

CONSENSO INTERSOCIEDADES PARA DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LAS INFECCIONES POR CLOSTRIDIODES DIFFICILE

GRUPO DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

RECOMENDACIONES SOBRE EL TIPO DE MUESTRA Y LA OPORTUNIDAD DE HACER DIAGNOSTICO EN EL LABORATORIO DE LA INFECCION POR *Clostridioides difficile* (ICD)

Coordinación: Liliana Fernández-Canigia^{1,2}, Javier Desse^{3,4}.

Expertos participantes - SubComisión de Bacterias Anaerobias - SADEBAC-AAM²: Claudia Barberis, Liliana Castello, Graciela Greco, María Cristina Legaria, Mirta Litterio, María Laura Maldonado, Silvia Carla Predari, Raquel Rollet, María Adelaida Rossetti y Daniela Vaustat.

1: Hospital Alemán. CABA; 2: Subcomisión de Bacterias Anaerobias, Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC), Asociación Argentina de Microbiología (AAM)- 3: Hospital Zonal Dr. Enrique Erill, Pcia. Buenos Aires; 4: Sociedad Argentina de Infectología (SADI).

En el año 2020 se publicó el consenso RECOMENDACIONES INTERSOCIEDADES PARA DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LAS INFECCIONES POR *CLOSTRIDIODES DIFFICILE*. Editores responsables: Laura Barcán, Jorge V. Martínez y Laura Ducatenzeiler. Medicina (Buenos Aires) 2020;80 Supl 1: https://www.medicinabuenosaires.com/volumen-80-ano-2020-s-1-indice/clostridioides_difficile/ por iniciativa de la Sociedad Argentina de Infectología (SADI), que convocó a diferentes sociedades científicas relacionadas con el tema ICD. Nuestra Sociedad, SADEBAC, fue invitada a través de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias para participar del grupo de Diagnóstico de Laboratorio.

En este link les facilitamos las recomendaciones que surgieron del consenso con una ampliación sobre detalles técnicos y consideraciones para el diagnóstico de laboratorio, que son de interés particular de los microbiólogos

RECOMENDACIONES

¿Cuál es la población susceptible para estudiar la infección por *Clostridioides difficile* (ICD)?

Recomendaciones

- Paciente con diarrea aguda que no pueda ser explicada por otras condiciones o causas y asociada a factores de riesgo. (BII)
- Paciente con íleo paralítico y/o megacolon tóxico relacionados a ICD. (BII)

¿Cuáles son las características de las muestras para estudiar ICD?

Recomendaciones

- Heces desligadas o líquidas que adopten la forma del recipiente. (BII)
- Heces formadas o hisopado rectal, solo en pacientes con íleo. (BII)

¿Es útil repetir la prueba diagnóstica?

Recomendaciones

- No repetir la prueba con una nueva muestra durante el mismo episodio ante un resultado negativo, dentro de los siete días de realizada la primera prueba. (BII)
- No realizar prueba de control de tratamiento. (BII)

Revisión de la evidencia

La detección de *C.difficile* en materia fecal (MF) no siempre indica enfermedad. La frecuencia de colonización por *C. difficile* en adultos asintomáticos sin contacto reciente con el sistema de salud es <3% y en pacientes hospitalizados es 20-50%¹⁻³.

En pacientes menores de 3 años las tasas de colonización son altas. Aún es controvertido si puede existir ICD en menores de 1 año. En esta población la tasa de colonización oscila entre 50-70%⁴. A los 2 años las tasas se mantienen entre 35-46% y hacia los 3 años los valores se equiparan a los de un adulto no hospitalizado⁵. Dada la alta tasa de colonización en niños (sobre todo entre 1 y 3 años), se debe ser más estricto aún, en la selección del paciente a estudiar^{3,6}.

Se deberán procesar muestras de heces desligadas o líquidas⁷. No se recomienda la búsqueda del microorganismo en pacientes asintomáticos, excepto en el contexto de una investigación epidemiológica^{2,3,8}. Sólo en los casos de íleo se pueden estudiar muestras obtenidas con hisopo, preferentemente de material sintético, y en especial si se va a utilizar un método molecular.

Recolectar un volumen no menor a 5 ml de MF de reciente emisión en un recipiente estéril. Procesar la muestra en un lapso no mayor a 2 h, de lo contrario conservar a 4 - 8 °C hasta 48 h; para períodos mayores congelar a -20/-70 °C. Esta etapa es crítica, sobre todo para la detección de las toxinas, debido a que las mismas sufren proteólisis a temperatura ambiente⁹

Diferentes autores concluyeron que la repetición de las pruebas dentro de los 7 días, no aporta datos relevantes a la clínica^{2,10-13}. Las pruebas de alta sensibilidad utilizadas como tamizaje tienen valores predictivos negativos (VPN) elevados, que permiten descartar la ICD. Por otro lado, los estudios realizados con detección de toxinas por enzoinmunoanálisis (EIA) o con métodos moleculares, mostraron que la repetición sólo aumenta la probabilidad de diagnóstico hasta un 2%^{14,15}. Únicamente se sugiere repetir el muestreo en un lapso menor a 7 días, cuando los síntomas empeoran².

El único "test de cura" es la resolución de la diarrea^{3,11}. *C. difficile* y sus toxinas pueden ser detectados durante períodos prolongados luego de la desaparición de los síntomas. La excreción de toxinas varía entre 13 y a 24% a las 2 semanas postratamiento y es de

aproximadamente un 6% al llegar a las 4 semanas^{2,16,17}. Asimismo, las pruebas moleculares permanecen positivas por varias semanas en más del 60% de los pacientes^{18,19}.

¿Cuál es el rédito de los métodos diagnósticos disponibles?

Recomendaciones

- Realizar la prueba de detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) como método de tamizaje para descartar ICD por su elevado VPN. (AI)
- Un resultado positivo de GDH debe ser confirmado con un método de mayor especificidad (AI).
- Las pruebas de EIA para las toxinas A y B (EIA TOX) confirman el diagnóstico por su elevada especificidad. (AI)
- No utilizar los EIA TOX como única prueba diagnóstica dada su baja sensibilidad. (AI)
- Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (AAN) comerciales (*real-time* PCR) pueden ser utilizadas como método de tamizaje para descartar ICD por su elevado VPN. (AI)
- No utilizar las pruebas de AAN como único ensayo para realizar el diagnóstico ya que los VPP son bajos, especialmente cuando la prevalencia de ICD es baja (<10%). (BII)

Revisión de la evidencia

Existen dos métodos de referencia para evaluar los ensayos para el diagnóstico de la ICD que detectan distintos blancos, el ensayo de citotoxicidad celular (ECC) y el cultivo toxigénico (CT) (Tabla 1)^{13,17,20}.

