2 = <b>NO LINE</b></p>	<p><b>RESULT: Toxin A POSITIVE CONTROL</b> A <b>GREEN</b> line (C) and a <b>RED</b> line (T1) appears.</p>
 <p>T1 = <b>NO LINE</b> C = <b>GREEN LINE</b> T2 = <b>RED LINE</b></p>	<p><b>RESULT: Toxin B POSITIVE CONTROL.</b> A <b>GREEN</b> line (C) and a <b>RED</b> line (T2) appears.</p>
 <p>T1 = <b>RED LINE</b> C = <b>GREEN LINE</b> T2 = <b>RED LINE</b></p>	<p><b>RESULT: Toxin A &amp; B POSITIVE CONTROL</b> A <b>GREEN</b> line (C) and two <b>RED</b> lines (T1 &amp; T2) appears.</p>



biological Test	Interpretation of the results
	<p><b>INVALID RESULTS FOR POSITIVE CONTROL.</b></p> <p>Total absence of the control line, regardless the appearance or not of any of the test lines, or only appears the control line.</p> <p>Incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the control with a new test and a new positive control swab.</p>

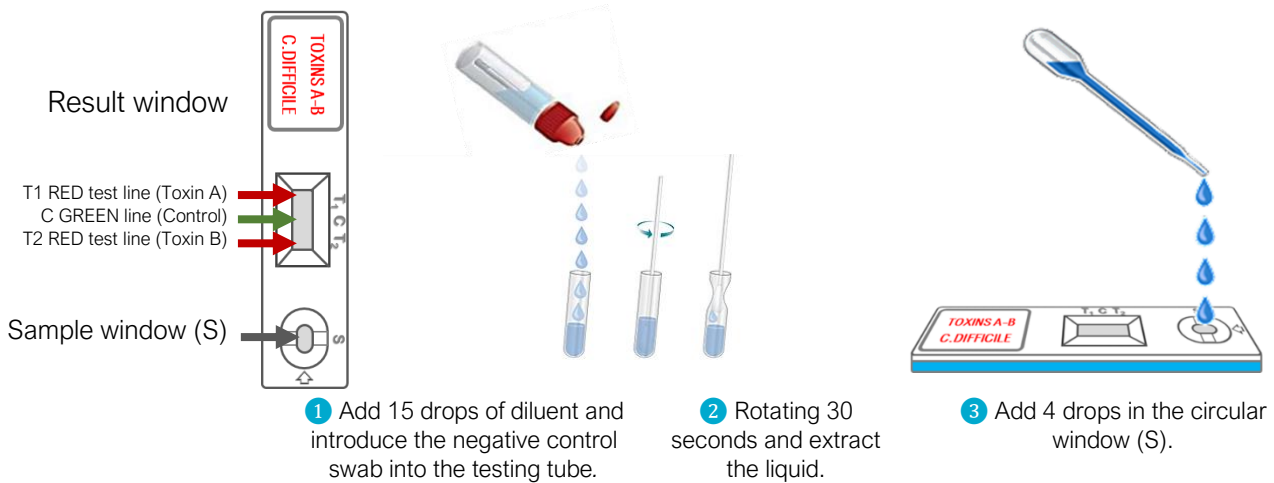
## NEGATIVE CONTROL: INTENDED USE & COMPOSITION

biological Negative Control is an external quality control for all immunochromatographic tests manufactured by biological. Use this control swab to check that the extraction reagents and the test are working properly.

biological Negative Control is manufactured with negative control buffer dried in swab containing a preservative.


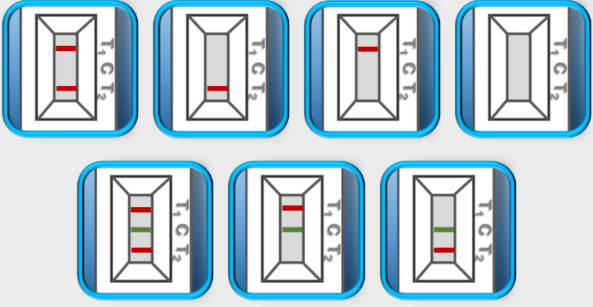
## NEGATIVE CONTROL: TESTING PROCEDURE

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



- **Add 15 drops of diluent** and immediately introduce the negative control swab into the testing tube **1**.
- Mix the solution by **rotating the negative control swab** forcefully against the side of the testing tube at least **30 seconds** **2**. Extract as much liquid as possible from the swab, squeezing the sides of the testing tube as the swab is withdrawn. Discard the swab.
- Remove the biological device from its sealed bag just before using it.
- Use a separate pipette and test for each control. **Dispense 4 drops** from the testing tube in the circular window marked with the letter S **3**.
- **Read the result at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes.

