

ARTÍCULO ORIGINAL

Diagnóstico microbiológico de infecciones por *Clostridioides difficile*: estudio comparativo de diferentes métodos

Microbiological diagnosis of Clostridioides difficile infections: comparative study of different methods.

Azula, Natalia^{1*}; Ruggeri, Diego²; Wisner, Barbara¹; Relloso, Silvia¹; Romano, Vanesa¹; Videla, Cristina¹; Castelli, Edgardo²; Farace, María Isabel²; Smayevsky, Jorgelina¹.

¹Laboratorio de Microbiología, Departamento de Análisis Clínicos, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Norberto Quirno (CEMIC), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

²Servicio Bacteriología Sanitaria, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán". Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Azula, Natalia; Laboratorio de Microbiología, Departamento de Análisis Clínicos, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Norberto Quirno (CEMIC), Galván 4102 [C.P. 1431]; azulanatalia@gmail.com.

Resumen

Introducción: *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) es la principal causa de diarrea asociada a antibióticos. **Objetivos:** El objetivo del presente estudio fue comparar cuatro métodos para la detección de *C. difficile* toxigénico o de sus toxinas, directamente a partir de materia fecal de pacientes internados, con sospecha de infección por *C. difficile*, en el período enero – mayo de 2018. **Materiales y métodos:** Se procesaron 97 muestras de materia fecal diarreica utilizando las siguientes metodologías: 1) cultivo toxigénico; 2) inmunocromatografía (IC), [equipo C. Diff Quick Check Complete™]; 3) PCR en tiempo real (PCR-RT), [kit de TIB Molbiol] y 4) PCR convencional. **Resultados:** Se aisló *C. difficile* toxigénico en 14 de las 97 muestras. La concordancia entre la PCR-RT y la PCR convencional fue de 92,9 % y 100 %, respectivamente, comparada con el cultivo toxigénico. Seis muestras fueron positivas para GDH y Tx (Ag+Tx+) por IC, PCR convencional y cultivo toxigénico. En 15 muestras con GDH positiva y Tx negativa (Ag+Tx-), 7 resultaron positivas en ambas PCR, al igual que el cultivo toxigénico. En 8 muestras Ag+Tx- que presentaban ambas PCR negativas, se aisló *C. difficile* no toxigénico. Usando el cultivo toxigénico como método de referencia, la sensibilidad (S), la especificidad (E), el valor predictivo positivo (VPP) y el negativo (VPN) de los ensayos fueron del 42,9 %, 100 %, 100 %, y 91,2 %, respectivamente, para la detección de toxinas por IC; del 92,9 %, 100 %, 100 % y 98,8 % para la PCR-RT y del 100 %, 100 %, 100 % y 100 % para la PCR convencional. **Conclusión:** Con base en nuestros resultados, la metodología molecular posee S y E superiores a la IC, por lo que frente a resultados inconclusos (Ag+Tx-), recomendamos la realización de un método molecular para llegar al diagnóstico de certeza.

Palabras clave: *Clostridioides difficile*, PCR, inmunocromatografía, cultivo toxigénico, sensibilidad, especificidad.

