

[原 著]

Clostridioides difficile コロニーを用いた *C. DIFF* QUIK CHEK コンプリートにおける
最適な CD トキシン検査条件

木部泰志¹⁾・清祐麻紀子¹⁾・堀田多恵子¹⁾・康 東天^{1) 2)}

¹⁾ 九州大学病院検査部

²⁾ 九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野

(令和4年3月31日受付, 令和4年5月25日受理)

Clostridioides difficile コロニーを用いたイムノクロマト法による toxin 検査 (コロニー IC) は, *C. difficile* 感染症 (CDI) 診断において重要で, 多くの施設で実施されているが, 検査条件が定められておらず, 施設ごとに方法が異なる。今回, コロニー IC の最適な検査条件の決定を目的に, コロニー培養時間と菌液濃度の検証を行った。2011 年 1 月~2018 年 12 月に当院で分離され, 保存されていた *C. difficile* 30 株を用いた。PCR 法にて毒素遺伝子を証明し (A+B+株: 25 株, A-B+株: 5 株), バイタルメディア CCMA 培地にて, 35℃, 嫌気条件下で 24 時間, 48 時間, 72 時間培養し, 発育したそれぞれのコロニーを用いて McFarland (McF) 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 の試料を作製し *C. DIFF* QUIK CHEK コンプリートで測定した。24 時間培養コロニーでは感度 100% となる条件はなく, 48 時間培養コロニーでは McF 5.0 以上で感度 100%, 72 時間培養コロニーでは McF 2.0 以上で感度 100% であった。したがって, 迅速かつ正確な検査条件は, 48 時間培養コロニーで McF 5.0 以上の菌液を作製して実施することであると考えられた。コロニー IC の検査条件の設定は, 正確な CDI 診断と検査の標準化につながると考える。

Key words: *Clostridioides difficile*, CD トキシン, toxigenic culture, *C. DIFF* QUIK CHEK コンプリート, イムノクロマト

序 文

Clostridioides difficile 感染症 (CDI) は, *C. difficile* が産生する CD トキシン (toxin) によって引き起こされる疾患で, 主症状は下痢であるが, 稀にイレウスや腸管穿孔, 中毒性巨大結腸症など重症化することもある¹⁾。*C. difficile* が産生する toxin には主に toxin A (腸管毒), toxin B (細胞毒), binary toxin があり, 特に binary toxin 産生株による感染症例は重症化や再発のリスクが高く問題となっている²⁾³⁾。*C. difficile* には toxin 非産生株も存在するため, CDI の診断には糞便中の toxin を検出することが重要である。

CDI 診断のための検査として, イムノクロマト法を原理とし, *C. difficile* の特異抗原であるグルタメートデヒドロゲナーゼ (GDH) と toxin が同時検出可能な検査キットが広く利用されているが, GDH の感度は 91~100% であるのに対し, toxin の検出感度は 41.2~63.6% と低いことが報告されている^{4)~9)}。そのため, 米国感染症学会 (IDSA) および米国医療疫学学会 (SHEA)¹⁰⁾, 日本化学療法学会および日本感染症学会¹¹⁾が発刊しているガイドラインでは, GDH 陽性/toxin 陰性となった場合には nucleic acid amplification test

(NAAT) や *C. difficile* 培養コロニーを用いたイムノクロマト検査 (コロニー IC) による確認試験を実施する 2step アルゴリズムが推奨されている。しかし, コロニー IC の検査条件は検査キットの添付文書に明確に定められておらず, 施設ごとにさまざまな方法で実施されているのが現状である。既報では, 培地の種類や菌液濃度がコロニー IC の検査結果に影響を与えることが報告されているが¹²⁾, コロニー培養時間や McF 4.0 以上の菌液濃度について検証された報告はない。

今回, イムノクロマト法を原理とし, GDH と toxin (toxin A および toxin B) を検出可能な検査キットである *C. DIFF* QUIK CHEK コンプリート (コンプリート, アボットダイアグノスティクスメディカル株式会社) における, コロニー IC の最適な toxin 検査条件の決定を目的に, 検査に使用するコロニー培養時間と菌液濃度についての検証を行った。

材料と方法

2011 年 1 月~2018 年 12 月に当院で分離されマイクロバンクに-80℃で凍結保存されていた toxin 産生 *C. difficile* のうち, 同一患者株を除いた 30 株を用いた。対象菌株が毒素産生遺伝子を保有していることを証明した後, コンプリートによる検証を行った。