## NEGATIVE CONTROL: INTERPRETATION OF RESULTS

biotical Test		Interpretation of the results
	T1 = NO LINE C = GREEN LINE T2 = NO LINE	<b>RESULT: CONTROL NEGATIVE</b> Only the control line (C) appears across the results window during the test performance.
		<b>RESULT: INVALID FOR NEGATIVE CONTROL</b> Total absence of the control line, and/or the card shows the test line.  Incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are the main reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the control with a new test and a new negative control swab.

## LIMITATIONS OF THIS TEST

- The test should be performed no later than 2 hours after opening the bag containing it.
- Poorly defined brown lines may appear. These lines are caused by insufficient dilution of the sample and have no diagnostic value. If it occurs, the test must be repeated in a new cassette, increasing the dilution factor of the sample.
- The test has been validated with human faecal samples. Its use with other class of samples has not been tested so its use is not recommended. Proper sampling is essential to ensure the validity of the test results
- A positive test result confirms the presence of Toxins A and B in the sample, without determining its origins. To confirm the presence of infection by *Clostridium difficile* it is necessary for a specialist to evaluate the results together with the other clinical evidence of the patient. In order to issue a valid clinical diagnosis, it is necessary to confirm the results of the tests using other diagnostic techniques to identify the strain (toxigenic culture).
- False positives may occur in the test with bloody samples or mucous stools, so the use of the test in this class of samples is not recommended.
- If a negative test result is obtained and symptoms persist, it is recommended to repeat the test after a few days. A negative result does not indicate absence of infection by *Clostridium difficile*.
- It is possible to appear false negatives by not reaching the detection limit of the test.
- Bloody stool samples contain components that could cause non-specific reactions in the test. All bloody samples whose result is positive must be confirmed with other techniques.
- Mucous stool sample could cause non-specific reactions in the test. Any mucous stool sample with a positive result should be contrasted with other diagnostic techniques to confirm the result.



## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Analytical sensitivity (detection limit):

- Detection Limit for toxin A: 8-1 ng/mL.
- Detection Limit for toxin B: 6.24-0.39 ng/mL.

### Clinical sensitivity and specificity (Toxin A+B):

An evaluation was carried out with stool samples, comparing the results obtained with the biotal C. difficile Toxins A+B Card immunochromatographic test against another commercial immunochromatographic test. Discordant results were confirmed by PCR techniques.

The results were as follows:

		Evaluation criteria (Toxin A)		
		+	-	Total
<b>biotal C. difficile Toxins A+B Card</b> (T1: Toxin A)	+	25	0	25
	-	2	99	101
	Total	27	99	126

<i>Biotal C. difficile Toxin A+B Card (Toxin A) vs Evaluation Criteria</i>	MIDDLE VALUE	95% CONFIDENCE INTERVAL
SENSITIVITY	92.59%	75.7% - 99.1%
SPECIFICITY	>99.9%	96.3% - 100%
VPP	>99.9%	-
VPN	98.0%	92.9% - 99.5%
ACCURACY	98.4%	94.4% - 99.8%

		Evaluation criteria (Toxin B)		
		+	-	Total
<b>biotal C. difficile Toxins A+B Card</b> (T2: Toxin B)	+	32	0	32
	-	2	92	94
	Total	34	92	126

<i>Biotal C. difficile Toxin A+B Card (Toxin B) vs Evaluation Criteria</i>	MIDDLE VALUE	95% CONFIDENCE INTERVAL
SENSITIVITY	94.1%	80.3% - 99.3%
SPECIFICITY	>99.9%	96.1% - 100%
VPP	>99.9%	-
VPN	97.9%	92.3% - 99.4%
ACCURACY	98.4%	94.4% - 99.8%

The results showed that biotal C. difficile Toxins A+B Card has a high sensitivity and specificity to detect *Clostridium difficile* Toxins A and B.



## CROSS REACTIVITY.

An evaluation was carried out to determine possible cross-reactions of biotical *Clostridium difficile* Toxins A+B; no cross-reaction with gastrointestinal pathogens, other organisms, substances and/or fecal markers occasionally present in feces was detected.

<i>Adenovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O26	<i>Norovirus</i> GI	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Norovirus</i> GII	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Human Calprotectin	<i>Giardia</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	Human transferrin
<i>Campylobacter jejuni</i>	Bovine hemoglobin	<i>Salmonella paratyphi</i> A	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:3
<i>Clostridium difficile</i> GDH	Pork hemoglobin	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:9
<i>Clostridium perfringens</i>	Human hemoglobin	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>C.difficile</i> Tox.A (Tox.B T2 line)
<i>Entamoeba dispar</i>	Human lactoferrin	<i>Shigella boydii</i>	<i>C.difficile</i> Tox.B (Tox.A T1 line)
<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	
<i>Escherichia coli</i> O111	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella flexneri</i>	

## SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS & REAGENTS



In vitro diagnostic device



Consult instructions for use



Keep dry



Use by



Temperature limitation



Manufacturer



Contains sufficient for <n> test

DIL

Sample diluent

LOT

Batch code

REF

Catalogue number

\*\*\*

# biotical C. difficile Toxins A+B Card

ESPAÑOL

## ¿PARA QUÉ SE USA BIOTICAL C. DIFFICILE TOXINS A+B CARD?

biotical C. difficile Toxins A+B card es una prueba rápida de inmunocromatografía para la detección cualitativa de las toxinas A y B del *Clostridium difficile* en muestras de heces. Gracias a su fácil manejo y su alta sensibilidad, el profesional sanitario podrá realizar un diagnóstico sencillo y detectar la posible presencia de cepas toxigénicas de *Clostridium difficile* en personas infectadas.

