

[短 報]

便培養コロニーを用いた *Clostridioides difficile* 特異抗原および毒素検出における *C. DIFF* QUIK CHEK コンプリートの多施設臨床性能評価

原 稔典¹⁾²⁾・鈴木広道³⁾・大柳忠智⁴⁾・小柳紀人⁵⁾・宇敷明人⁶⁾・川端直樹⁷⁾
後藤美紀⁸⁾・飛田征男⁹⁾・矢口勇治¹⁰⁾・玉井清子¹⁰⁾・野竹重幸¹¹⁾・上村桂一⁵⁾
檜山誠也¹⁾²⁾・南木 融⁸⁾・鈴木 諭¹²⁾・山崎 洋⁷⁾・木村秀樹⁹⁾・國島広之¹³⁾
大毛宏喜¹⁴⁾

- ¹⁾ 広島大学病院診療支援部臨床検査部門
²⁾ 広島大学病院検査部
³⁾ 筑波メディカルセンター病院臨床検査医学科・感染症内科
⁴⁾ 聖マリアンナ医科大学病院臨床検査部
⁵⁾ 中東遠総合医療センター診療技術部臨床検査室
⁶⁾ 利根中央病院検査室
⁷⁾ 市立敦賀病院医療技術部検査室
⁸⁾ 筑波大学附属病院検査部
⁹⁾ 福井大学医学部附属病院検査部
¹⁰⁾ 株式会社ミロクメディカルラボラトリー
¹¹⁾ 筑波メディカルセンター病院臨床検査科
¹²⁾ 利根中央病院総合診療科
¹³⁾ 聖マリアンナ医科大学感染症学
¹⁴⁾ 広島大学病院感染症科

(令和2年11月2日受付, 令和3年3月2日受理)

わが国において、*Clostridioides difficile* (*C. difficile*)分離培養コロニーからの毒素産生性の確認(Toxigenic culture 法; TC 法)について、体外診断用医薬品の適応を取得した試薬はなく、十分な評価が実施されていない。

2018年11月から2019年3月までに、8施設で*Clostridioides difficile* infection (CDI)検査を目的として採取された残余糞便検体から、*C. difficile*分離培養でコロニーの発育を認めた85検体を対象とした。培養コロニーからの*C. DIFF* QUIK CHEK コンプリート (QUIK CHEK)を用いた glutamate dehydrogenase (GDH) および毒素検出を行い、GDH に対して質量分析法、毒素検出に対してリアルタイム PCR 解析を基準検査法として臨床性能試験を実施した。質量分析計にて同定した*C. difficile*85株に対して、QUIK CHEK におけるGDH判定では全例で陽性を示した。また、同定した85株に対して、毒素検出では60株が陽性を示し、25株が陰性を示した。リアルタイム PCR 解析との一致率は全体一致率100%(85/85)、陽性一致率100%(60/60)、陰性一致率100%(25/25)であった。本研究ではQUIK CHEKを用いたTC法は、質量分析計やリアルタイムPCR解析と同等の検出性能を備えていた。

Key words: *Clostridioides difficile*, *Clostridioides difficile* infection, *C. DIFF* QUIK CHEK コンプリート, toxigenic culture, リアルタイム PCR 解析

序 文

Clostridioides difficile は嫌気性グラム陽性桿菌であり、toxin A (腸管毒素) や toxin B (細胞毒素) を産生する株とそれらを産生しない毒素非産生株が存在する。毒素産生株は、

抗菌薬関連下痢症や偽膜性腸炎、イレウス、腸管穿孔などの *C. difficile* infection (CDI) を引き起こすことが知られている¹⁾。

CDI 診断のための基準検査は、培養法を用いた *C. difficile* の同定および分離株に対する毒素の検出である。近年では、核酸増幅検査が日本でも体外診断用医薬品として認可取得および保険収載されたことにより、日常診療でも臨床に導入されるようになってきた。しかし、検査費用が高額であり専用の機器を必要とすることから、培養法は依然として重要な検査法である。近年、わが国の検査指針および診療指針においても核酸増幅検査と併記されている。