Abstract

Introduction: *Clostridioides difficile* is the most commonly identified cause of antibiotic-associated diarrhea. **Objectives:** This study aimed to compare the performance of four diagnostic methods on a set of standardized stool samples from patients with suspected *C. difficile* infection during January-May 2018. **Materials and methods:** A total of 97 liquid fecal samples were processed with: 1) toxigenic culture; 2) an immunochromatographic assay using the C. DIFF QUICK CHECK COMPLET kit E for the detection of glutamate dehydrogenase (GDH) and toxins (Tx) A and B; 3) real-time PCR (RT-PCR) using the TIB MOLBIOL kit; and 4) conventional PCR. **Results:** Toxigenic culture allowed isolating *C. difficile* from 14 of the 97 samples. The RT-PCR and conventional PCR had a concordance of 92.9% and 100% with toxigenic culture, respectively. Six samples were positive for GDH and Tx (Ag+Tx+), conventional PCR and toxigenic culture. Seven out of 15 GDH-positive and Tx-negative (Ag+Tx-) samples were positive by both PCRs and toxigenic culture. Non-toxigenic *C. difficile* was isolated from 8 samples (Ag+Tx-) but were negative by PCR. By using toxigenic culture as the "gold standard", the sensitivity (S), specificity (E), and positive and negative predictive values of the assays were 42.9%, 100%, 100%, and 91.2%, respectively, for the immunochromatographic assay; 92.9%, 100%, 100%, and 98.8%, respectively, for the RT-PCR; and 100%, 100%, 100%, and 100%, respectively, for the conventional PCR. **Conclusions:** According to these results, the molecular methods have a S and E higher than the immunochromatographic assay. For inconclusive results (Ag+Tx-), we recommend performing a molecular method for the diagnosis of certainty.

Key words: *Clostridioides difficile*, PCR, immunochromatographic assay, toxigenic culture, sensitivity, specificity.

Introducción

Clostridioides difficile (*C. difficile*) es un bacilo gram - positivo, anaerobio estricto, con capacidad de formar esporas que permiten su supervivencia. La transmisión por vía fecal - oral convierte al personal de salud, instrumental médico y medio ambiente en importantes fuentes de infección intrahospitalaria. *C. difficile* puede ser agente causal de colitis pseudomembranosa y de complicaciones como la colitis fulminante, todas ellas englobadas por la denominación *infecciones por C. difficile* (ICD)¹⁻⁴.

Las cepas toxigénicas de *C. difficile* producen en el nivel colónico una toxina A o enterotoxina y otra B o citotoxina codificadas en los genes *tcdA* y *tcdB*. Ambas tienen efecto citotóxico y causan permeabilidad vascular y hemorragias; además, la enterotoxina induce la acumulación de líquidos y células inflamatorias a través de la activación de la respuesta inflamatoria, mientras que la citotoxina causa destrucción del citoesqueleto del enterocito y es más potente que la primera. Los genes antes mencionados se encuentran ubicados en una región del cromosoma llamada *locus de patogenicidad* (PaLoc), el cual contiene también 3 genes accesorios: *tcdR*, *tcdE*, *tcdC*. El gen *tcdR* ha demostrado tener la capacidad de modular positivamente la expresión de los genes de las toxinas, mientras que el *tcdC* modula negativamente dicha expresión⁴.

La glutamato deshidrogenasa (GDH) es una enzima de la pared del *C. difficile* muy estable, que se produce en grandes cantidades. La detección del antígeno GDH por inmunocromatografía (IC) es una técnica muy sensible, pero tiene el inconveniente de no poseer una buena especificidad por su capacidad de detectar tanto cepas toxigénicas como no toxigénicas de *C. difficile*. La combinación de la detección de las toxinas y GDH mediante IC da lugar a resultados muy específicos, pero la sensibilidad es baja para la detección de las primeras. Si bien estas técnicas poseen un elevado valor predictivo negativo (95-100%), la presencia de la GDH en las cepas no toxigénicas hace que el valor predictivo positivo de su detección sea relativamente bajo (50 - 60%). En estos casos, la decisión médica de aislar y tratar al paciente es más difícil. Por este motivo, los métodos inmunocromatográficos no son recomendables como únicos métodos diagnósticos de ICD⁵⁻⁸.

La alta sensibilidad y especificidad de las técnicas moleculares permiten un diagnóstico rápido y certero de la ICD, pero son costosas y requieren equipamiento específico. Estos inconvenientes han dado lugar al diseño de varios algoritmos diagnósticos que son costo - efectivos. La mayoría de los mismos utiliza como método de cribado la IC y la búsqueda de la enzima GDH debido a su alta sensibilidad diagnóstica y valor predictivo negativo. Según recomendaciones nacionales e internacionales, los resultados discordantes (GDH +/- Toxinas - o GDH -/Toxinas +) deben confirmarse por un método molecular validado^{5,6,8}.