El ECC consiste en detectar la presencia de la toxina B libre en un filtrado de MF aplicado sobre una línea celular. Si luego de la incubación se observara efecto citotóxico (redondeo de las células), se realiza el ensayo de neutralización con la antitoxina específica de *C. difficile*, lo cual determina la especificidad del ensayo. Las principales limitaciones son: 1) no es un método estandarizado; 2) tiempo de respuesta de 1 a 2 días para su ejecución hasta emitir el informe; 3) no es accesible para la mayoría de los laboratorios clínicos por la complejidad requerida y 4) el alto costo. El ECC posee alta especificidad y sensibilidad, aunque este último parámetro puede verse afectado por el tiempo de transporte y/o inhibidores propios de la muestra. (Tabla 1)^{2,9}.

El CT se basa en el aislamiento del microorganismo de la MF y la detección posterior de las toxinas *in vitro*. El procedimiento comienza con la exposición de un volumen de las heces diarreas al shock etanólico o al shock térmico. Este paso tiene por objeto realizar la selección de las esporas e inhibir la microbiota fecal acompañante. Luego, se siembra en un medio selectivo y se incuba a 35-37°C durante no menos de 48 horas y hasta 5 días en atmósfera anaerobia⁹. El desempeño del CT se puede mejorar utilizando medios líquidos de enriquecimiento como el caldo con taurocolato^{3,17}). Inclusive, ante una fuerte presunción clínica, con la detección de GDH positiva, toxinas A/B directas negativas y un primer CT negativo se puede intentar un segundo cultivo a partir de la MF conservada a -20°C. En aproximadamente el 20% de estos casos este segundo CT resulta positivo con buena correlación con la evolución clínica del paciente (observación personal).

Existen distintas formulaciones de medios de cultivo para la recuperación de *C. difficile* mediante preparaciones *in house* o comerciales. El agar cicloserina-cefoxitina-fructosa (CCFA) es un medio selectivo y diferencial descrito especialmente para el cultivo de *C. difficile*. Una variante de CCFA es el medio de Brazier que utiliza la base del agar yema de huevo más la cicloserina y la cefoxitina. Otra alternativa más simple y económica es cultivar la materia fecal, luego del shock etanólico, en agar sangre suplementado con cefoxitina. Para estimular la producción y selección de las esporas se propone la adición de lisozima y/o taurocolato a las distintas formulaciones. Las colonias compatibles con *C. difficile* se identifican en base a la morfología colonial y celular, el característico olor "a establo", pruebas bioquímicas convencionales, galerías multipuebas comerciales, cromatografía gas-líquido o MALDI-TOF MS. Una vez identificados, los aislados deben estudiarse para verificar la producción *in vitro* de las toxinas por ECC (toxina B), EIA (toxinas A/B), o PCR (genes codificantes de las toxinas). Actualmente se cuenta con medios cromogénicos que son selectivos y diferenciales los cuales facilitan el aislamiento e identificación de *C. difficile* a partir de muestras fecales, en especial para los laboratorios que tienen menos experiencia en el cultivo de anaerobios. Estos medios permiten el crecimiento de colonias en menor tiempo (24 a 48 horas) para detectar la toxina a partir del aislado^{13,17}.

El cultivo tiene como desventajas que se necesita el agregado de otro método diagnóstico sobre el microorganismo aislado para detectar toxigenicidad; es laborioso, de alto costo y requiere personal entrenado en cultivo de anaerobios. Tiene una mayor sensibilidad que el ECC a expensas de una menor especificidad porque puede detectar portadores de *C. difficile* toxigénico (excretores toxigénicos). Su uso está indicado en situación de brotes, estudios epidemiológicos y pruebas de sensibilidad a los antibióticos¹³. No se recomienda para el diagnóstico clínico inicial porque los tiempos de respuesta no son adecuados, pero es útil en un algoritmo diagnóstico, cuando hay sospechas de ICD y no se detectan las toxinas sobre la MF con los métodos de baja sensibilidad^{9,13,17}. (Tabla 1 y Fig.1).

Los dos métodos, el ECC y el CT, detectan distintos blancos: la toxina B de *C. difficile* *-in vivo*- y la cepa aislada capaz de producir las toxinas A/B *-in vitro*-, respectivamente. Esto es una limitación al momento de evaluar la evidencia en la bibliografía.

En un meta-análisis, Crobach et al., evaluaron los métodos disponibles para el diagnóstico de ICD - el EIA GDH, el EIA toxinas A/B y la AAN- frente a ambos métodos de referencia. Los EIA TOX correlacionaron mejor con el ECC y fueron menos sensibles que el CT. Mientras que las pruebas de AAN fueron menos específicas comparadas con el ECC, ya que no pueden discernir las muestras con producción de toxinas *in vivo*, pero correlacionaron mejor con el CT. Por esta razón, al evaluar una prueba para el diagnóstico de ICD se la debería comparar frente al método de referencia (ECC o CT), cuyo blanco sea equivalente al de la prueba^{13,20}.

Un estudio prospectivo multicéntrico diseñado para validar clínicamente los métodos patrones, mostró que la mortalidad era significativamente mayor en el grupo de pacientes con ECC+ frente al grupo que sólo presentó el CT+ (16,6% vs 9,7%, $p=0,044$). Planche et al, en concordancia con otros autores, concluyeron que la detección de toxina libre en MF correlacionó mejor con la evolución clínica y los casos verdaderos de ICD^{21,22}.

El CT -al igual que los métodos que detectan los genes de las toxinas de *C. difficile*- puede detectar pacientes colonizados (excretores toxigénicos) que no están cursando una infección

activa^{21,23}. El CT también es útil para efectuar estudios epidemiológicos y eventuales pruebas de sensibilidad¹³.