## ¿QUÉ ES CLOSTRIDIUM DIFFICILE (C. DIFFICILE)?

*Clostridium difficile* (*C. difficile*) es una bacteria anaeróbica Gram-positiva. Es el principal patógeno vinculado a la diarrea asociada a antibióticos y/o colitis pseudomembranosa en pacientes hospitalizados, la principal causa de diarrea asociada al cuidado de la salud en países desarrollados, y el principal origen de morbilidad y mortalidad de enfermedad nosocomial en todo el mundo.

La mayor parte de la flora bacteriana existente en el colon de un adulto sano es generalmente resistente a la colonización por *C. difficile*. Si la flora bacteriana se altera (por el uso excesivo de antibióticos, por ejemplo), la resistencia a la colonización por esta bacteria se pierde y se permite que el microorganismo se multiplique en el colon. Además, su capacidad de formar esporas permite que esta bacteria persista en los pacientes durante largos periodos y facilita su transmisión fecal-oral. Esta colonización provoca la liberación de:

- **Toxinas A y B:** cepas toxigénicas responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, que puede van desde una diarrea acuosa autolimitante no grave, una colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico, hasta la muerte. biotical C. difficile Toxins A+B Card detectará la presencia de estas enzimas.
- **Clostridium difficile Glutamato deshidrogenasa (GDH):** enzima producida en grandes cantidades por cepas toxigénicas (toxinas A y B) y no toxigénicas, lo que le hace ser un marcador excelente para determinar la presencia del microorganismo (ver biotical C. difficile GDH Card).

El cultivo toxigénico (TC) es la técnica usada de referencia para determinar la infección por *Clostridium difficile*. Este método consiste en cultivo y aislamiento de *C. difficile* a partir de muestra de heces, seguido de identificación de la toxina, lo que requiere un trabajo muy laborioso para obtener un resultado. Sin embargo, biotical C. difficile Toxins A+B Card, es una prueba cualitativa inmunocromatográfica, de fácil utilización y con resultados casi inmediatos, para la detección de cepas toxigénicas de *Clostridium difficile* en muestras de heces.

## TABLA DE REFERENCIAS

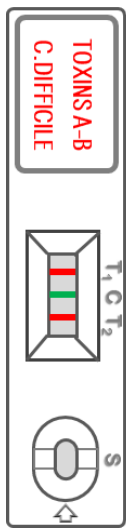
En la siguiente tabla puede encontrar todas las referencias de productos relacionados con el test adquirido.



REFERENCIA	NOMBRE	CONTENIDO
RTB25CD	biotical C. difficile toxins A+B Card	25 Test sin control positivo ni negativo.
RTB25CDC	biotical C. difficile toxins A+B Card (+PC)	25 Test con control positivo.
RTB25CDCN	biotical C. difficile toxins A+B Card (+PC +NC)	25 Test con control positivo y negativo.

## ¿CÓMO FUNCIONA BIOTICAL C. DIFFICILE TOXINS A+B CARD?

El casete (card) posee en su interior una tira reactiva con una membrana de nitrocelulosa que ha sido fijada previamente:



- **En la línea T<sub>1</sub> ROJA (Test Toxina A):** con anticuerpos monoclonales de ratón frente a la Toxina A de *C. difficile*.
- **En la línea C VERDE (Control):** con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica.
- **En la línea T<sub>2</sub> ROJA (Test Toxina B):** con anticuerpos monoclonales de ratón frente a la Toxina B de *C. difficile*.
- **en la zona de muestra (S):** se ha dispensado una preparación de reactivos de la línea T1 (anticuerpos monoclonales de ratón frente a Toxina A del *Clostridium difficile*) conjugados con látex de poliestireno ROJO; otra preparación con reactivos de la línea T2 (anticuerpos monoclonales de ratón frente a Toxina B del *Clostridium difficile*) conjugados con látex de poliestireno ROJO; y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno VERDE; formando tres complejos coloreados conjugados.