En la mayoría de los centros hospitalarios de la Argentina, el diagnóstico de infección por *C. difficile* se realiza únicamente por IC, con las limitaciones que dicha metodología presenta. Además, son pocos los estudios que comparan distintas metodologías realizadas en Argentina e incluso, en Latinoamérica.

El objetivo del presente estudio fue comparar cuatro dis-

tintas metodologías para la detección de *C. difficile* toxigénico, directamente de la materia fecal: la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT) comercial, la PCR convencional, la inmunocromatografía y el cultivo anaerobio con posterior detección de las toxinas por IC y PCR. El cultivo toxigénico se consideró como método de referencia.

Materiales y Métodos

Se analizaron, en forma prospectiva, muestras consecutivas de materia fecal diarrea de pacientes internados con sospecha de ICD, en el período enero-mayo de 2018. Todas las muestras de materia fecal se procesaron por: inmunocromatografía, PCR en tiempo real, PCR convencional y cultivo toxigénico.

Inmunocromatografía: se utilizó el equipo comercial *C. Diff Quick Check Complete*TM (Techlab, Inc., EE. UU) para la detección de GDH y toxinas A y B. La prueba se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, directamente sobre muestras de materia fecal y luego, sobre los aislados de heces.

PCR en tiempo real: la PCR-RT, cuya detección se basa en la tecnología de sondas de hibridación, se realizó directamente sobre las muestras de materia fecal y sobre los aislados de *C. difficile*. La extracción de ADN se efectuó en el equipo automatizado MagNA Pure (Roche Diagnostics). Para la extracción de ADN directamente de la materia fecal, se suspendieron 1 - 2 asadas de 10 µl de materia fecal diarrea en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se vortexeó por 1 minuto seguido de una centrifugación a 6000 rpm durante 1 minuto. Se colocaron 410 µl del sobrenadante en el equipo MagNA Pure (Roche Diagnostics) para su extracción, adicionando 10 µl del control de extracción. Se usó el kit de extracción y purificación de ácidos nucleicos MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit. El protocolo de extracción utilizado fue el otal NA en plasma: 100 - 400; el volumen de elución fue de 100 µl. Luego, se realizó la PCR-RT con el kit de detección de LightMix[®] Kit *Clostridium difficile* EC (TIB Molbiol) en el equipo Light Cycler 2.0 (LC, Roche Diagnostics), que detecta la presencia del gen *tcdC*, presente en todas las cepas toxigénicas. Este, además, es capaz de detectar probables cepas hipervirulentas, con delección en el gen *tcdC*, analizando las curvas de *melting*⁹⁻¹¹. Los pasos de amplificación y detección del gen *tcdC* se realizaron según las instrucciones del fabricante.

Para la extracción de ADN de aislados se suspendieron 2-3 colonias en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se tomaron 410 µl de la suspensión y se adicionaron 10 µl del control de extracción. A continuación, se siguieron los mismos pasos que para el procedimiento directo a partir de materia fecal descripto arriba.

PCR convencional: es una PCR de punto final que se realizó directamente sobre las muestras de materia fecal almacenadas a -20°C y sobre los aislados de *C. difficile*. La extracción y purificación de ADN directamente de materia fecal se realizaron con el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Alemania), a partir de 220 mg de materia fecal, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la extracción de ADN de aislados, se suspendió 1 colonia en 50 µl de agua bidestilada estéril, se calentó a 95°C durante 10 minutos y se centrifugó a 15,000 RPM x g por 2 minutos, tomando el sobrenadante para la realización de la PCR.

Tabla I. Comparación de resultados por distintos métodos para la detección de *C. difficile* toxigénico directo de materia fecal.