1. *C. difficile* の毒素遺伝子保有の証明および毒素型の決定

対象菌株をバイタルメディア プルセラ HK 寒天培地 (ウサギ) (極東製薬工業株式会社) に接種し, 35℃, 嫌気条件

著者連絡先: (〒812-8582) 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1
九州大学病院検査部
木部泰志
TEL: 092-642-5757
FAX: 092-642-5755
E-mail: kibe.yasushi.908@m.kyushu-u.ac.jp

下で48時間培養を行い、加藤ら¹³⁾¹⁴⁾の示すプライマーを用いてPCR法により toxinA, toxinB 遺伝子の証明および毒素型の決定を行った。DNA抽出にはシカジーニクス DNA抽出試薬(関東化学株式会社)を用いた。PCR反応液は、5 µLのDNA template, 2.5 µLの10×Ex Taq Buffer, 2 µLのdNTP Mixture, 1.0 µLの各プライマー(10 µM), 0.1 µLのEX Taq polymerase(5 U/mL)に滅菌蒸留水を加えて全量25 µLに調整した。PCRサイクル条件は、94℃ 1分, 54℃ 1分, 72℃ 1分を36サイクル行い、得られた増幅産物は1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動法にて解析した。まず、プライマーNK104(5'-GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTACGC-3')-NK105(5'-CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT-3')によるPCRで204 bpの増幅産物が得られることを確認し、さらにNK11(5'-TGATGCTAATAATGAATCTAAAATGGTAAC-3')-NK9(5'-CCACCAGCTGCAGCCATA-3')によるPCRで1266 bpの増幅産物が得られれば toxin A陽性/toxin B陽性株(A+B+株)と決定、NKV011(5'-TTTGTATCCTATAGAATCTAACTTAGTAAC-3')-NK9によるPCRで714 bpの増幅産物が得られれば toxin A陰性/toxin B陽性株(A-B+株)と決定した。なお、binary toxin 遺伝子は本研究では検索していない。

2. コロニー IC による最適な toxin 検査条件の検証

対象菌株をバイタルメディア CCMA 培地(極東製薬工業株式会社)に接種して、35℃、嫌気条件下で24時間、48時間、72時間培養し、発育したそれぞれのコロニーを McF 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 になるようにコンプリート付属の希釈液に懸濁して調整検体とし、その後は添付文書に従いコンプリートで検査を実施した。菌液調整には、デンシチェック プラス(ビオメリュー・ジャパン株式会社)を用い、測定限界を超える McF 5.0, McF 6.0 の菌液は、目的の濃度と推定される菌液を作製し、それを希釈測定することで元菌液の濃度を計算して調整した。判定はコンプリートの添付文書に従い、キット中央のコントロールラインが出現し、かつ toxin 判定部位に青色のラインが出現したものを toxin 陽性と判定した。各培養時間と各菌液濃度の組み合わせで toxin 検査結果を比較し、最適な検査条件を決定した。

結 果

1. *C. difficile* の毒素遺伝子検出および毒素型の決定

C. difficile 全30株で毒素遺伝子が検出され、うち25株が A+B+株, 5株が A-B+株であった。

2. コロニー IC による最適な toxin 検査条件の検証

Table 1に、各検査条件におけるコンプリートの toxin 検査結果を示す。24時間培養コロニーを用いた場合、30株のうち17株(No.1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 19, 20, 21, 22, 25)で、全ての菌液濃度において toxin 陰性となった。48時間培養コロニーを用いた場合、McF 5.0以上の菌液濃度で30株全て toxin 陽性となった。72時間培養コロニーを用いた場合、全ての菌液濃度で30株全て toxin 陽性となった。つまり、24時間培養コロニーを用いた場合は感度100%となる菌液濃度はなく、48時間培養コロニーでは McF 5.0以上で感度100%, 72時間培養コロニーでは McF 2.0以上で感度100%となった(Table 2)。Figure 1に示す