### LÍNEA DE TEST (T1/ T2):

- **Si la muestra es positiva:** Los antígenos de la muestra de heces del paciente reaccionarán con alguno (o con ambos) de los complejos conjugados coloreados rojos (anticuerpos monoclonales anti-Toxina A del *Clostridium difficile* -microesferas rojas de látex para la línea T1 y anticuerpos monoclonales anti-Toxina B del *Clostridium difficile* -microesferas rojas de látex para la línea T2) y avanzarán por capilaridad a través de la membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados. Los anticuerpos anti-Toxina A del *Clostridium difficile* presentes en la línea de T1 y/o los anticuerpos anti-Toxina B del *Clostridium difficile* presentes en la línea de T2 capturarán el complejo dando lugar a una línea roja.
- **Si la muestra es negativa:** Si la muestra es negativa y por lo tanto no contiene antígenos (o estos está presentes en una concentración inferior al límite de detección), no se producirá reacción con los complejos coloreados rojos. Los anticuerpos anti-Toxina A del *Clostridium difficile* y anti-Toxina B del *Clostridium difficile* presentes en las líneas T1 y T2 no capturarán los antígenos complejos coloreados y no aparecerán las líneas rojas.

### LÍNEA DE CONTROL (C):

- **Independientemente de que la muestra sea positiva o negativa,** para verificar que se ha realizado correctamente el test (volumen de muestra suficiente, flujo apropiado, control interno de los reactivos, etc.) la mezcla continuará moviéndose a través de la membrana hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en la línea de control (C). Estos anticuerpos antiproteína específica presentes en la membrana capturarán el complejo conjugado de control y la línea de control verde siempre aparecerá.

## CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

---

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

## PRECAUCIONES GENERALES

---

- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Un nuevo test deberá utilizarse para cada muestra para evitar errores de contaminación.
- Los test y las muestras deben desecharse en un contenedor de residuos sanitarios adecuado después de su uso.
- Los reactivos contienen conservantes. Evite cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consulte la ficha de datos de seguridad, disponible bajo petición.
- Los componentes incluidos en el kit están aprobados para su uso en la prueba que se suministran. No utilice ningún otro componente de kit comercial si no se especifica la compatibilidad.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio, use ropa protectora, use guantes de eliminación, gafas y máscara. No coma, bebe ni fume en el área de trabajo.
- Es posible que aparezcan bandas color amarillo o naranja pálido en la ventana de resultados de las tiras de test, en las posiciones donde deberán aparecer las bandas coloreadas de test y control, antes de que se realice la prueba. Estas bandas son completamente normales y corresponde a los anticuerpos de captura de la prueba. La existencia de estas bandas no altera el estado de conservación y funcionalidad del kit.

## MATERIALES

---

### MATERIALES SUMINISTRADOS

- Casete o tarjeta (Card) del test.
- Instrucciones de uso.
- Tubos para dilución de muestra con diluyente.
- Control positivo (solo en la referencia RTB25CDC y RTB25CDCN).
- Control negativo (solo en la referencia RTB25CDCN).

### MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Recipiente para recogida de muestras.
- Guantes desechables.
- Cronómetro.

El kit contiene materiales para el análisis de hasta 25 muestras o controles.

## RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

---

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio. Las muestras se deben conservar en frío (2-8°C), máximo durante 1 día, hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 6 meses, deben mantenerse congeladas a -20°C. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. Ciclos de congelación y descongelación no son recomendables, por lo que, se debe descongelar únicamente la cantidad necesaria de muestra para hacer la prueba. Homogeneizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.



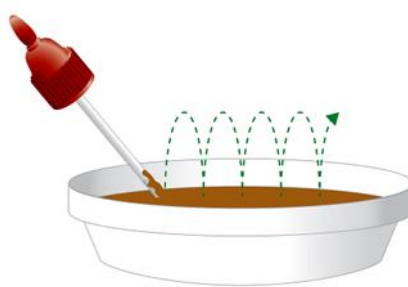


**Preparación de la muestra (ver dibujo):**

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



**1** Tubo para dilución de muestra



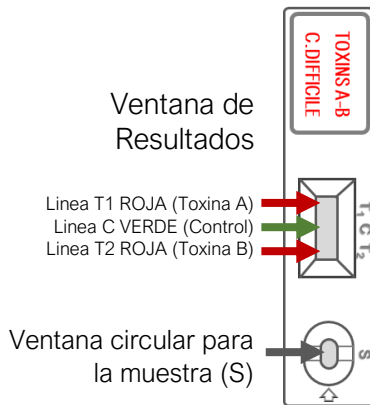
**2** Muestra de heces



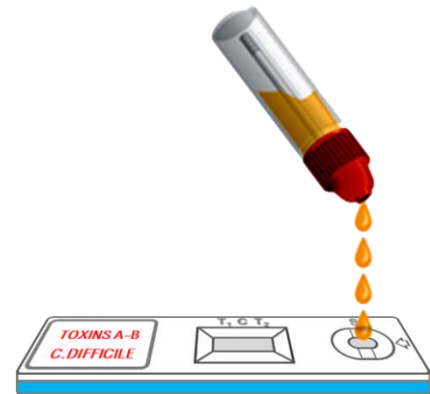
**3** Agite vigorosamente

## PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

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



**4** Cortar el extremo de la tapa.



**5** Añadir 4 gotas en la ventana circular (S).

- Proceder a **agitar el tubo de recogida de heces** para asegurar una buena dispersión de la muestra.
- Retire la tarjeta de test (card) de su bolsa sellada justo antes de usarla.
- Tomar el tubo para dilución de muestra, **cortar la punta del tapón** **4**.
- **Añadir 4 gotas** del tubo de ensayo en la ventana circular marcada con la letra S **5**. Evite añadir partículas sólidas con el líquido.
- **Leer los resultados a los 10 minutos**. Los resultados no serán válidos después de 10 minutos.