Los EIA TOX dirigidos a la detección de las toxinas A y B en MF son utilizados como alternativa al ECC. En un meta-análisis que incluyó 56 trabajos, Crobach et al., observaron una especificidad de 96-98% y una sensibilidad de 79-83% de los EIA TOX comparados con el ECC¹³. Cuando se utilizan inmunoensayos que detectan a las toxinas en forma independiente, los resultados A+B+ o A-B+ deben ser considerados clínicamente relevantes. Estos últimos, A-B+, pueden corresponder a toxintipos capaces de producir brotes como se demostró, incluso en nuestro país con el ribotipo 017 toxintipo VIII^{17,24-26}.

C. difficile produce GDH, una enzima muy conservada en la especie, tanto en las cepas toxigénicas como en las no toxigénicas. Esta enzima está codificada en el gen *gluD*, el cual se encuentra fuera del PaLoc. Carman et al. demostraron por métodos moleculares la alta tasa de conservación del gen que codifica para la GDH en los distintos ribotipos de *C. difficile*²⁷. Dos meta-análisis^{13,28} y otros autores, demostraron su utilidad como prueba de tamizaje por su elevada sensibilidad y VPN (94 a 100%) si bien carece de especificidad^{17,25,29,30}.

En un estudio multicéntrico prospectivo de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias (SADEBAC-AAM), se obtuvo una razón de verosimilitud (RV) negativa para GDH de 0,11, lo cual demuestra su capacidad para descartar la enfermedad, en tanto que los EIA TOX evaluados (EIA en policubeta (RIDASCREEN™ *Clostridium difficile* Toxin A/B (R-Biopharm AG, Germany) y EIA con flujo lateral (QUIK CHEK COMPLETE™ Techlab, Inc., USA) mostraron una RV positiva >10 que avala su utilidad para confirmar el resultado de la ICD, pero la sensibilidad menor al 60% no permite descartarla³¹. En la Tabla 2 se muestran los resultados de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN, Razón de verosimilitud positiva (PLR) y negativa (NLR) obtenidos en dicho estudio³¹.

Los EIA para el diagnóstico de la ICD están dirigidos a la detección de las toxinas A y B libres en la MF o las producidas por el microorganismo recuperado en cultivo¹⁷.

Los EIA dirigidos solo a la detección de las toxinas A y B son pruebas rápidas, sencillas y económicas, pero su baja sensibilidad (~ 44 a 82%) las descartan como técnicas únicas de diagnóstico de ICD^{3,11}.

Existen diferentes presentaciones comerciales de inmunoensayos que detectan toxinas, GDH o la combinación de ambas. Se han desarrollado métodos de EIA en placas con policubetas con marca cromogénica o con fluorescencia (ELFA) o en membrana por inmunocromatografía. Los primeros se llevan a cabo en algunas horas en cambio los segundos sólo en unos pocos minutos^{13,17}.

La sensibilidad para la detección de las toxinas A/B depende, entre otros factores, del equipo comercial utilizado y el método de referencia empleado para hacer la comparación. Varía ampliamente, entre 44 y 99% frente al ECC que mide el mismo blanco, mientras que frente al cultivo toxigénico (CT) presenta valores comprendidos entre el 29 y el 86% (Tabla 3). Por otro lado, la especificidad de los EIA, independientemente del método patrón con el que se compare es elevada (> 90%)^{13,50}.

El desempeño del EIA TOX es uno de los más afectados por la prevalencia de la ICD en la población que se evalúa. Los VPP en situación de baja prevalencia (< 10%) de ICD oscilan

entre el 69 al 81% mientras que en centros de alta prevalencia (~ 20%) pueden llegar al 98%^{13,40}.

Para disminuir los tiempos de informe se desarrollaron los métodos de EIA que detectan simultáneamente GDH y toxinas. La GDH de estos ensayos parece tener una sensibilidad similar a la de los ensayos GDH independientes y constituyen una prueba con relación costo-beneficio favorable. A su vez, la detección de las toxinas tiene los mismos problemas en cuanto a la sensibilidad que los EIA TOX convencionales^{39,52,53}.

Los métodos de AAN detectan genes que codifican la síntesis de las toxinas de *C. difficile*³²⁻³⁵(Tabla 1). La guía europea¹³, la norteamericana² y numerosos trabajos concuerdan que la sensibilidad (93-98%), especificidad (93- 95%) y VPN (96-100%) de estos métodos son elevados^{21,32,36,37}. No hay consenso en la bibliografía con respecto al uso de los métodos de AAN como única prueba o como parte de un algoritmo diagnóstico^{2,13,21,38-41}. Si bien no hay estudios aleatorizados que demuestren los beneficios de una estrategia de diagnóstico sobre la otra, hay evidencia de que la utilización de la AAN como única prueba puede conducir al sobrediagnóstico de ICD porque puede detectar a los excretores sin enfermedad⁴²⁻⁴⁵. Polage et al. en un estudio prospectivo de más de 1000 pacientes, demostraron que aquellos con muestras EIA TOX-/PCR+ tuvieron síntomas más leves, menos complicaciones y menor mortalidad que aquellos que resultaron EIA TOX +/PCR+ ($p < 0,001$)²³. Longtin et al. en un estudio de cohorte prospectivo arribaron a conclusiones similares; los pacientes positivos para toxinas, padecían más complicaciones que aquellos que solamente presentaban las pruebas de AAN positivas (39% vs 3%, $p < 0,001$)⁴⁶. Si tenemos en cuenta poblaciones con baja prevalencia, el VPP de la AAN puede ser menor al 60%¹³.

Los métodos de AAN se basan en la búsqueda directa en la materia fecal de los genes que codifican la síntesis de las toxinas de *C. difficile*. Los métodos comerciales disponibles son principalmente ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (*real-time* PCR). También se han desarrollado métodos de amplificación isotérmica, *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) e *Isothermal helicase-dependent amplification*, menos difundidos⁴⁴. La mayoría de los ensayos detectan regiones conservadas dentro de los genes para la toxina B (*tcdB*), o una secuencia altamente conservada del gen de la toxina A (*tcdA*) que está presente en todas las cepas toxigénicas. Algunas pruebas de AAN también detectan ambos genes de la toxina binaria (*cdtA* y *cdtB*) y la delección en el nucleótido 117 del gen de la toxina C (*tcdC*) lo que permite detectar las cepas hipervirulentas del ribotipo 027. Actualmente también existen ensayos comerciales que detectan los genes de las toxinas de *C. difficile* junto con múltiples blancos de otros patógenos³²⁻³⁵(Tabla 1). Los métodos de *real-time* PCR son recomendados con respecto a los convencionales por su mayor sensibilidad y especificidad^{12,31}. Las técnicas *in house* tienen como principal dificultad la presencia de inhibidores en las muestras de MF. La sensibilidad varía según el método de extracción de ADN entre 63 a 100%³⁴. Además, requieren validación que cumpla con los estándares de acreditación del laboratorio clínico, para ser utilizados con fines diagnósticos. Los métodos comerciales en cambio fueron creados para resolver estas deficiencias⁵⁴.