ように、同一コロニーを用いた場合、いずれの菌株も菌液濃度が高いほど陽性ラインは濃くなり、視認性は良好となる傾向が認められた。

考 察

コロニー IC の菌液濃度に関して、谷野ら¹²⁾は、*C. difficile* 42株において McF 4.0以上の菌液を作製してコンプリートで検査を実施し、PCR法による毒素遺伝子検査結果と100%一致したと報告している。また、原ら¹⁵⁾は、*C. difficile* 85株において McF 3.0の菌液を作製してコンプリートで検査を実施し、リアルタイム PCR による毒素遺伝子解析結果と100%一致したと報告している。今回、菌液濃度に加え、コロニー培養時間との組み合わせについても検証したところ、24時間培養コロニーでは、McF 6.0の濃厚菌液を作製したとしても、30株中17株(56.7%)が偽陰性を示したことから、検査には適さないと考えられた。48時間培養コロニーでは、菌液濃度が McF 4.0以下では偽陰性となる株が認められたため、McF 5.0以上の菌液濃度で検査すべきと考えられた。72時間培養コロニーでは、McF 2.0から6.0まで全ての菌液濃度で陽性となり、少ない菌量でも正しく検査できることが示唆された。本研究の結果から、コロニー IC による toxin 検査は、濃厚な菌液で実施するべきであると考えられ、既報で示されている結果と一致していた。また、今回新たにコロニー培養時間も検査結果に影響を与えることが示された。Darkoh ら¹⁶⁾は *C. difficile* の toxin 産生は定常期初期より始まり、培養36時間前後で最もピークに達すると報告しており、24時間培養コロニーでは toxin 産生量が不十分であるため、多くの株で偽陰性を示したと考えられた。以上より、48時間培養コロニーを用い、McF 5.0以上の菌液を作製して実施することが、迅速かつ正確なコロニー IC の検査条件であると考えられた。しかし、Figure 2に示すように、McF 5.0は肉眼的にも非常に濃い濃度であり、通常の濁度計では測定できないのが問題点である。作製の目安としては、コンプリート希釈液750 µLに直径3~4 mmのコロニーを5コロニー懸濁すると McF 5.0程度の菌液となるため、5コロニー以上懸濁して検査する必要がある。また、72時間培養コロニーを用いる場合も、濃厚菌液を用いた方が陽性ラインの視認性が向上し、誤判定を防止できると考えられた。

その他、考慮すべき条件としては、toxigenic culture に使用する培地の種類が挙げられる。*C. difficile* の毒素産生と芽胞形成は正の相関があり、毒素を産生するためには芽胞の発芽が必要と報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。芽胞の発芽や毒素産生は、一次胆汁酸である taurocholate (タウロコール酸) や cholate (コール酸)、グリシン、カルシウム存在下で促進され、逆に二次胆汁酸である deoxycholate (デオキシコール酸) やシステイン存在下では抑制される¹⁹⁾²⁰⁾。Wilson ら²¹⁾は、taurocholate を添加した培地では *C. difficile* の検出率、芽胞の回収率が上昇したと報告している。また、谷野ら¹²⁾は、システインなどのアミノ酸を含むブルセラ HK 寒天培地(RS)やチョコレート寒天培地に比べ、CCMA 培地で toxin 検出感度が高かったと報告しており、本研究では、toxigenic culture にバイタルメディア CCMA 培地を用いた。その他の培地を使用する場合には、さらなる検証が必要と考えられる。

Table 1. The results of toxin by *C. DIFF* QUIK CHEK COMPLETE in each test conditions

No.	toxin type	24-hour culture solutions					48-hour culture solutions					72-hour culture solutions				
		McF 2.0	McF 3.0	McF 4.0	McF 5.0	McF 6.0	McF 2.0	McF 3.0	McF 4.0	McF 5.0	McF 6.0	McF 2.0	McF 3.0	McF 4.0	McF 5.0	McF 6.0
1	A+B+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
2	A+B+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3	A+B+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4	A+B+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5	A+B+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	A+B+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	A+B+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	A+B+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	A+B+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	A+B+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	A+B+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	A+B+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	A+B+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	A+B+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	A+B+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	A+B+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	A+B+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	A+B+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	A+B+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	A+B+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	A+B+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	A+B+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	A+B+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	A+B+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	A+B+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	A-B+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	A-B+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	A-B+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	A-B+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	A-B+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Table 2. Sensitivity of toxin from the combination of culture time and turbidity

culture time of colonies	McF 2.0	McF 3.0	McF 4.0	McF 5.0	McF 6.0
24 hours	7% (2/30)	17% (5/30)	30% (9/30)	37% (11/30)	43% (13/30)
48 hours	67% (20/30)	87% (26/30)	97% (29/30)	100% (30/30)	100% (30/30)
72 hours	100% (30/30)	100% (30/30)	100% (30/30)	100% (30/30)	100% (30/30)