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

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

(Por favor fijese a la ilustración de abajo)



Toxina A NEGATIVA  
Toxina B NEGATIVA



Toxina A POSITIVA  
Toxina B NEGATIVA



Toxina A NEGATIVA  
Toxina B POSITIVA



Toxina A POSITIVA  
Toxina B POSITIVA



INVÁLIDO



INVÁLIDO



INVÁLIDO



INVÁLIDO

	biotical Test	Interpretación de los resultados.
1	T1 = SIN LÍNEA C = VERDE T2 = SIN LÍNEA	<b>NEGATIVO PARA <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i> TOXINS A+B</b> Solo aparece la línea VERDE en la ventana de resultados en el sitio marcado con la letra C (línea de control). No se detecta presencia de <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i> TOXINAS A o B en la muestra.
2	T1 = ROJA C = VERDE T2 = SIN LÍNEA	<b>POSITIVO PARA <i>C. difficile</i> Toxina A</b> Además de la línea de control VERDE, también aparece una línea ROJA en el sitio marcado con la letra T (línea de test) en la ventana de resultados. Se detecta presencia de <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i> TOXINA A en la muestra.
3	T1 = SIN LÍNEA C = VERDE T2 = ROJA	<b>POSITIVO PARA <i>C. difficile</i> Toxina B</b> Además de la línea de control VERDE, también aparece una línea ROJA en el sitio marcado con la letra T (línea de test) en la ventana Resultados. Se detecta presencia de <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i> TOXINA B en la muestra.



	biotical Test	Interpretación de los resultados.
4	T1 = <b>ROJA</b> C = <b>VERDE</b> T2 = <b>ROJA</b>	<p><b>POSITIVO PARA C. difficile toxinas A y B</b></p> <p>Además de la línea de control <b>VERDE</b>, también aparecen las líneas <b>ROJAS</b> en el sitio marcado con la letra T1 y T2 (línea de test) en la ventana de resultados. Se detecta presencia de CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOXINAS A o B en la muestra.</p>
5-8	Cualquier otro resultado	<p><b>RESULTADO NO VÁLIDO</b></p> <p>La ausencia total de la línea de control (<b>VERDE</b>) sin importar si aparece o no la línea de test (<b>ROJA</b>) causa un resultado no válido. Un volumen insuficiente de la muestra, técnicas de procedimiento incorrectas o el deterioro de los reactivos son las razones principales por las que aparece este resultado. Revise el procedimiento y repita el ensayo con un nuevo test. Si el resultado persiste, póngase en contacto con su distribuidor local.</p>

## NOTAS SOBRE LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La intensidad de la línea de color rojo en las líneas de test (T1 / T2) en la ventana de resultados variará dependiendo de la concentración de antígeno presente en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de antígeno pueden ser determinados por la misma.

## CONTROL DE CALIDAD

El test incluye un control interno de procedimiento. La línea verde que aparece en la línea de control (C) en la ventana de resultados es el control interno del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

Las siguientes secciones (**CONTROL POSITIVO & CONTROL NEGATIVO**) solo se aplica si los controles positivo o negativo correspondiente están disponibles (vendidos por separado o con kits con referencias **RTB25CDC & RTB25CDCN**).

## CONTROL POSITIVO: USO PREVISTO & COMPOSICIÓN

biotical C. difficile Toxin A Positive Control y Toxin B Positive Control son dos controles de calidad externos para la línea de test de las Toxinas A y B, respectivamente, de *Clostridium difficile* en productos biotical. Este hisopo control se debe usar para evaluar que los reactivos y el funcionamiento del test son adecuados.