¿Cuál es el algoritmo recomendado para el diagnóstico de laboratorio de ICD?

Recomendaciones

- Utilizar un algoritmo, en lugar de una única prueba, para mejorar la precisión diagnóstica (BII) (Fig. 1)
 - Los algoritmos que comienzan con EIA GDH o AAN tienen elevados VPN, por lo cual un resultado negativo, descarta la enfermedad. (AI)
 - Utilizar un algoritmo que inicie con GDH seguido o en simultáneo, con la detección de las toxinas A/B. Las muestras con resultados concordantes no requieren otra prueba, un resultado positivo o negativo confirma o descarta respectivamente, la ICD. (BII)
 - Las muestras con resultados discordantes (GDH+/TOX-), se deben resolver con una segunda/tercera prueba de mayor sensibilidad como CT o AAN. (BII)
- En caso de sospecha de ICD en pacientes con fleo paralítico, la muestra de hisopado rectal se puede procesar con métodos de alta sensibilidad, como CT, AAN o GDH. (BII)

Revisión de la evidencia Planche et al, en un trabajo multicéntrico que incluyó 12.420 muestras, demostraron que la utilización de algoritmos de dos o tres pasos que incluyan la detección de toxinas, permiten mejorar los VPP de las pruebas diagnósticas individuales. El algoritmo GDH/EIA TOX mejoró el VPP de EIA TOX solo, comparado con el ECC (VPP 91,6% y 81,2%, respectivamente); sin embargo, la sensibilidad fue semejante (~82%)(21). En concordancia, la guía europea¹³ y otros autores proponen también, la utilización de algoritmos para el diagnóstico de ICD^{20,29,41,47,48,31,45}.

El desempeño del algoritmo propuesto, dependerá de la sensibilidad del EIA TOX utilizado^{13,21,23}. En nuestro medio, los métodos disponibles muestran una sensibilidad menor al 60%^{25,41} por lo tanto, los casos con resultados GDH+/TOX- deberán ser complementados con un tercer ensayo (CT o AAN) para alcanzar una sensibilidad aceptable (~ 80%), especialmente en centros con baja prevalencia (<10%)⁴⁹.

Una alternativa de algoritmo es utilizar GDH/*real-time* PCR. Esta combinación disminuye los costos de realizar *real-time* PCR como única determinación y mejora ligeramente el VPP (~85%- 88,6% vs ~82,5% - 84% respectivamente) a expensas de disminuir la sensibilidad de la PCR, por lo que su utilidad es discutida^{2,21,39,41}.

Debido a que el uso de los algoritmos puede aumentar los costos y requiere laboratorios de mayor complejidad, es importante la interacción con el equipo médico para establecer claramente cuál es el criterio para la selección de los pacientes para el diagnóstico de ICD^{7,38}. Sin embargo, en la práctica, esto no siempre es factible²

A la hora de seleccionar el algoritmo a seguir, la prevalencia de la ICD también es importante. Hay que tener en cuenta que en centros con alta prevalencia o situación de brote (prevalencia > 20%) la precisión de la mayoría de los métodos individuales aumenta^{13,29}.

Actualización bibliográfica posterior a la publicación del Consenso referida a diagnóstico

Recientemente se publicaron dos estudios importantes que sustentan las recomendaciones dadas en este consenso: un meta análisis sobre precisión diagnóstica y un análisis *Post Hoc* sobre un ensayo clínico con bezlotoxumab.

Kraft CS, Parrott JS, Cornish NE, et al. A laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis of nucleic acid amplification tests (NAATs) and algorithms including NAATs for the diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in adults [published online May 29, 2019]. Clin Microbiol Rev. doi:10.1128/CMR.00032-18

Se trata de una revisión sistemática y meta-análisis que evaluó la precisión diagnóstica de las pruebas de AAN y los algoritmos que incluyen AAN para el diagnóstico de ICD en adultos (Kraft CS et al, 2019), como así también, la utilidad de repetir la prueba con una nueva muestra cuando la primera fue negativa. Los resultados del meta-análisis respaldaron que las pruebas de AAN sola, el algoritmo de GDH/AAN y el algoritmo que incluye detección de las toxinas (GDH/EIATOX/AAN) son todas prácticas adecuadas desde el punto de vista del rendimiento diagnóstico. Sin embargo, esta revisión sistemática no pudo responder a la pregunta sobre qué prueba correlaciona mejor con el diagnóstico de ICD, debido al hecho de que la gran mayoría de los estudios no incluyen resultados clínicos. Por otro lado, debido a la evidencia insuficiente, no hay recomendaciones a favor o en contra de repetir la prueba de AAN, dentro de los 7 días, cuando el resultado es negativo. Además, dado el bajo impacto que tiene la repetición sugieren no innovar en cuanto a este tema. Estas recomendaciones se alinearon con las recomendaciones de la Infectious Diseases Society of America (IDSA).

Wilcox MH, Rahav G, Dubberke ER, et al. Influence of diagnostic method on outcomes in phase 3 clinical trials of bezlotoxumab for the prevention of recurrent *Clostridioides difficile* infection: a post hoc analysis of MODIFY I/II. Open Forum Infect Dis. 2019;6: ofz293.

La detección de toxinas de *C. difficile* en materia fecal puede conducir a un diagnóstico preciso de la infección por *C. difficile* (ICD), según los resultados del estudio publicado en Open Forum Infectious Diseases.

El objetivo de este análisis *post hoc* fue examinar el efecto de diferentes métodos de diagnóstico para ICD de acuerdo a los resultados de eficacia en los ensayos de fase 3 MODIFY I / II, en los que los participantes recibieron bezlotoxumab para tratar ICD primaria y recurrente.