本研究における Limitation は二点あり、一点は、使用菌株の分子疫学解析等を実施していないことが挙げられる。したがって、使用菌株に関して、同一患者株は除いているが、院内の同一株が含まれる可能性は否定できていない。また、Vohra ら²²⁾は、PCR リボタイプにより、毒素産生量が異なることを報告しており、本研究で得られた検査条件が全てのリボタイプに当てはまるかは検証できていない。もう一点は、コンプリート以外の他の検査キットについて検証できていないことが挙げられる。検査キット間で、性能に差異があるこ

とが考えられるが、コンプリートと GE テスト イムノクロマト-CD GDH/TOX 「ニッスイ」(日水製薬株式会社)およびクイック チェイサー CD GDH/TOX (株式会社ミズホメディー)を比較した既報²³⁾²⁴⁾では、いずれの検査キットも toxin 検出感度・特異度は同等であったと報告されている。これらは糞便検体を用いた比較研究であるが、コロニー IC においても検査キットによる差異は小さいと考えられる。

J-SIPHE (Japan Surveillance for Infection Prevention and Healthcare Epidemiology: 感染対策連携共通プラットフォーム)

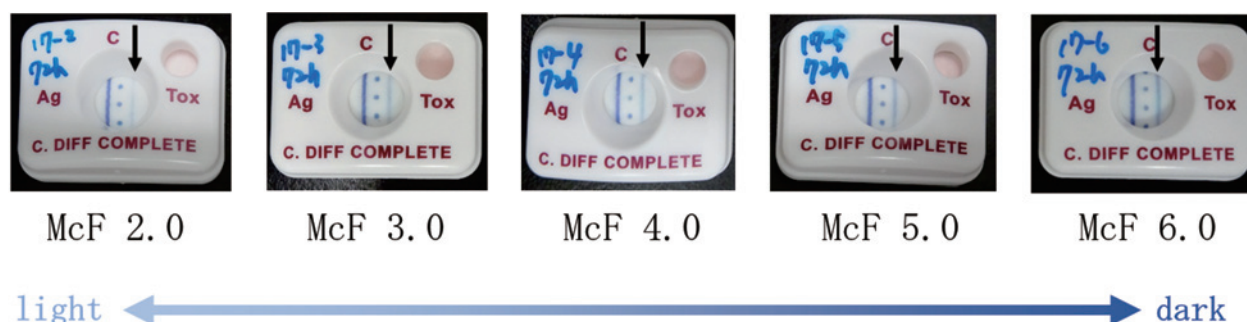


Figure 1. Examples of toxin test line visibilities in each turbidity



Figure 2. Sample of McFarland No.5.0 bacterial solution

フォーム)の年報²⁵⁾によると、CDI検査に2stepアルゴリズムを採用している施設のうち、75.7% (112/148)がコロニーICによる確認試験を行っていることが報告されており、コロニーICは日本のCDI診断において重要な役割を担っている。近年、迅速かつ正確な検査ツールとして、NAATが活用され始めているが、検査機器が高額であることや、感染防止対策加算1と検体検査管理加算(II)の施設基準を満たす施設以外では保険算定できない、などの理由から、限られた施設でしか採用できないのが現状である。コロニーICの適切な検査条件を定め、各施設での検査法を統一することで、より正確なCDI診断と検査の標準化につながると考える。

本研究は、九州大学医学部地区部局臨床研究倫理審査委員会の承認を得て実施した(承認番号:2019-506)。

利益相反: C. DIFF QUIK CHEK コンプリート検査試薬はアボ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

- 1) Guh, AY, PK Kutty. 2018. *Clostridioides difficile* Infection. Ann Intern Med. 169: ITC49-ITC64.
- 2) 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.
- 3) López-Cárdenas, S, E Torres-Martos, J Mora-Delgado, et al. 2021. The prognostic value of toxin B and binary toxin in *Clostridioides difficile* infection. Gut Microbes. 13: 1884516.
- 4) 西尾美津留, 宮木祐輝, 小川有里子. 2014. C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE における GDH 抗原検出の有用性評価. 医学検査 63: 635-639.
- 5) 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 抗原およびトキシシン A/B 同時検出キット: C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE の有用性に関する検討. 日臨微誌 21: 7-13.
- 6) 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. Int J Infect Dis. 34: 235-239.
- 7) Kim, H, WH Kim, M Kim, et al. 2014. Evaluation of a rapid membrane enzyme immunoassay for the simultaneous detection of glutamate dehydrogenase and toxin for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Ann Lab Med. 34: 235-239.
- 8) 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: 102107.
- 9) Yoo, IY, DJ Song, HJ Huh, et al. 2019. Simultaneous detection of *Clostridioides difficile* glutamate dehydrogenase and toxin A/B: Comparison of the C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE and RIDASCREEN assays. Ann Lab Med. 39: 214-217.
- 10) McDonald, LC, DN Gerding, S Johnson, et al. 2018. 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. 66: e1-e48.
- 11) 公益社団法人 日本化学療法学会, 一般社団法人 日本感