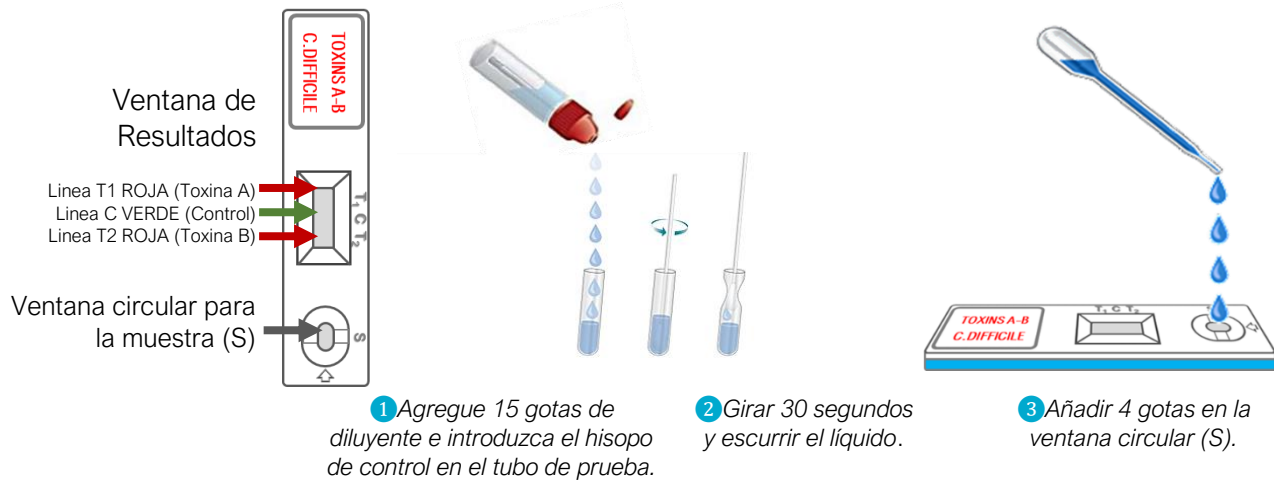
biotical C. difficile Toxin A Positive Control está fabricado a partir de Toxina A inactivada de *Clostridium difficile* secada en hisopo, contiene un conservante.

biotical C. difficile Toxin B Positive Control está fabricado a partir de Toxina B inactivada de *Clostridium difficile* secada en hisopo, contiene un conservante.



## CONTROL POSITIVO: PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Deje que los test y los controles alcancen la temperatura ambiente (15-30°C) antes de realizar la prueba. No abra el envase del test hasta la realización del ensayo.



- **Añadir 15 gotas de diluyente.** Introduzca el hisopo de control en el tubo de prueba **1**.
- Mezcle la solución **girando el hisopo de control** con fuerza contra el lado del tubo de prueba al menos **30 segundos 2**. Escurra tanto líquido como sea posible del hisopo, presionando los lados del tubo de prueba a medida que se retira el hisopo. Descartar el hisopo.
- Retire la tarjeta de test biotical correspondiente de su bolsa sellada justo antes de usarlo.
- Use una pipeta y prueba separada para cada control. **Dispense 4 gotas** desde el tubo de prueba en la ventana circular marcada con la letra S **3**.
- **Lea el resultado a 10 minutos.** Los resultados no serán válidos transcurridos 10 minutos.

## CONTROL POSITIVO: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

biotical Test	Interpretación de los resultados
<p>T1 = <b>LÍNEA ROJA</b> C = <b>LÍNEA VERDE</b> T2 = <b>SIN LÍNEA</b></p>	<p><b>RESULTADO: Toxina A CONTROL POSITIVO</b></p> <p>Aparece la línea de control <b>VERDE</b> junto con la línea T1 <b>ROJA</b></p>
<p>T1 = <b>SIN LÍNEA</b> C = <b>LÍNEA VERDE</b> T2 = <b>LÍNEA ROJA</b></p>	<p><b>RESULTADO: Toxina B CONTROL POSITIVO</b></p> <p>Aparece la línea de control <b>VERDE</b> junto con la línea T2 <b>ROJA</b></p>
<p>T1 = <b>LÍNEA ROJA</b> C = <b>LÍNEA VERDE</b> T2 = <b>LÍNEA ROJA</b></p>	<p><b>RESULTADO: Toxina A &amp; B CONTROL POSITIVO</b></p> <p>Aparece la línea de control <b>VERDE</b> junto con las dos líneas T1 y T2 <b>ROJAS</b></p>

biotical Test	Interpretación de los resultados
	<p><b>RESULTADO INVALIDO PARA CONTROL POSITIVO</b></p> <p>Ausencia total de la línea de control, importar si aparece o no las líneas de test, o bien aparece únicamente la línea de control.</p> <p>Procedimientos incorrectos o deterioro de los reactivos son las razones principales por las que puede no aparecer la línea de control. Revise el procedimiento y repita el control con una nueva tarjeta de test y un nuevo hisopo de control positivo.</p>

