

[原 著]

3ステップアルゴリズム法における *Clostridioides difficile* Toxin 検出試薬の有用性評価

千葉美紀子・中山麻美・三浦悠理子・勝見真琴
阿部裕子・藤巻慎一・藤原 亨
東北大学病院診療技術部検査部門

(令和4年7月31日受付, 令和4年11月25日受理)

3ステップアルゴリズム法³⁾における *Clostridioides difficile* Toxin 検出試薬の有用性評価をするため、従来試薬である C. DIFF QUIK CHEK コンプリート (CHEK COMPLETE) と新規試薬であるクイックチェイサー CD GDH/TOX (QUICK CHASER) の比較検討を行った。分離菌株を用いた評価では、GDH・Toxin 共に CHEK COMPLETE の検出性能が高かった。リボタイプ型による GDH の検出能に差は見られなかったが、Toxin の検出限界はリボタイプ型で異なる傾向が見られた。臨床検体を用いた評価では、CHEK COMPLETE と QUICK CHASER の検出感度/特異度は GDH で 100.0%/96.3%, 89.5%/100.0%, Toxin で 46.7%/100.0%, 26.7%/100.0% であった。CHEK COMPLETE は試薬コストが保険点数を上回るという問題点はあるものの、3ステップアルゴリズム法における性能は十分と考える。一方、QUICK CHASER は 1step15分と操作性は簡便であるが、CHEK COMPLETE と比較して感度が低い可能性があり、また、リボタイプ型により検出しにくい株が存在することを考慮する必要がある。

Key words: CDtoxin, *C. difficile*, GDH, Ribotype, イムノクロマト

序 文

Clostridioides difficile は、産生する毒素により、下痢や偽膜性腸炎を症状とする *C. difficile* infection (CDI) を引き起こす原因菌である。抗菌薬使用などによって腸内細菌叢が攪乱されて発症することが多く、抗菌薬関連下痢症 (AAD) 例における *C. difficile* 関与の割合は、国や地域により差はあるものの 20% 程度とされており¹⁾²⁾、AAD における最も重要な細菌と位置づけられている。重篤化することで、偽膜性腸炎や麻痺性イレウス、巨大結腸などの病態を引き起こすことがあり³⁾、早期治療のための正確で迅速な検査が求められる。一方、芽胞の状態では環境中に存在し、アルコールに耐性であることから、国内でのアウトブレイク事例も散発しており⁴⁾、院内感染対策においても検査の重要性は高い。

検査診断法としては、細胞毒性試験による糞便中 ToxinB 検出が Gold Standard とされているが、ペロ細胞の管理や操作が煩雑な点から、検査室では Glutamate dehydrogenase (GDH) および毒素 (ToxinA・ToxinB) 抗原検出を目的とする Enzyme immunoassay (EIA) 法、培養により発育した菌株の懸濁液で EIA 法を実施する Toxigenic culture (TC) 法、糞便中の *cdtB* 遺伝子を検出する Nucleic Acid Amplification Test (NAAT) 法が行われている。EIA 法による検査について、*C. difficile* 診療ガイドラインでは Toxin の検

出感度は不十分であるが、GDH 検出感度が十分に優れていることを評価し、GDH 陰性の場合には CDI ではない可能性が高く、GDH 陽性かつ Toxin 陰性の場合には Toxin 産生株を検出できない可能性があるとしている⁵⁾。そのため国内では、EIA 法にて GDH 陽性、Toxin 陰性だった場合に限り、TC 法または NAAT 法にて追加検査を行うとする 3ステップアルゴリズム法が推奨されている³⁾。これは、GDH の検出感度は十分高いが、Toxin の感度が低いという EIA 法の欠点を、TC 法または NAAT 法にて補うフローである。一方で、EIA 法は、操作性、迅速性に優れ、NAAT 法と比較して低コストで検査が実施できる点において優れるため、最初のスクリーニング検査として実施される。この EIA 試薬について、2020 年にクイックチェイサー CD GDH/TOX (株式会社ミズホメディー、以下 QUICK CHASER) が発売された。1step15分と操作性が簡便であり、当院で従来より使用している C. DIFF QUIK CHEK コンプリート (コージンバイオ株式会社、以下 CHEK COMPLETE) と比較して試薬コストも低いいため、QUICK CHASER を導入することで、より迅速な報告と試薬コストの削減に貢献できると考えた。そこで我々は、両試薬の性能を比較し、3ステップアルゴリズム法における EIA 試薬の有用性評価を行った。

対象および方法

CHEK COMPLETE と QUICK CHASER の性能を比較するため、分離菌株を用いた評価と臨床検体を用いた評価を実施した。

分離菌株を用いた評価

1. 対象菌株

当院にて別患者より分離され、VITEK MS (ビオメ

著者連絡先：(〒980-8574) 宮城県仙台市青葉区星後町 1-1
東北大学病院診療技術部検査部門
千葉美紀子
TEL: 022-717-7388
FAX: 022-717-7378
E-mail: chiba.m@med.tohoku.ac.jp