著者連絡先：(〒734-8551) 広島県広島市南区霞 1-2-3
広島大学病院診療支援部臨床検査部門
原 稔典
TEL: 082-257-5546
FAX: 082-257-5546
E-mail: t2128@hiroshima-u.ac.jp

C. difficile の検査において最も重要な点は、毒素産生性の確認である。しかしながら、わが国において培養コロニーからの毒素検出について、体外診断用医薬品の適応を取得した試薬はなく、また十分な評価が実施されていない。今回、我々は国内 8 施設（大学病院 4 施設、市中病院 4 施設）より糞便検体を収集し、培養検査で発育したコロニーからの GDH および毒素検出を *C. DIFF* QUIK CHEK コンプリート（QUIK CHEK, アボット ダイアグノスティクス メディカル）を用いて行った。また、基準検査法として *C. difficile* の同定を質量分析計 MALDI Biotyper system（MALDI Biotyper, ブルカー・ダルトニクス）で行い、リアルタイム PCR 解析にて毒素遺伝子 (*tcdA/tcdB*) および、強毒株遺伝子 (*cdt/tcdC*) の検索を実施した。

対象および材料

本研究は、広島大学病院 (HUD)、聖マリアンナ医科大学病院 (SMD)、筑波大学附属病院 (TUD)、福井大学医学部附属病院 (FUD)、中東遠総合医療センター (CTD)、市立敦賀病院 (TRD)、利根中央病院 (TCD)、筑波メディカルセンター病院 (TMD) において、2018 年 11 月より 2019 年 3 月までの期間に、各施設で CDI 検査を目的として採取された Bristol stool scale \geq 5 を満たす糞便検体²⁾を使用して、*C. difficile* の分離培養検査を行なった。*C. difficile* 分離培養でコロニーの発育を認めた 85 検体 (HUD 19 検体, SMD 9 検体, TUD 8 検体, FUD 3 検体, CTD 11 検体, TRD 16 検体, TCD 8 検体, TMD 11 検体) を対象とした。

方 法

1. *C. difficile* の分離培養および菌種同定

C. difficile の分離培養は、糞便検体を等量のトリプチケースイブロス（日本ベクトン・ディッキンソン）で均質化後、等量の 99% エタノールを混合し、攪拌して室温に 30 分間放置した後、cycloserine cefoxitin mannitol agar (CCMA-EX, 日水製薬) に塗布し、嫌気条件下にて 48 時間培養を行った。

C. difficile の同定は、MALDI Biotyper を用いた。flexControl 3.4 ソフトを搭載した microflex LT 装置でマススペクトルを取得し、MALDI Biotyper Compass 4.1 を用いて菌種同定を実施した。選択分離培地上の典型的な性状を呈したコロニーで、スコア値が 2.0 以上のものを採用した。

2. *C. difficile* 分離株を用いた QUIK CHEK による GDH および毒素検出

C. difficile 分離株に対する QUIK CHEK の操作は、添付文書に従い糞便検体と同様の手順で測定を実施した。QUIK CHEK による評価は分離培養で得られたコロニーを同定後、速やかに実施した。TC 法に使用する試料の濃度は、選択分離培地上の *C. difficile* 10 コロニーを釣菌し、希釈液 500 μ L に McFarland No.3 の濁度となるように懸濁し試料として用いた。また、発育したコロニーが 10 個未満であった場合は全てのコロニーを釣菌した。判定は添付文書に従い、メンブレンデバイス判定部のコントロールラインの出現が認められることを確認後、*C. difficile* 抗原ライン (Ag) にラインが出現時に GDH 陽性、ライン未出現時は GDH 陰性と判定した。また、毒素の判定は、毒素ライン (Tox) にラインが出