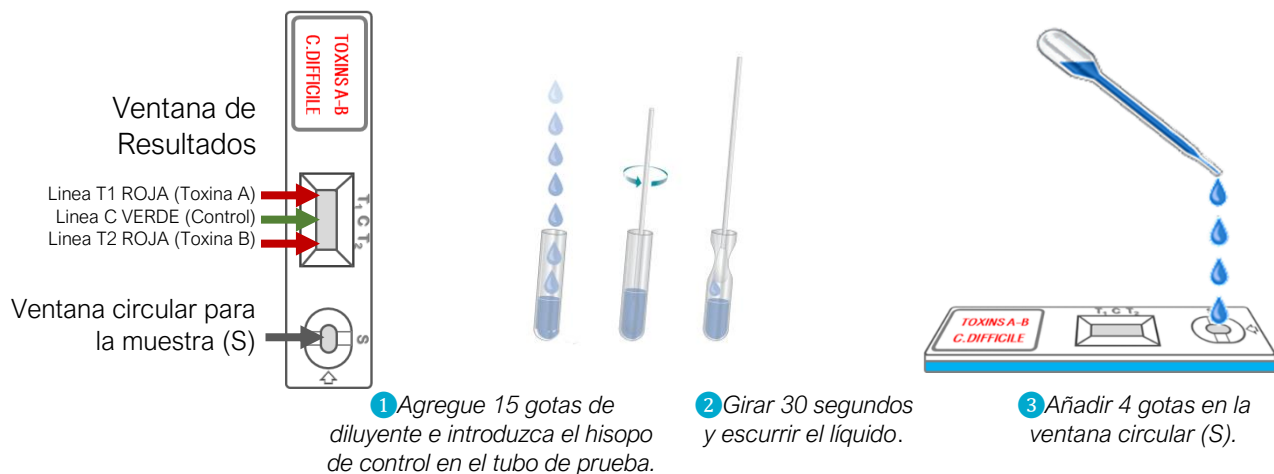
## CONTROL NEGATIVO: USO PREVISTO & COMPOSICIÓN

biotical Negative Control es un control de calidad externo para todas las pruebas inmunocromatográficas fabricadas por biotical. Use este hisopo de control para verificar que los reactivos de extracción y la prueba funcionen correctamente.

biotical Negative Control está fabricado con tampón de control negativo secado en hisopo, contiene un conservante.


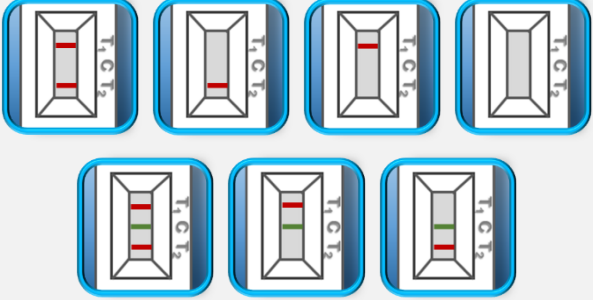
## CONTROL NEGATIVO: PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Deje que los test y los controles alcancen la temperatura ambiente (15-30°C) antes de realizar la prueba. No abra el envase del test hasta la realización del ensayo.



- **Añadir 15 gotas de diluyente.** Introduzca el hisopo de control en el tubo de prueba 1.
- Mezcle la solución **girando el hisopo de control** con fuerza contra el lado del tubo de prueba al menos **30 segundos** 2. Escurra tanto líquido como sea posible del hisopo, presionando los lados del tubo de prueba a medida que se retira el hisopo. Descartar el hisopo.
- Retire la tarjeta de test biotical de su bolsa sellada justo antes de usarlo.
- Use una pipeta y prueba separada para cada control. **Dispense 4 gotas** desde el tubo de prueba en la ventana circular marcada con la letra S 3.
- **Lea el resultado a 10 minutos.** Los resultados no serán válidos transcurridos 10 minutos.

## CONTROL NEGATIVO: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

biotical Test	Interpretation of the results
 <p>T1 = NO HAY LÍNEA C = <b>LÍNEA VERDE</b> T2 = NO HAY LÍNEA</p>	<p><b>RESULT: CONTROL NEGATIVE</b></p> <p>Solo aparece la línea de control (C) en la ventana de resultados durante la prueba.</p>
	<p><b>RESULT: INVALID FOR NEGATIVE CONTROL</b></p> <p>La ausencia total de la línea de control, y/o aparición de la línea de test.</p> <p>Técnicas de procedimiento incorrectas o deterioro de los reactivos son las razones principales de que no aparezca la línea de control. Revise el procedimiento y repita el control con una nueva prueba y un nuevo hisopo de control negativo.</p>