En este análisis los investigadores evaluaron la curación inicial y la ICD recurrente en los participantes diagnosticados al inicio del estudio utilizando EIA/ ECC o métodos indirectos que incluyen PCR/CT. La población incluida en el estudio consistió en 1554 pacientes que recibieron bezlotoxumab ($n = 781$) y placebo ($n = 773$).

Los resultados revelaron que las tasas iniciales de curación clínica fueron ligeramente más altas en los pacientes diagnosticados con EIA/ECC (81,7%) vs el subgrupo diagnosticado con PCR o CT (78,4%). En comparación con el placebo, el bezlotoxumab redujo significativamente la tasa de ICD recurrente independientemente del método de diagnóstico utilizado. Sin embargo, la magnitud de la reducción fue sustancialmente mayor en los participantes diagnosticados por detección de toxinas (EIA/ECC) (diferencia relativa -46,6%) vs PCR/CT (-29%)

Los investigadores concluyeron que el uso de pruebas basadas en la detección de toxina libre de *C. difficile* en MF son fundamentales para conducir al diagnóstico preciso de ICD lo que conlleva a que la eficacia terapéutica no se subestime.

Tabla 1 - Características de los métodos de laboratorio para el diagnóstico de la infección por *Clostridioides difficile*

Método	Blanco	Ventajas	Limitaciones
Cultivo toxigénico	Células vegetativas o esporas de <i>C. difficile</i>	Método patrón Herramienta epidemiológica Alta sensibilidad	Requiere la detección de toxinas o sus genes sobre el aislado Moderada especificidad Tiempos de respuesta prolongados Infraestructura y personal entrenado No estandarizado
Ensayo de citotoxicidad sobre cultivos celulares	Toxina B	Método patrón Detecta toxina libre Alta especificidad	Tiempos de respuesta prolongados Infraestructura y personal entrenado Falsos negativos por toxina degradada en la MF No estandarizado
EIA GDH	GDH	Método de tamizaje Simple y rápido Alta sensibilidad	Requiere confirmación con un método que detecte toxinas o sus genes codificantes. Baja especificidad Baja sensibilidad
EIA TOX AB	Toxinas A/B	Detecta toxina libre Alta especificidad	Baja sensibilidad
EIA GDH / EIA TOX AB	Ensayo combinado GDH/ Toxinas A/B	Detección simultánea de dos blancos Simple y rápido	Permite el diagnóstico en un paso, pero no mejora la sensibilidad del EIA TOX A/B solo
AAN(<i>real-time</i> PCR)	<i>tcdB</i> , <i>tcdC/ tcdA/ tcdC</i> delección nt 117 ^a	Alta sensibilidad	Especificidad baja/moderada Costosos

MF: materia fecal, EIA: enzimoimmunoanálisis, GDH: glutamato deshidrogenasa, AAN: amplificación de ácidos nucleicos, ^a:mutación en el nucleótido 117 del *tcdC* presente en la cepa hipervirulenta ribotipo 027.

Tabla 2. Comparación de las pruebas de diagnóstico para *C. difficile* frente a los resultados de la combinación de ECC/ CT-ECC

Method	Sensitivity (%) (95% CI) ^a	Specificity (%) (95% CI) ^a	PPV (%) ^b (95% CI) ^a	NPV (%) ^b (95% CI) ^a	PLR ^c (95% CI) ^a	NLR ^c (95% CI) ^a
GDH^d	91.59 (85.86-97.32)	76.92 (69.67-84.18)	74.81 (66.99-82.62)	92.44 (87.27-97.61)	3.97 (2.93-5.38)	0.11 (0.06-0.21)
RAB^e	52.94 (42.76-63.12)	96.62 (93.37-99.87)	91.53 (83.57-99.48)	74.87 (68.46-81.28)	15.67 (6.49-37.81)	0.49 (0.40-0.60)
RAB/RAB-TC^e	74.53 (65.76-83.29)	95.07 (91.16-98.98)	91.86 (85.50-98.22)	83.33 (77.29-89.38)	15.12 (7.28-31.40)	0.27 (0.19-0.37)
QAB^f	58.88 (49.09-68.67)	94.41 (90.29-98.52)	88.73 (80.67-96.79)	75.42 (68.83-82.01)	10.52 (5.27-21.02)	0.44 (0.35-0.55)
QAB/QAB-TC^f	78.30 (69.98-86.62)	94.41 (90.29-98.52)	91.21 (84.84-97.18)	85.44 (79.63-91.26)	14.00 (7.09-27.65)	0.23 (0.16-0.33)
PCR^g	77.14 (68.63-85.65)	82.52 (75.94-89.09)	76.42 (67.86-84.97)	83.10 (76.58-89.61)	4.41 (3.04-6.39)	0.28 (0.19-0.40)
PCR/PCR-TC^g	87.62 (80.84-94.40)	83.92 (77.55-90.29)	80.00 (72.25-87.75)	90.23 (84.80-95.65)	5.45 (3.72-7.98)	0.15 (0.09-0.25)