現時に毒素陽性、ライン未出現時は毒素陰性と判定した。

3. *tcdA*, *tcdB*, binary toxin 遺伝子 (*cdt*) および *tcdC* 変異 (117 番目塩基対の欠失) の検出

C. difficile 株を CCMA-EX 培地に塗布し、35°C48 時間、嫌気培養を行って濁度が McFarland No.4 のサンプル液を作製した。DNA の採取は、QIAamp DNA Mini Kit (株式会社キアゲン) を使用して、200 μ L の懸濁サンプルから DNA を抽出し、最終容量 100 μ L で溶出した。リアルタイム PCR 解析は、*C. difficile* toxin A/toxin B 産生遺伝子 (*tcdA/tcdB*) と、強毒型 *C. difficile* (BI/NAP1/027 株) の特徴である binary toxin 産生遺伝子 (*cdt*) および *tcdC* の変異 (117 番目塩基対の欠失) をターゲットにリアルタイム PCR 解析を行い、Table 1 に示したプライマー・プローブを用いて先行論文に従って実施した^{3)~5)}。機器は、THUNDERBIRD Probe qPCR Mix QPS-101 (東洋紡) を使用した 96 ウェル光学プレート形式の CFX リアルタイム PCR 解析システム (バイオ・ラッド) で検査を実施した。

リアルタイム PCR 解析の反応混合物は、1 x THUNDERBIRD Probe, 0.3 μ M の各特異的プライマー, 0.2 μ M の蛍光プローブ, 滅菌水, 2 μ L の DNA テンプレートの全量 18 μ L で調整した。サイクル条件は、95°C で 1 分間の 1 サイクル、続いて 95°C で 5 秒間および 55°C で 1 分間の 40 サイクルで実施した。解析は、Bio Rad CFX Manager ソフトウェア v 3.0 (バイオ・ラッド) で解析した。解析の結果、Ct 値が 30 以下となった場合を陽性、Ct 値が 30 を超えた場合または Ct 値が得られなかった場合を陰性と判定した。

4. QUIK CHEK およびリアルタイム PCR 解析から得られた検査結果の統計解析

QUIK CHEK およびリアルタイム PCR 解析で得られた検査結果について、二元配置直交表を作成し、リアルタイム PCR 解析をリファレンスとした一致率を求め評価を行った。

結 果

1. *C. difficile* の分離培養および菌種同定

C. difficile の分離培養および菌種同定で *C. difficile* 85 株が分離された。また、MALDI Biotyper では 85 株全てがスコア値 2.0 以上で *C. difficile* と同定された。

2. *C. difficile* 分離株を用いた QUIK CHEK による GDH および毒素検出

C. difficile 分離株を用いた QUIK CHEK による GDH 検出の結果、85 株全てが陽性であった。毒素検出については、60/85 株が陽性であった。

3. QUIK CHEK による毒素検出の結果とリアルタイム PCR 解析による毒素検出の相関

MALDI Biotyper で同定した *C. difficile* 85 株に対して、QUIK CHEK は 60 株で toxin 陽性を示し、25 株で陰性を示した。また、リアルタイム PCR 解析の結果、毒素遺伝子は 60 株 (70.6%) で陽性であった (Figure1)。遺伝子型の内訳は、toxin A⁺B⁺CDT⁺: 5 株 (そのうち *tcdC* 変異株 1 株), toxin A⁺B⁺CDT⁻: 50 株, toxin A⁻B⁺CDT⁻: 5 株, toxin A⁻B⁻CDT⁻: 25 株であった。QUIK CHEK による毒素検出とリアルタイム PCR 解析の一致率は全体一致率 100% (85/85)、陽性一致率 100% (60/60)、陰性一致率 100% (25/25) であっ

Table 1. Primers and probes used for real-time PCR

Target genes	Oligonucleotide	Sequence (5'-3') ^{a, b}	Amplicon size (bp)	Region	Reference
<i>tcdA</i>	tcdA_F	CAGTCGGATTGCAAGTAATGACAAT	102	5891-5993 ^c	[3]
	tcdA_R	AGTAGTATCTACTACCATTAACAGTCTGC			
	tcdA_P	FAM-TTGAGATGATAGCAGTGTCAGGATTG-TAMRA			
<i>tcdB</i>	tcdB_F	TACAAAACAGGTGTATTTAGTACAGAAGATGGA	240	5681-5921 ^d	[3]
	tcdB_R	CACCTATTTGATTTAGMCCTTTAAAGC			
	tcdB_P	FAM-TTTKCCAGTAAAAATCAATTGCTTC-TAMRA			
<i>cdtA</i>	cdtA_F	GATCTGGTCCTCAAGAAATTTGGTT	103	1051-1153 ^e	[4]
	cdtA_R	GCTTGTCCCTCCCATTTTCGATT			
	cdtA_P	FAM-CAAGAGATCCGTTAGTTGCAGCATATCCAATTGT-MGBEQ			
<i>cdtB</i>	cdtB_F	AAAAGCTTCAGGTTCTTTTGACAAG	132	837-968 ^e	[4]
	cdtB_R	TGATCAGTAGAGGCATGTTCAATTG			
	cdtB_P	CY5-AACTCTTACTTCCCTGAAT-BHQ2			
<i>tcdC</i>	tcdC_F	GCACAAAGGRTATTGCTCTACTGG	70		[5]
	tcdC_R1	AGCTGGTGAGGATATATTGCCAA			
	tcdC_R2	CAAGATGGTGAGGATATATTGCCA			
	tcdC_P_wt	FAM-AAACACRCCAAAATAA-MGBEQ ^e			
	tcdC_P_mut	HEX-AAACACRCCAAAATAA-MGBEQ			