## LIMITACIONES DEL PRESENTE TEST

- El test debe ser realizado como máximo hasta 2 horas después de haber abierto la bolsa que lo contiene.
- Pueden aparecer líneas poco definidas color pardo. Son ocasionadas por una dilución insuficiente de la muestra y no poseen valor diagnóstico alguno. En caso de producirse, se deberá repetir el test en un nuevo casete, aumentando el factor de dilución de la muestra.
- El test ha sido validado con muestras fecales humanas. Su uso con otra clase de muestras no ha sido probado por lo que no se recomienda su utilización. Una adecuada toma de muestras es primordial para asegurar la validez de los resultados del test.
- Un resultado positivo del test confirma la presencia de las Toxinas A y B de *Clostridium difficile* en la muestra, sin determinar su origen. Para confirmar la infección por *Clostridium difficile* es necesario que un especialista evalúe los resultados junto con las demás evidencias clínicas del paciente. Para poder emitir un diagnóstico clínico válido es necesario confirmar los resultados del test mediante otras técnicas diagnósticas que permitan identificar la cepa (cultivo toxigénico).
- Pueden producirse falsos positivos en el test en muestras sanguinolentas o heces mucosas, por lo que no se recomienda el uso del test en esta clase de muestras.
- En caso de obtenerse un resultado negativo en el test y persistir los síntomas, es recomendable repetir la prueba transcurrido unos días. Un resultado negativo no indica ausencia de infección por *Clostridium difficile*. Es posible la aparición de falsos negativos por no alcanzar el límite de detección del test.
- Las muestras de heces sanguinolentas contienen componentes que podrían causar reacciones inespecíficas en el test. Toda muestra sanguinolenta cuyo resultado es positivo debe confirmarse con otras técnicas.
- Muestra de heces mucosas podrían provocar reacciones inespecíficas en el test. Toda muestra de heces mucosas cuyo resultado sea positivo debería ser contrastado con otras técnicas diagnósticas para confirmar el resultado.



## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### Sensibilidad analítica (límite de detección):

- Límite de detección para toxina A: 8-1 ng/mL.
- Límite de detección para toxina B: 6.24-0.39 ng/mL.

### Sensibilidad y especificidad clínica:

Se llevó a cabo una evaluación con muestras de heces, comparando los resultados obtenidos con el test inmunocromatográfico biotical C. difficile Toxins A+B Card frente a otro test inmunocromatográfico comercial. Los resultados discordantes fueron confirmados mediante técnicas PCR.

Los resultados se muestran a continuación:

		Criterio de evaluación (Toxin A)		
		+	-	Total
<b>biotical C. difficile Toxins A+B Card</b> (T1: Toxin A)	+	25	0	25
	-	2	99	101
	Total	27	99	126

<i>biotical C. difficile Toxins A+B Card (Toxin A) vs Criterio de Evaluación</i>	VALOR MEDIO	95% INTERVALO DE CONFIANZA
SENSIBILIDAD	92.59%	75.7% - 99.1%
ESPECIFICIDAD	>99.9%	96.3% - 100%
VPP	>99.9%	-
VPN	98.0%	92.9% - 99.5%
PRECISIÓN	98.4%	94.4% - 99.8%

		Criterio de evaluación (Toxin B)		
		+	-	Total
<b>biotical C. difficile Toxins A+B Card</b> (T2: Toxin B)	+	32	0	32
	-	2	92	94
	Total	34	92	126

<i>biotical C. difficile Toxins A+B Card (Toxin B) vs Criterio de Evaluación</i>	VALOR MEDIO	95% INTERVALO DE CONFIANZA
SENSIBILIDAD	94.1%	80.3% - 99.3%
ESPECIFICIDAD	>99.9%	96.1% - 100%
VPP	>99.9%	-
VPN	97.9%	92.3% - 99.4%
PRECISIÓN	98.4%	94.4% - 99.8%

Los resultados mostraron que biotical C. difficile Toxins A+B Card presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Clostridium difficile* Toxinas A y B.



## REACTIVIDAD CRUZADA

Se llevó a cabo una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas de biotical C. difficile Toxins A+B Card; no se detectó reacción cruzada con patógenos gastrointestinales, otros organismos, sustancias y/o marcadores fecales ocasionalmente presentes en las heces.

<i>Adenovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O26	<i>Norovirus</i> GI	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Norovirus</i> GII	<i>Streptococcus pneumococcal</i>
Calprotectina humana	<i>Giardia</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	Transferrina humana
<i>Campylobacter jejuni</i>	Hemoglobina bovina	<i>Salmonella paratyphi</i> A	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:3
<i>Clostridium difficile</i> GDH	Hemoglobina porcina	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Yersinia Enterocolitica</i> O:9
<i>Clostridium perfringens</i>	Hemoglobina humana	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>C.difficile</i> Tox.A (Tox.B T2 línea)
<i>Entamoeba dispar</i>	Lactoferrina humana	<i>Shigella boydii</i>	<i>C.difficile</i> Tox.B (Tox.A T1 línea)
<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	
<i>Escherichia coli</i> O111	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella flexneri</i>	

## SÍMBOLOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS DE IVD



Producto para diagnóstico in vitro



Consultar las instrucciones de uso



Almacenar en lugar seco



Fecha de caducidad



Limitación de temperatura



Fabricante



Contiene <n> test

DIL

Diluyente de muestra

LOT

Número de lote

REF

Número de referencia

\*\*\*

## REFERENCES / BIBLIOGRAFÍA / RÉFÉRENCES /

---

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



Sierra de Guadarrama, 1. Ed. Dublín  
28830 San Fernando de Henares. Madrid  
Tel.: + 34 91 677 43 08

[info@biotical.es](mailto:info@biotical.es)  
[www.biotical.es](http://www.biotical.es)