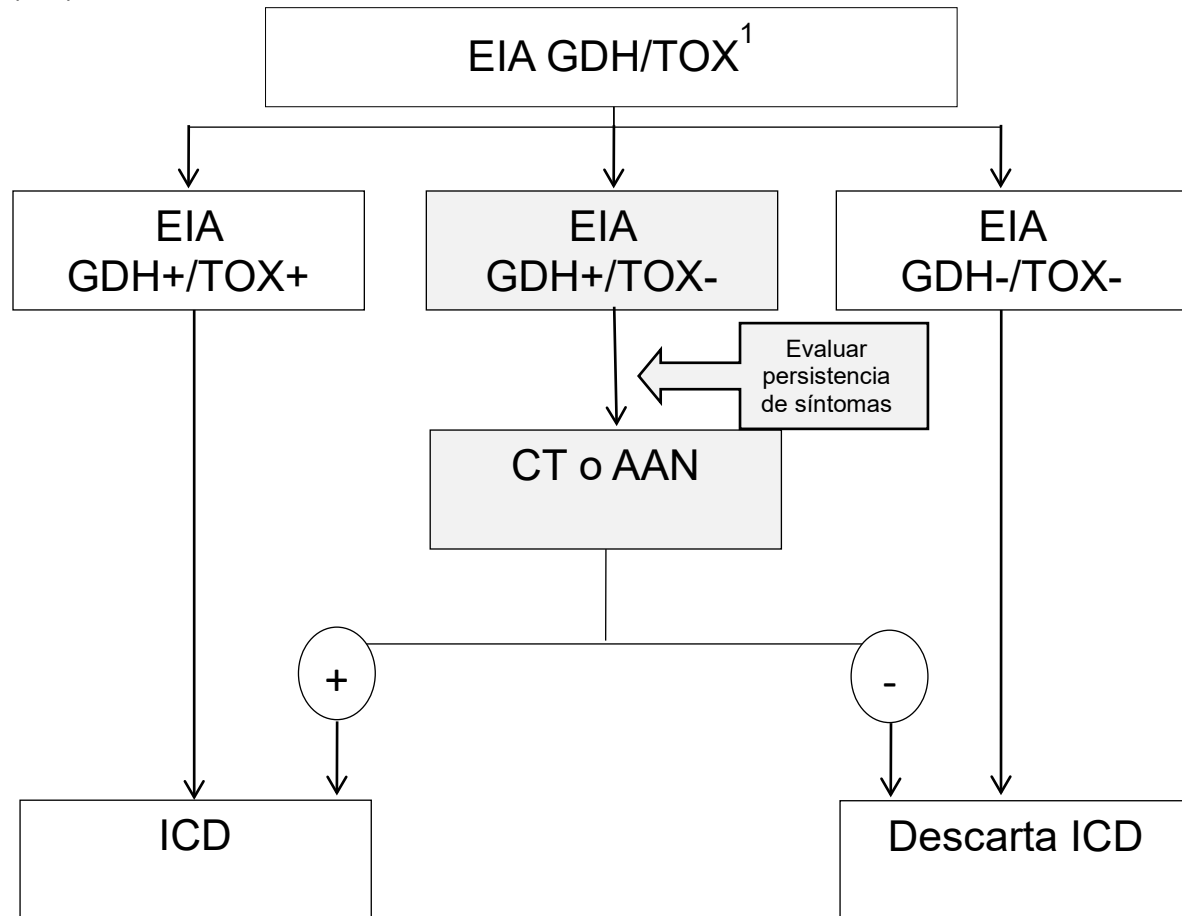
^a95% CI: 95% intervalos de confianza. ^bVPP/VPN: valor predictivo positivo y negativo. ^cLRP/LRN: razón de probabilidad positiva/negativa. ^dGDH: Quik Chek glutamate dehydrogenase en muestras de materia fecal. ^eRAB/RAB-TC: Ridascreen toxin A+B en materia fecal/ en materia fecal mas CT. ^fQAB/QAB-TC: Quik Chek toxin A+B, en muestras de materia fecal/ en materia fecal mas cultivo toxigénico ^gPCR/PCR-TC: *tcdB* in en muestras de materia fecal/ en materia fecal mas cultivo toxigénico (31).

Tabla 3. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de ICD. Variación de los valores de sensibilidad y especificidad frente a los métodos de referencia

Prueba	Blanco	Sensibilidad ^a (%) comparada con		Especificidad ^a (%) comparada con	
		ECC ^b (IC 95%)	CT ^c (IC 95%)	ECC (IC 95%)	CT (IC 95%)
EIA ^d -GDH ^e policubeta	Antígeno común	94 (91-97)	94 (93-96)	92 (92-93)	94 (94-95)
EIA-GDH membrana		98 (78-100)	97 (84-100)	90 (87-93)	96 (90-99)
EIA-Tox A/B policubeta	Toxinas A/B	85 (76-88)	60 (52-68)	98 (96-99)	98 (97-99)
EIA-Tox A/B membrana		79 (66-88)	53 (45-61)	99 (98-99)	99 (97-100)
Métodos moleculares	Genes de las toxinas	96 (93-98)	95 (92-97)	94 (93-95)	98 (97-99)

^a Valores correspondientes a la European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection, Crobach M.J.T., et al 2016 (13), ^b ensayo de citotoxicidad celular, ^c cultivo toxigénico, ^denzimoinmunoensayo, ^e glutamato deshidrogenasa.

Figura 1- Algoritmo para el diagnóstico de laboratorio de la infección por *Clostridioides difficile* (ICD)



¹Se puede iniciar con una prueba que detecte GDH y toxinas en forma simultánea (como se muestra en la figura) o en dos pasos sucesivos en los que se detecta GDH como primera prueba y un EIA TOX como segunda prueba para las muestras GDH +. EIA GDH/TOX: enzimoimmunoanálisis de GDH y de toxinas A/B; CT: cultivo toxigénico; AAN: pruebas de amplificación de ácidos nucleicos.

Bibliografía

1. Longtin Y, Frenette C, Rocher I. Institut National de Santé Publique du Québec. Surveillance des diarrhées associées au *Clostridium difficile* dans les centres hospitaliers du Québec: protocole: version 3. Protocol [Internet]. 2013; FÉVRIER 20. Available from: https://www.inspq.qc.ca/sites/default/files/documents/infectionsnosocomiales/protocoledacd_v3.pdf
2. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE, Dubberke ER, Garey KW, Gould CV, Kelly C, Loo V, Sammons JS, Sandora TJ and Wilcox MH. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2017 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). Clin Infect Dis [Internet]. 2018;XX:1–48.
3. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, et al. 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 [Internet]. 2010 May 2 [cited 2019 Jan 19];31:431–55.
4. Schutze GE, Willoughby RE. Committee on Infectious Diseases, American Academy of Pediatrics. *Clostridium difficile* infection in infants and children. Pediatrics [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2018 Mar 1];131:196–200.
5. Lees EA, Miyajima F, Pirmohamed M, Carrol ED. The role of *Clostridium difficile* in the pediatric and neonatal gut — a narrative review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2016 Jul 23 [cited 2018 Feb 20];35:1047–57.
6. Trubiano JA, Cheng AC, Korman TM, Roder C, Campbell A, May MLA, et al. Australasian Society of Infectious Diseases updated guidelines for the management of *Clostridium difficile* infection in adults and children in Australia and New Zealand. Intern Med J [Internet]. 2016 Apr [cited 2018 Feb 20];46:479–93.
7. Dubberke ER, Han Z, Bobo L, Hink T, Lawrence B, Copper S, et al. Impact of clinical symptoms on interpretation of diagnostic assays for *Clostridium difficile* infections. J Clin Microbiol [Internet]. 2011 Aug [cited 2018 Feb 28];49:2887–93.
8. Longtin Y, Paquet-Bolduc B, Gilca R, Garenc C, Fortin E, Longtin J, et al. Effect of detecting and isolating *Clostridium difficile* carriers at hospital admission on the incidence of *C. difficile* infections: a quasi-experimental controlled study. JAMA Intern Med [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2018 Feb 23];176:796–804.
9. Rollet R, Legaria MC, Carloni G. Parte III MICROORGANISMOS ANAEROBIOS. En: Lopardo H, Predari SC, Vay C, editores. Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. Vol I Bacterias de importancia clínica. Buenos Aires. Argentina. 2016 [cited 2018 Feb 26]; Available from: [http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte III.pdf](http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte%20III.pdf).
10. Luo RF, Banaei N. Is repeat PCR needed for diagnosis of *Clostridium difficile* infection? J Clin Microbiol [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2018 Feb 21];48:3738–41.
11. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines

- for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. Am J Gastroenterol [Internet]. 2013;108:478–98.
12. Peterson LR, Robicsek A. Does my patient have *Clostridium difficile* infection? Ann Intern Med [Internet]. 2009 Aug 4 [cited 2018 Feb 21];151:176–9.
 13. Crobach MJT, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2016;22:S63–81.
 14. Aichinger E, Schleck CD, Harmsen WS, Nyre LM, Patel R. Nonutility of repeat laboratory testing for detection of *Clostridium difficile* by use of PCR or enzyme immunoassay. J Clin Microbiol [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2018 Feb 23];46:3795–7.
 15. Cardona DM, Rand KH. Evaluation of repeat *Clostridium difficile* enzyme immunoassay testing. J Clin Microbiol [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2018 Feb 23];46:3686–9.
 16. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Goudarzi H, Mehdizadeh Aghdam E, Nazeri S. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, pathogenesis, risk factors, and therapeutic options. Scientifica (Cairo) [Internet]. 2014 [cited 2018 Feb 20];2014:1–9.
 17. Burnham C-AD, Carroll KC. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an Ongoing Conundrum for Clinicians and for Clinical Laboratories. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2018 Feb 26];26:604–30.
 18. Abujamel T, Cadnum JL, Jury LA, Sunkesula VCK, Kundrapu S, Jump RL, et al. Defining the vulnerable period for re-establishment of *Clostridium difficile* colonization after treatment of *C. difficile* infection with oral vancomycin or metronidazole. Paredes-Sabja D, editor. PLoS One [Internet]. 2013 Oct 2 [cited 2018 Feb 23];8:e76269. A
 19. Gerding DN, Meyer T, Lee C, Cohen SH, Murthy UK, Poirier A, et al. Administration of spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent *C difficile* infection. JAMA [Internet]. 2015 May 5 [cited 2018 Feb 23];313:1719.
 20. Ticehurst JR, Aird DZ, Dam LM, Borek AP, Hargrove JT, Carroll KC. Effective detection of toxigenic *Clostridium difficile* by a two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin. J Clin Microbiol [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2018 Feb 26];44:1145–9.
 21. Planche TD, Davies KA, Coen PG, Finney JM, Monahan IM, Morris KA, et al. Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of *C. difficile* infection. Lancet Infect Dis. 2013;13:936–45.
 22. Polage CR, Chin DL, Leslie JL, Tang J, Cohen SH, Solnick J V. Outcomes in patients tested for *Clostridium difficile* toxins. Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. 2012 Dec [cited 2018 Feb 28];74:369–73.
 23. Polage CR, Gyorke CE, Kennedy MA, Leslie JL, Chin DL, Wang S, et al. Overdiagnosis of *Clostridium difficile* infection in the molecular test era. JAMA Intern Med [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2018 Feb 23];175:1792. doi=10.1001/jamainternmed.2015.4114
 24. Goorhuis A, Legaria MC, van den Berg RJ, Harmanus C, Klaassen CHW, Brazier JS, et al. Application of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis to determine clonal spread of toxin A-negative *Clostridium difficile* in a general hospital in Buenos Aires, Argentina.

- Clin Microbiol Infect [Internet]. 2009 Dec [cited 2019 Mar 4];15:1080–6.
25. Legaria M, Lumelsky G, Rosetti S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. Anaerobe [Internet]. 2003 Jun [cited 2019 Mar 5];9:113–6.
 26. Legaria MC, Lumelsky G, Rosetti S, Greco G, Brazier JS, Gal M. Prevalence of toxin A-negative/B-positive *Clostridium difficile* in patients with gastrointestinal disease from a general hospital in Argentina. The 7th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas, Resumen PI-18. Anaerobe 2005;11:28. doi:10.1016/j.anaerobe.2004.10.001
 27. Carman RJ, Wickham KN, Chen L, Lawrence AM, Boone JH, Wilkins TD, et al. Glutamate dehydrogenase is highly conserved among *Clostridium difficile* ribotypes. J Clin Microbiol [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2018 Feb 26];50:1425–6.
 28. Shetty N, Wren MWD, Coen PG. The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: a meta-analysis. J Hosp Infect [Internet]. 2011;77:1–6.
 29. Vaustat D, Rollet R. Glutamato deshidrogenasa. Su valor diagnóstico en la diarrea por *Clostridioides difficile*. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2017 Nov [cited 2018 Feb 26];
 30. Cheng J-W, Xiao M, Kudinha T, Xu Z-P, Sun L-Y, Hou X, et al. The role of glutamate dehydrogenase (GDH) testing assay in the diagnosis of *Clostridium difficile* infections: a high sensitive screening test and an essential step in the proposed Laboratory Diagnosis Workflow for Developing Countries like China. Appanna VD, editor. PLoS One [Internet]. 2015 Dec 11 [cited 2018 Feb 27];10:e0144604.
 31. Legaria MC, Rollet R, Di Martino A, Castello L, Barberis C, Rossetti MA, et al. Detection of toxigenic *Clostridioides [Clostridium] difficile* : usefulness of two commercially available enzyme immunoassays and a PCR assay on stool samples and stool isolates. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2017 Oct 5 [cited 2018 Feb 28]
 32. Deshpande A, Pasupuleti V, Rolston DDK, Jain A, Deshpande N, Pant C, et al. Diagnostic accuracy of real-time polymerase chain reaction in detection of *Clostridium difficile* in the stool samples of patients with suspected *Clostridium difficile* infection: a meta-analysis. Clin Infect Dis [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2018 Feb 23];53:e81–90.
 33. Luna RA, Boyanton BL, Mehta S, Courtney EM, Webb CR, Revell PA, et al. Rapid stool-based diagnosis of *Clostridium difficile* infection by real-time PCR in a children’s hospital. J Clin Microbiol [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2018 Feb 23];49:851–7.
 34. Le Guern R, Herwegh S, Courcol R, Wallet F. Molecular methods in the diagnosis of *Clostridium difficile* infections: an update. Expert Rev Mol Diagn [Internet]. 2013 Sep 9 [cited 2018 Feb 23];13:681–92.
 35. Dalpke AH, Hofko M, Zorn M, Zimmermann S. Evaluation of the fully automated BD MAX Cdiff and Xpert *C. difficile* assays for direct detection of *Clostridium difficile* in stool specimens. J Clin Microbiol [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2018 Feb 23];51:1906–8.
 36. O’Horo JC, Jones A, Sternke M, Harper C, Safdar N. Molecular techniques for diagnosis of *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis. Mayo Clin Proc [Internet]. 2012 Jul [cited 2018 Feb 23];87:643–51.
 37. Kaltsas A, Simon M, Unruh LH, Son C, Wroblewski D, Musser KA, et al. Clinical and laboratory