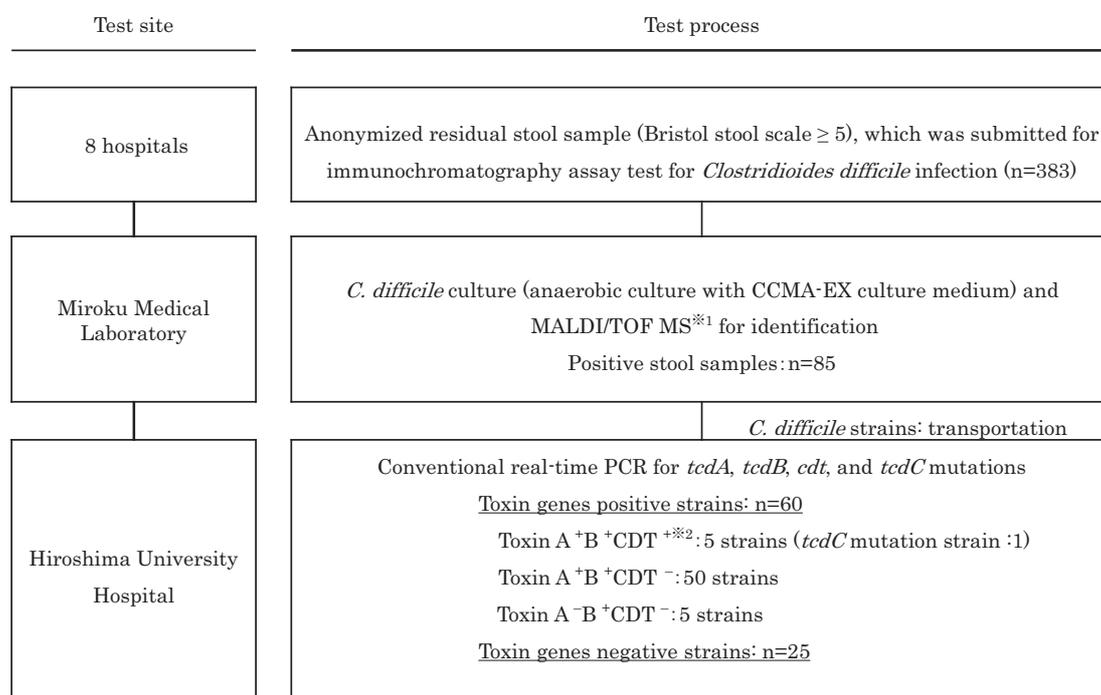
^a FAM, 6-carboxyfluorescein; TAMRA, Carboxy tetramethyl-rhodamine; MGBEQ, Minor Groove Binder Eclipse Quencher; CY5, Cy5 carboxylic acid; BHQ-2, Black Hole Quencher 2; HEX, Hexachlorofluorescein.