97 muestras totales	IC Resultado (N)	Cultivo toxigénico Resultado (N)	PCR-RT Resultado (N)	PCR convencional Resultado (N)
6	Ag+Tx+ (6)	Positivo (6)	Positivo (5)	Positivo (6)
7	Ag+Tx- (7)	Positivo (7)	Positivo (7)	Positivo (7)
1	Ag-Tx- (1)	Positivo (1)	Positivo (1)	Positivo (1)
8	Ag+Tx- (8)	Negativo (8)	Negativo (8)	Negativo (8)
75	Ag-Tx- (75)	Negativo (75)	Negativo (75)	Negativo (75)

► Ag, antígeno glutamato deshidrogenasa; IC, inmunocromatografía; PCR-RT, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; Tx, toxinas.

La PCR se realizó utilizando los cebadores NK104 5'-GTGTAGCA-ATGAAAGTCCAAGTTACGC-3' y NK105 5'-CACTTAGCTCTTTGATTGCT-GCACCT-3', que amplifican un segmento del gen *tcdB*, como se describió previamente¹². El ciclado consistió en 5 minutos de desnaturalización a 94°C, seguidos de 40 ciclos de amplificación de 20 segundos a 94°C, 60 segundos a 62°C y 40 segundos a 74°C, cada uno. Al finalizar los ciclos de amplificación, los tubos se incubaron 5 minutos a 72°C. La PCR se consideró positiva frente a la presencia de un producto de amplificación de 270pb correspondiente a un fragmento del gen *tcdB*. La detección de este fragmento se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% con GelRed™ (Biotium).

Cultivo toxigénico: previo al cultivo toxigénico, se realizó shock etanólico (igual volumen de materia fecal y etanol absoluto) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, las muestras de materia fecal tratadas fueron sembradas en el medio selectivo CHROM agar™ *C. difficile* (Mediatec) e incubadas en condiciones anaeróbicas a 37°C por 24h. En dicho medio, las colonias compatibles con *C. difficile* se ven fluorescentes al exponerlas bajo lámpara de luz UV a 365 nm. La identificación de *C. difficile* se realizó por la metodología automatizada MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) y la detección de toxina, por IC y amba.

Resultados

En el cultivo, se aisló *C. difficile* toxigénico en 14,4% [14/97] de las muestras de materia fecal. La concordancia de la PCR-RT y PCR convencional fue del 92,9% [13/14] y del 100% [14/14] comparada con el cultivo toxigénico, respectivamente. En 2 de las 13 muestras positivas por PCR-RT, se detectó delección en el gen *tcdC*, por análisis de las curvas de *melting*. Seis muestras fueron positivas para GDH y Tx (Ag+Tx+) por PCR convencional

y cultivo toxigénico. De 15 muestras con GDH positiva y toxinas negativas (Ag+Tx-), 7 presentaron ambas PCR y cultivo toxigénico positivos. En 8 muestras con Ag+Tx- y PCR negativas, se aisló *C. difficile* no toxigénico. Todas las muestras negativas por cultivo también lo fueron por las PCR y por IC. Una muestra negativa para GDH y toxinas (Ag-Tx-) resultó positiva por ambas PCR y cultivo toxigénico, pero se la consideró un falso negativo de la IC [Tabla I].

Usando el cultivo toxigénico como método de referencia, la sensibilidad (S), especificidad (E), el valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) de los ensayos fueron del 42,9 %, 100 %, 100 % y 91,2 %, respectivamente, para la detección de toxinas por IC; del 92,9 %, 100 %, 100 % y 98,8 % para la PCR-RT y del 100 %, 100 %, 100 % y 100 % para la PCR convencional [Tabla II].

Discusión

Aunque las técnicas de detección de toxinas A y/o B mediante inmunoanálisis, tales como la inmunocromatografía o el enzimoimmunoanálisis, son técnicas rápidas, sencillas y de bajo costo, su baja sensibilidad (40 - 60%) las descartan como métodos únicos de diagnóstico de infección por *Clostridioides difficile*^{13,14}.