- characteristics of *Clostridium difficile* infection in patients with discordant diagnostic test results. J Clin Microbiol [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2018 Feb 23];50:1303–7.
38. Humphries RM, Uslan DZ, Rubin Z. Performance of *Clostridium difficile* toxin enzyme immunoassay and nucleic acid amplification tests stratified by patient disease severity. J Clin Microbiol [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2018 Feb 23];51:869–73.
 39. Novak-Weekley SM, Marlowe EM, Miller JM, Cumpio J, Nomura JH, Vance PH, et al. *Clostridium difficile* testing in the clinical laboratory by use of multiple testing algorithms. J Clin Microbiol [Internet]. 2010 [cited 2018 Feb 27];48:889–93.
 40. Rao K, Micic D, Natarajan M, Winters S, Kiel MJ, Walk ST, et al. *Clostridium difficile* ribotype O27: relationship to age, detectability of toxins A or B in stool with rapid testing, severe infection, and mortality. Clin Infect Dis [Internet]. 2015 Jul 15 [cited 2018 Feb 28];61:233–41.
 41. Moon H-W, Kim HN, Hur M, Shim HS, Kim H, Yun Y-M. Comparison of diagnostic algorithms for detecting toxigenic *Clostridium difficile* in routine practice at a tertiary referral hospital in Korea. Chang Y-F, editor. PLoS One [Internet]. 2016 Aug 17 [cited 2018 Feb 28];11:e0161139.
 42. Dubberke ER, Burnham C-AD. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: treat the patient, not the test. JAMA Intern Med [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2019 Jan 19];175(11):1801–2.
 43. Beaulieu C, Dionne L-L, Julien A-S, Longtin Y. Clinical characteristics and outcome of patients with *Clostridium difficile* infection diagnosed by PCR versus a three-step algorithm. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2018 Feb 23];20:1067–73.
 44. Koo HL, Ajami NJ, Jiang Z, DuPont HL, Atmar RL, Lewis D, et al. A nosocomial outbreak of Norovirus infection masquerading as *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2018 Feb 23];48:e75–7.
 45. Origüen J, Corbella L, Orellana MÁ, Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, San Juan R, et al. Comparison of the clinical course of *Clostridium difficile* infection in glutamate dehydrogenase-positive toxin-negative patients diagnosed by PCR to those with a positive toxin test. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2018 Apr [cited 2019 Jan 26];24:414–21.
 46. Longtin Y, Trottier S, Brochu G, Paquet-Bolduc B, Garenc C, Loungnarath V, et al. Impact of the type of diagnostic assay on *Clostridium difficile* infection and complication rates in a mandatory reporting program. Clin Infect Dis. 2013;56:67–73.
 47. Rollet R, Rossetti A, Carloni G. Actualización sobre *Clostridium difficile*. SueEpidemiología y diagnóstico. Segunda parte. Boletín de la Asociación Argentina de Microbiología. 2015;9–11.
 48. Fernández Canigia L. Diagnóstico de infección por *Clostridium difficile*. En: Boletín de Epidemiología Hospitalaria y Control de Infecciones del Hospital Alemán. Ed. Durlach RA, Freuler CB, Ediciones Guadalupe, CABA, Argentina. 2013; 15–8.
 49. Ota K V, McGowan KL. *Clostridium difficile* testing algorithms using glutamate dehydrogenase antigen and *C. difficile* toxin enzyme immunoassays with *C. difficile* nucleic acid amplification testing increase diagnostic yield in a tertiary pediatric population. J Clin Microbiol. 2012 Apr 1 [cited 2018 Feb 28];50:1185–8.
 50. Eastwood K, Else P, Charlett A, Wilcox M. Comparison of nine commercially available *Clostridium difficile* toxin detection assays, a real-time PCR assay for *C. difficile tcdB*, and a glutamate

dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:3211–7.

51. Kuehne S, Cartman S, Heap J, et al. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature.* 2010;467:711–3.
52. Sharp SE, Ruden LO, Pohl JC, Hatcher PA, Jayne LM, Ivie WM. Evaluation of the C. Diff Quik Chek Complete Assay, a new glutamate dehydrogenase and A/B toxin combination lateral flow assay for use in rapid, simple diagnosis of *Clostridium difficile* disease. *J Clin Microbiol.* 2010;48: 2082–6.
53. Selvaraju SB, Gripka M, Estes K, Nguyen A, Jackson MA, Selvarangan R. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in pediatric stool samples: an evaluation of Quik Check Complete Antigen Assay, BD GeneOhm Cdiff PCR, and ProGastro Cd PCR assays. *Diagn Microbiol Infect Dis.*2011; 71:224–9.
54. Saunders N, Zambon M, Sharp I, Siddiqui R, Bermingham A, Ellis J, Vipond B, Sails A, Moran-Gilad J, Marsh P, Guiver M. HPA Microbiology Services Division. Guidance on the development and validation of diagnostic tests that depend on nucleic acid amplification and detection. *J Clin Virol.* 2013;56:344–54.