^b R = A or G; H = A, C or T

^c On the basis of sequence in GeneBank with accession number M30307 for *tcdA*

^d On the basis of sequence in GeneBank with accession number X53138 for *tcdB*

^e On the basis of sequence in GeneBank with accession number L76081 for *cdtA* and *cdtB*



※1: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

※2: *Clostridioides difficile* binary toxin (CDT)

Figure 1. Study procedure for the assay evaluation of *Clostridioides difficile*

Table 2. Comparison with *C. DIFF* QUIK CHEK and real-time PCR for the identification of toxigenic *Clostridioides difficile*

		<i>C. DIFF</i> QUIK CHEK COMPLETE (toxin)		Total
		Positive	Negative	
PCR	Positive	60	0	60
	Negative	0	25	25
Total		60	25	85
Positive concordance rate	100%			
Negative concordance rate	100%			

た (Table 2)。

考 察

C. difficile は、NAD 特異的グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) を産生し、不可逆的な反応によって L-グルタミン酸を α -ケトグルタル酸に変換する⁶⁾。その GDH は、*gluD* によってエンコードされた代謝酵素であり、30 年以上前から利用されてきた *C. difficile* の共通抗原である^{7,8)}。検体中に存在する GDH とペルオキシダーゼ標識抗 GDH 抗体が結合することにより検出が可能となる。一方で、MALDI Biotyper は、菌のタンパク質をイオン化し静電力によって飛行させ、質量電荷比に応じて分離、検出しマススペクトルを得ることで菌種の同定を行っている。Kiyosuke M, et al の報告では、MALDI Biotyper で *C. difficile* の菌種同定を行ったところ、スコア値 2.0 以上ある場合において種レベルまでの同定が可能だったと報告している⁹⁾。今回、培養コロニーからの GDH 検出の感度・特異度は、MALDI Biotyper と 100% の相関を示し良好な結果であった。したがって、TC 法で GDH が陽性になった場合、そのコロニーは *C. difficile* と同定を兼ねることができると考えられる。また、澤辺¹⁰⁾らの報告では、*C. difficile* の分離株に対する検討で CD チェック D1 (塩野義製薬) と QUIK CHEK の GDH は良好な相関を示したことが報告されている。偽陽性については、過去の基礎検討において *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sporogenes*, *Paeniclostridium sordellii* などが GDH と交差反応することが報告されていた^{8,11)}。しかし、これらの交差反応については、検査キットの改良により回避しつつあるとの報告がなされており^{11,12)}、現在のところ QUIK CHEK では報告されていない。

C. difficile が産生する毒素には、toxin A (腸管毒素) および toxin B (細胞毒素) が存在する。毒素の検出原理は、toxin A または toxin B とペルオキシダーゼ標識抗 *C. difficile* toxin A または B 抗体と結合することにより検出が可能となる。本研究の結果、TC 法による QUIK CHEK による毒素検出とリアルタイム PCR 解析との相関は 100% と良好であった。この結果より、TC 法で毒素が陽性になった際は、*C. difficile* の毒素産生株と判断することが可能と考えられた。そのため、TC 法を実施し、毒素産生株か非産生株かを見極めることで、治療および院内感染対策に貢献できると考えられる。また、TC 法で QUIK CHEK を用いた毒素検出と、PCR 法による毒素遺伝子検出の相関において、Jamal W, et al¹³⁾

の報告では、陽性一致率は 100%、陰性一致率は 83.3% で、Senoh M, et al¹⁴⁾ の報告では、陽性一致率は 82%、陰性一致率は 86% であり、Swindells J, et al¹⁵⁾ の報告では、陽性一致率は 100%、陰性一致率は 95.0% であった。さらに、Xpert *C. difficile* 「セフィエド」(ベックマン・コールター) を用いた場合の陽性一致率は 94.7%、陰性一致率は 100%、Gene Ohm PCR (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いた場合の陽性一致率は 94.4%、陰性一致率は 99.2% であり、現在、日常検査に広く導入されている核酸増幅検査と比較して遜色ない結果が得られている。一方で、TC 法における毒素検出の偽陰性は、検体中に毒素産生株と非産生株が存在した場合に報告されている。また、既報では試料の菌液濁度は、MacFarland No.2~4 の間での調整が報告されており^{16)~21)}、MacFarland No.4 以上になると PCR 法と結果が一致したという報告もある²¹⁾。また、*C. difficile* の純培養時に使用する培地は、チョコレート寒天培地 (日水製薬)、バイタルブルセラ HK 寒天培地 RS (極東製薬)、CCMA-EX 培地の 3 つを比較した場合に、CCMA-EX 培地が PCR 法と一致率が良好であったことが報告されている²¹⁾。そのため、菌液の濁度調整や純培養の使用培地などが原因で偽陰性化となる場合があるので注意が必要である。本研究においては、McFarland No.3 に濁度調整を行い、リアルタイム PCR 解析と同等の結果が得られた。良好な結果が得られた理由として、TC 法を行う際に、*C. difficile* 培養で用いる培地は CCMA-EX 培地などの *C. difficile* 選択分離培地を使用したこと、試料調整時により多くの *C. difficile* 培養コロニーを採取し、MacFarland No.3 に濁度調整を行ったことが要因であると考えられた。一方で、毒素検出における偽陽性については、*Paeniclostridium sordellii* が toxin A と toxin B にそれぞれに相同性がある toxin HT (出血性毒素) と LT (致死性毒素) を産生し交差反応があることや²²⁾、他の検査キットにて *Enterocloster clostridioformis* による偽陽性の報告があるため注意が必要である²³⁾。