- 染症学会. 2018. *C. difficile* 検査のフローチャート. p. (i)-(iii), *Clostridioides (Clostridium) difficile* 感染症診療ガイドライン, 杏林社, 東京.
- 12) 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.
- 13) Kato, H, N Kato, K Watanabe, et al. 1998. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. J Clin Microbiol. 36: 2178-2182.
- 14) Kato, H, N Kato, S Katow, et al. 1999. Deletions in the repeating sequences of the toxin A gene of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains. FEMS Microbiol Lett. 175: 197-203.
- 15) 原 稔典, 鈴木広道, 大柳忠智, 他. 2021. 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. 日臨微誌 31: 38-43.
- 16) Darkoh, C, HL DuPont, SJ Norris, et al. 2015. Toxin synthesis by *Clostridium difficile* is regulated through quorum signaling. mBio. 6: e02569.
- 17) Blanco, N, S Walk, AN Malani, et al. 2018. *Clostridium difficile* shows no trade-off between toxin and spore production within the human host. J Med Microbiol. 67: 631-640.
- 18) Kochan, TJ, MH Foley, MS Shoshiev, et al. 2018. Updates to *Clostridium difficile* spore germination. J Bacteriol. 200: e00218-18.
- 19) Sorg, JA, AL Sonenshein. 2008. Bile salts and glycine as co-germinants for *Clostridium difficile* spores. J Bacteriol. 190: 2505-2512.
- 20) Usui, Y, A Ayibieke, Y Kamiichi, et al. 2020. Impact of deoxycholate on *Clostridioides difficile* growth, toxin production, and sporulation. Heliyon. 6: e03717.
- 21) Wilson, KH, MJ Kennedy, FR Fekety. 1982. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol. 15: 443-446.
- 22) Vohra, P, IR Poxton. 2011. Comparison of toxin and spore production in clinically relevant strains of *Clostridium difficile*. Microbiology. 157: 1343-1353.
- 23) 吉田賢太. 2021. *Clostridioides difficile* 抗原迅速診断キット「クイックチェイサー CD GDH/TOX」の有用性に関する評価. 医学と薬学 78: 633-641.
- 24) 鈴木広道, 戸井之裕, 千葉純一, 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: 261-268.
- 25) 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター AMR 臨床リファレンスセンター. 2021. 感染対策連携共通プラットフォーム J-SIPHE 年報 2020. <https://j-siphe.ncgm.go.jp/files/J-SIPHE%E5%B9%B4%E5%A0%B12020.pdf> 2022 年 3 月 22 日現在.

Optimal CD toxin test conditions for *C. DIFF* QUIK CHEK COMPLETE using *Clostridioides difficile* colonies

Yasushi Kibe¹⁾, Makiko Kiyosuke¹⁾, Taeko Hotta¹⁾, Dongchon Kang^{1) 2)}

¹⁾Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Hospital

²⁾Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences

Clostridioides difficile toxin analysis using *C. difficile* colonies in immunochromatography (colony IC) is important for the diagnosis of *C. difficile* infection (CDI) and is performed in many clinical laboratories. However, its standard procedure is not defined and various sample conditions are used. We evaluated the culture time and the concentration of the bacterial solution for colony IC to determine the optimal testing conditions. We used 30 strains of *C. difficile* which were isolated and stored at our hospital between January 2011 and December 2018. Their toxin genotypes were A+B+for 25 strains and A-B+for five strains. Colonies from these strains were cultured in Vital Media CCMA medium under anaerobic conditions at 35°C for 24, 48, and 72 hours. Then McFarland (McF) 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, and 6.0 solutions were prepared for each colony. The solutions were analyzed for the toxins with *C. DIFF* QUIK CHEK COMPLETE. In the analysis using 24-hour culture solutions, 100% sensitivity was not obtained at any McFs. The conditions for 100% sensitivity were McF 5.0 or higher for 48-hour culture and McF 2.0 or higher for 72-hour culture. Therefore, from viewpoints of test speed and result accuracy, desired testing conditions were considered to be 48-hour culture with a McF of 5.0 or higher. This standardization of the sample preparation for colony IC can contribute to accurate CDI diagnosis.