La detección del antígeno *glutamato deshidrogenasa* mediante IC es una técnica muy sensible, con valores cercanos al 90 %, en comparación con el cultivo toxigénico. Sin embargo, tiene el inconveniente de no tener una buena especificidad por su capacidad de detectar tanto cepas toxigénicas como no toxigénicas de *C. difficile*. En la actualidad, se comercializan inmunocromatografías que detectan simultáneamente GDH y toxinas A y/o B. La combinación de la detección de las toxinas y de la GDH mediante IC da lugar a resultados muy específicos, pero su sen-

Tabla II. Análisis de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de los distintos métodos.

Métodos	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
PCR-RT	92,9	100	100	98,8
PCR convencional	100	100	100	100
IC *	42,9	100	100	91,2

► IC, inmunocromatografía; PCR-RT, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; VPN, valor predictivo negativo; VPP, valor predictivo positivo; * relevamiento de los diferentes parámetros para la detección de toxinas por IC.

sibilidad queda limitada por la técnica menos sensible, es decir, por la detección de las toxinas. En el presente estudio, la sensibilidad de la IC para la detección de toxinas fue baja, del 42,9 %. Estos resultados concuerdan con lo previamente descrito.

Por otro lado, los elevados valores de VPP y VPN obtenidos, superiores al 90%, convierten a esta IC, que combina la detección de GDH y toxinas, en un excelente método de cribado¹⁵⁻¹⁷.

La alta sensibilidad y especificidad de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos de *C. difficile* las convierten en ideales para el diagnóstico rápido de la ICD, pero por su costo elevado y mayor complejidad no están al alcance de la mayoría de los laboratorios. Esta falta de métodos accesibles y eficaces, utilizables como métodos únicos para el diagnóstico rápido de la ICD ha dado lugar al diseño de varios algoritmos diagnósticos que aprovechan lo mejor de cada una de las técnicas que los integran.

La mayoría de los algoritmos diagnósticos utilizan como método de cribado la detección mediante IC de la enzima GDH debido a su alta sensibilidad diagnóstica. Sin embargo, como su especificidad no es buena, se utilizan técnicas confirmatorias para los resultados GDH positivos. De esta forma, los resultados GDH positivos son confirmados por la detección de las toxinas por IC y, en caso de discordancia (Ag+ / Tx-), se utilizan las técnicas moleculares. Los estudios que han evaluado los algoritmos que incluyen inmunocromatografías que detectan las toxinas son capaces de reducir en casi un 50 % el número de pruebas moleculares necesarias, con el consiguiente ahorro en el uso de estas técnicas diagnósticas¹⁵⁻¹⁸.

Algunos métodos de amplificación de ácidos nucleicos, dirigidos al diagnóstico tienen como diana el gen de la toxina B (*tcdB*) o incluso los genes de ambas toxinas. Los métodos basados únicamente en la detección del gen *tcdA* no están aconsejados debido a que pueden no detectar algunas cepas con deleciones en dicho gen. Otros equipos tienen como diana el gen supresor *tcdC*, presente en todas las cepas toxigénicas¹⁹. En el actual estudio se compararon dos PCR diferentes, una PCR en tiempo real y una PCR convencional, a su vez, dirigidas a distintos blancos moleculares. Ambas PCR presentaron resultados de S, E, VPP y VPN superiores al 90 %, por lo que son métodos muy útiles para confirmar y descartar ICD.

Sobre la base de nuestros resultados, podemos concluir que los métodos moleculares poseen una S y E superiores a la IC. A pesar de la baja sensibilidad, la IC sigue siendo muy útil como método de cribado en laboratorios debido al elevado VPN y la rapidez para obtener un resultado. Sin embargo, frente a resultados inconclusos (Ag+Tx-), recomendamos la realización de un método molecular para llegar al diagnóstico de certeza.