北米および欧州において従来の toxin A/toxin B 産生に加えて、第 3 の毒素である binary toxin (CDT) を産生し、*tcdC* 遺伝子変異に伴う toxin A/toxin B 過剰産生株が報告されており²⁴⁾、北米では *Clostridium difficile* BI/NAP1/027 株 (Restriction endonuclease analysis [REA] pattern: BI, North American pulsed-field gel electrophoresis [PFGE] pattern: type 1, PCR-ribotype: 027) が問題視されている。

日本においても、BI/NAP1/027 株が分離されたことが報

告されているが²⁵⁾、BI/NAP1/027株を含めたCDT陽性株によるアウトブレイク事例の報告はない。また、本邦の医療機関で優勢株として問題となっているのは、A⁺B⁺CDT⁻のPCR-ribotype 018株およびA⁺B⁺CDT⁻のPCR-ribotype 369株である²⁶⁾。我々の研究株の中には、CDT陽性株や*tcdC*変異がある株が含まれていたが、それらの株においてもQUICK CHEKで毒素検出が可能であった。しかし、本研究ではこれらの株数が少ないので今後も検討していく必要がある。

本研究におけるLimitationとして以下の点が挙げられる。第一に、8施設85株を用いた検討であるが、感度・特異度を詳細に調査するためには、より大規模な範囲で行う必要がある。第二に、今回はQUICK CHEKのみの検討であり、他のGDHおよび毒素検査試薬は検討していない。

最後に、本研究において、迅速診断キットであるQUICK CHEKを用いたTC法は、純培養時に*C. difficile*選択分離培地を使用し、菌液濁度調整をMcFarland No.3とした場合、GDHおよび毒素の検出性能は、質量分析計やリアルタイムPCR解析と同等であることが立証された。そのため、臨床診断にも用いることが可能であり、CDI診療や院内感染対策に貢献できるものと考えられた。

なお、本研究は、Clinical Evaluation of a Non-purified Direct Molecular Assay for the Detection of *Clostridioides difficile* Toxin Genes in Stool Specimens (PLoS ONE 15 (6) : e0234119.)と並行して実施した。

倫理審査：本評価研究は、研究計画書を各参加施設の倫理委員会に提出し、承認を得て実施した（広島大学病院：承認番号E1395-2）。実施に際して、個人より同意の取得は行わないが、本研究実施について各施設のホームページ上で掲示し情報公開を行い実施した。

謝辞：本臨床性能試験で多大なるご支援を頂きました。株式会社エスアールエルの方々に厚く御礼を申し上げます。

利益相反：株式会社ミロクメディカルラボラトリーで実施した*C. DIFF* QUICK CHEK コンプリート検査試薬は、アポットダイアグノスティクスメディカル株式会社より提供を受けた。

文 献

- Ghose, C. 2013. *Clostridium difficile* infection in the twenty-first century. *Emerg Microbes Infect* 2: 1-8.
- Blake, MR, JM Raker, K Whelan. 2016. Validity and reliability of the Bristol Stool Form Scale in healthy adults and patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 44: 693-703.
- Kubota, H, T Sakai, A Gawad, et al. 2014. Development of TaqMan-based quantitative PCR for sensitive and selective detection of toxigenic *Clostridium difficile* in human stools. *PLoS One* 9: e111684.
- Wroblewski, D, GE Hannett, DJ Bopp, et al. 2009. Rapid molecular characterization of *Clostridium difficile* and assessment of populations of *C. difficile* in stool specimens. *J Clin Microbiol* 47: 2142-2148.
- de Boer, RF, JJ Wijma, T Schuurman, et al. 2010. Evaluation of a rapid molecular screening approach for the detection of toxigenic *Clostridium difficile* in general and subsequent identification of the *tcdC* Delta117 mutation in human stools. *J Microbiol Methods* 83: 59-65.
- Girinathan, BP, SE Braun, R Govind. 2014. *Clostridium difficile* glutamate dehydrogenase is a secreted enzyme that confers resistance to H₂O₂. *Microbiology* 60: 47-55.
- Lyerly, DM, LA Barroso, TD Wilkins. 1991. Identification of the Latex Test-Reactive Protein of *Clostridium difficile* as Glutamate Dehydrogenase. 29: 2639-2642.
- Burnham, CAD, KC Carroll. 2013. Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection: an Ongoing Conundrum for Clinicians and for Clinical Laboratories. *Clin Microbiol Rev* 26: 604-630.
- Kiyosuke, M, Y Kibe, M Oho, et al. 2015. Comparison of two types of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer for the identification and typing of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol* 64: 1144-1150.
- 澤辺悦子, 北村優佳, 古畑紀子, 他. 2011. *Clostridium difficile* 感染症の迅速診断における糞便中 *C. difficile* 抗原およびトキシン A/B 同時検出キット：*C. DIFF* QUICK CHEK COMPLETE の有用性に関する検討. *日臨微誌* 21: 7-13.
- Wilkins, TD, DM Lyerly. 2003. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. *Clin Microbiol* 41: 531-534.
- Zheng, L, S. F. Keller, D. M. Lyerly, et al. 2004. Multicenter Evaluation of a New Screening Test That Detects *Clostridium difficile* in Fecal Specimens. *J Clin Microbiol* 42: 3837-3840.
- Jamal, W, EM Pauline, VO Rotimi. 2014. Comparative performance of the GeneXpert *C. difficile* PCR assay and *C. diff* Quik Chek Complete kit assay for detection of *Clostridium difficile* antigen and toxins in symptomatic community-onset infections. *J. Infect. Dis.* 29: 244-248.
- Senoh, M, H Kato, H Honda, et al. 2019. Performance of laboratory tests for detection for *Clostridioides difficile* : A multicenter prospective study in Japan. *Anaerobe* 60: 1-5.
- Swindells, J, N Brenwald, N Reading, et al. 2010. Evaluation of Diagnostic Tests for *Clostridium difficile* Infection. *J Clin Microbiol* 48: 606-608.
- 西尾美津留, 宮木祐輝, 小川有里子. 2014. *C. DIFF* QUICK CHEK COMPLETE における抗原検出の有用性評価. *医学検査* 63: 635-639.
- 森下良美, 宇賀神和久, 津田祥子, 他. 2015. *Clostridium difficile* 迅速診断キットの運用評価—分離菌株を用いた Toxin 検出感度の向上—. *医学検査* 64: 216-220.
- 矢口勇治, 上田淳夫, 中村浩司, 他. 2017. 糞便中 *Clostridium difficile* 毒素産生関連遺伝子検出キット Verigene CDF パネルの臨床的性能評価. *日臨微誌* 27: 50-56.
- 谷野洋子, 木村武史, 牛山正二, 他. 2015. Toxigenic culture を用いた毒素産生 *Clostridium difficile* 検出の基礎的検討. *医学検査* 64: 680-685.
- 鈴木広道, 戸井之裕, 千葉潤一, 他. 2018. 糞便検体に対する *Clostridioides difficile* 特異抗原・毒素検出試薬の多施設臨床性能試験. *日臨微誌* 28: 13-20.
- 谷野洋子, 木村武史, 牛山正二, 他. 2015. Toxigenic culture