Referencias bibliográficas

- Gerding DN. *Clostridium difficile* 30 years on: What has, or has not, changed and why? Int J Antimicrob Agents. 2009; 33(Suppl 1):S2-8.
- Bouza E, Marín M, Peláez T, Alcalá L; Group for Clostridium difficile Infection of the Spanish Society for Chemotherapy. The situation and management of Clostridium difficile infection in Spain: an opinion document. Rev Esp Quimioter. 2013; 26(3):261-86.
- McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakkenet JS, Carroll KC, Coffin SE, et al. Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). Clin Infect Dis 2018; 66:e1-48.
- Zea J.W, Salazar C.L. Enfermedad asociada a Clostridium difficile: prevalencia y diagnóstico por laboratorio. Infectio. 2012; 16(4):211-22.
- Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile-infection (CDI). Clin Microbiol Infect. 2009; 15: 1053-66.
- Alcalá Hernández L, Marín Arriaza M, Mena Ribas A, Niubó Bosh J. Diagnóstico microbiológico de la infección por Clostridium difficile. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), 2015.
- Alcalá L, Reigadas E, Marín M, Martín A, Catalán P, Bouza E. Impact of clinical awareness and diagnostic tests on the underdiagnosis of Clostridium difficile infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34(8):1515-25.
- Alcalá Hernández L, Mena Ribas A, Niubó Bosh J, Marín Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de la infección por Clostridium difficile. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016; 34(9):595-602.
- Sloan LM, Duresko BJ, Gustafson DR, Rosenblatt JE. Comparison of real-time PCR for detection of the *tcdC* gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of Clostridium difficile infection. J Clin Microbiol. 2008; 46(6):1996-2001.
- Quesada-Gómez C, Rodríguez C, Gamboa-Coronado Mdel M, Rodríguez-Cavallini E, Du T, Mulvey MR, et al. Emergence of Clostridium difficile NAP1 in Latin America. J Clin Microbiol. 2010; 48(2):669-70.
- Cheng JW, Xiao M, Kudinha T, Xu ZP, Hou X, Sun LY, et al. The First Two Clostridium difficile Ribotype 027/ST1 Isolates Identified in Beijing, China-an Emerging Problem or a Neglected Threat? Sci Rep. 2016; 6:18834.
- Kato H, Kato N, Watanabe K, Iwai N, Nakamura H, Yamamoto T, et al. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile by PCR. J Clin Microbiol. 1998; 36(8):2178-82.
- Barcán L, Ducatenzeiler L, Bangher MC, Barcelona L, Cornistein W, Daciuk L, et al. Recomendaciones intersociedades para diagnóstico, tratamiento y prevención de las infecciones por Clostridioides difficile. Medicina [B Aires] 2020; 80: 1-32.
- 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. 2018; 50(1):36-44.
- Sandlund J, Mills R, Griego-Fullbright C, Wagner A, Estis J, Bartolome A, et al. Laboratory comparison between cell cytotoxicity neutralization assay and ultrasensitive single molecule counting technology for detection of Clostridioides difficile toxins A and B, PCR, enzyme immunoassays, and multistep algorithms. Diagn Microbiol Infect Dis. 2019; 95(1):20-24.
- Schmidt ML, Gilligan PH. Clostridium difficile testing algorithms: what is practical and feasible? Anaerobe. 2009; 15(6):270-3.
- Shin BM, Lee EJ, Moon JW, Lee SY. Evaluation of the VIDAS glutamate dehydrogenase assay for the detection of Clostridium difficile. Anaerobe. 2016 Aug; 40:68-72.
- Kachrimanidou M, Tegou Z, Chasampalioti M, Arvaniti K, Protonotariou E, Skoura L. A two-step approach improves the diagnosis of Clostridium difficile infection. J Microbiol Methods. 2017; 143:17-19.
- Kraft CS, Parrott JS, Cornish NE, Rubinstein ML, Weissfeld AS, McNult P, 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. Clin Microbiol Rev. 2019; 32(3):e00032-18.