- を用いた毒素産生 *Clostridium difficile* 検出の基礎的検討. 医学検査 64: 680-685.
- 22) Streiber, CE, RL Feldmann, S Saringen. 1990. Cloning of *Clostridium difficile* toxin B gene and demonstration of high N-terminal homology between toxin A and B. Medical Microbiology and Immunology 179: 271-279.
- 23) 仲田佑未, 田仲祐子, 室田博美, 他. 2019. GeneXpert を用いた *Clostridioides difficile* 毒素検出能の評価. 医学検査 68: 707-711.
- 24) McDonald, LC, GE Killgore, A Thompson, et al. 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med 353: 2433-2441.
- 25) Kato, H, Y Ito, RJ van den Berg, et al. 2007. First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan; Eurosurveillance, Volume 12, Issue 2, 11 January.
- 26) Senoh, M, H Kato, T Fukuda, et al. 2015. Predominance of PCR-ribotypes, 018 (smz) and 369 (trf) of *Clostridium difficile* in Japan: a potential relationship with other global circulating strains? J Med Microbiol 64: 1226-1236.

Multicenter evaluation of clinical performance of *C. DIFF* QUIK CHEK COMPLETE for the detection of *Clostridioides difficile* and its toxin with colonies from stool cultures

Toshinori Hara^{1) 2)}, Hiromichi Suzuki³⁾, Tadatomo Oyanagi⁴⁾, Norito Koyanagi⁵⁾, Akihito Ushiki⁶⁾, Naoki Kawabata⁷⁾, Miki Goto⁸⁾, Yukio Hida⁹⁾, Yuji Yaguchi¹⁰⁾, Kiyoko Tamai¹⁰⁾, Shigeyuki Notake¹¹⁾, Keiichi Uemura⁵⁾, Seiya Kashiyama^{1) 2)}, Toru Nanmoku⁸⁾, Satoshi Suzuki¹²⁾, Hiroshi Yamazaki⁷⁾, Hideki Kimura⁹⁾, Hiroyuki Kunishima¹³⁾, Hiroki Ohge¹⁴⁾

¹⁾ Section of Clinical Laboratory, Department of Clinical Practice and Support, Hiroshima University Hospital

²⁾ Division of Clinical Laboratory Medicine, Hiroshima University Hospital

³⁾ Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Tsukuba Medical Center Hospital

⁴⁾ Department of Clinical Laboratory, St. Marianna University School of Medicine Hospital

⁵⁾ Department of Clinical Laboratory, Chutoen General Medical Center

⁶⁾ Department of Clinical Laboratory, Tone Chuo Hospital

⁷⁾ Department of Clinical Laboratory, Tsuruga Municipal Hospital

⁸⁾ Department of Clinical Laboratory, University of Tsukuba Hospital

⁹⁾ Department of Clinical Laboratory, University of Fukui Hospital

¹⁰⁾ Miroku Medical Laboratory Inc.

¹¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Tsukuba Medical Center Hospital

¹²⁾ Division of General Medicine, Tone Chuo Hospital

¹³⁾ Department of Infectious Diseases, St. Marianna University School of Medicine

¹⁴⁾ Department of Infectious Diseases, Hiroshima University Hospital

We prospectively analyzed the clinical performance of *C. DIFF* QUIK CHEK COMPLETE for detection of *Clostridioides difficile* and its toxin using colonies from anaerobic stool cultures isolated on *C. difficile* agar (CCMA-EX). Mass spectrometry and real-time PCR were used to validate the detection of *Clostridioides difficile* and its toxin genes. Sample collection was performed at 8 institutions between November 2018 and March 2019, and 85 strains of *Clostridioides difficile* were isolated from 85 stool samples. The turbidity of each isolated colony suspensions was adjusted to 3 McFarland standards before testing. Detection of glutamate dehydrogenase using *C. DIFF* QUIK CHEK COMPLETE showed positive results for all 85 *C. difficile* colonies, and toxin analysis of *C. DIFF* QUIK CHEK COMPLETE showed positive results for 60 *C. difficile* colonies. The concordance rate for toxin detection was 100% (85/85) for overall concordance, 100% (60/60) for positive concordance, and 100% (25/25) for negative concordance. In this study, we confirmed that *C. DIFF* QUIK CHEK COMPLETE can be used for the detection of *Clostridioides difficile* and its toxin with colonies from stool cultures.