Table 1. Reference strain

| Isolate No. | PCR-ribotype | Japan-ribotype | <i>slpA</i> sequence type | Toxin production |
|-----------------|------------------|----------------|---------------------------|--|
| TR15 | 369 | trf | fr-01 | A ⁻ B ⁺ CDT ⁻ |
| JND1.1-059 | 014 | hr | hr-01 | A ⁺ B ⁺ CDT ⁻ |
| KO20 (GAI97660) | 018 | smz | smz-01 | A ⁺ B ⁺ CDT ⁻ |
| JND14-80 | 018 ⁿ | | smz-01 | A ⁺ B ⁺ CDT ⁻ |

補足) CDT : Binary toxin production gene

Table 2. Strain analysis results

| Isolate No. | ToxinA gene | ToxinB gene | PCR-ribotype |
|-------------|-------------|-------------|----------------------|
| 1 | - | + | 369 |
| 2 | - | + | 369 |
| 3 | - | + | 369 |
| 4 | + | + | 018/018 ⁿ |
| 5 | + | + | 018/018 ⁿ |
| 6 | + | + | 014 |
| 7 | + | + | 014 |
| 8 | + | + | 014 |

リユー・ジャパン株式会社)で *C. difficile* と同定された臨床分離菌株 8 株を対象とした。

2. 対象菌株の解析

対象菌株の Toxin 遺伝子と PCR ribotyping を解析した。標的遺伝子を *cdtB* として NK104-NK105 のプライマーセットで 204 bp に増幅産物が確認された株を ToxinB 陽性、*cdtA* を標的として NK11-NKV011-NK9 プライマーセットで 714 bp または 2535 bp に増幅産物が確認された株を ToxinA 陽性とした⁹⁾。PCR ribotyping 解析は先行論文に従って実施し⁷⁾⁸⁾、相同性の確認用として、国立感染症研究所薬剤耐性研究センター加藤はる先生より分与された PCR リボタイプと *slpA* sequence type が特定された菌株を同様に解析した (Table 1)。対象菌株は Toxin A (-) B (+) のリボタイプ 369 が 3 株、Toxin A (+) B (+) のリボタイプ 018/018ⁿ が 2 株、Toxin A (+) B (+) のリボタイプ 014 が 3 株であり (Table 2)、この 8 株を用いて GDH、Toxin の検出能を評価した。

3. GDH 検出能

対象菌株のうち、リボタイプの異なる 3 株を使用して、GDH 検出能の評価を行った。プルセラ HK 寒天培地 (極東製薬) で 37.0°C 48 時間の嫌気培養を行い、発育したコロニーを滅菌生理食塩水で McFarland No.(McF) 2.0 に菌液調整し、10 倍、100 倍、1,000 倍に段階希釈した。それぞれの希釈菌液を検体として、添付文書記載の手順で測定を行い、目視にて GDH 検出部にラインが確認された最低濃度域を比較した。

4. Toxin 検出能

対象菌株 8 株を使用して、リボタイプ別に Toxin 検出能の評価を行った。プルセラ HK 寒天培地で 48 時間培養後のコロニーをそれぞれの試薬キット添付の希釈液にて、McF 4.0, McF 3.0, McF 2.0 に調整し、調整後希釈菌液とした。調整後希釈菌液は添付文書の滴下量に従ってテストプレートに

滴下し測定、目視で Toxin 検出部のラインが確認できた最小濃度域を比較した。

臨床検体を用いた評価

1. 対象

2019 年 9 月から 2021 年 7 月の間に CDI 疑いで当院の検査室に提出されたプリストールスケール 5 以上の糞便 (患者重複なし) を対象とした。-80°C で一時凍結保存し、解凍した糞便 30 検体と、4°C 保管で提出後 24 時間以内の新鮮糞便 16 検体で検討を行った。なお、本研究は東北大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号: 2022-1-234)。

2. 糞便検体での GDH・Toxin 検出能

添付文書記載の手順で両試薬同時に測定を行い、GDH 検出部のラインが確認できた検体を GDH 陽性、Toxin 検出部のラインが確認できた検体を Toxin 陽性と判定した。また、EIA 法で GDH 陽性になったにも関わらず、培養でコロニーが得られなかった検体について、Xpert *C. difficile* 「セフィエド」(ベックマンコールター社) を使用し、糞便中の *cdtB* 遺伝子を測定した。

3. 糞便中 GDH 検出成績の比較法

本研究では CHEK COMPLETE または QUICK CHASER のいずれか一つでも GDH 陽性となり、培養にて *C. difficile* の発育が確認された検体を *C. difficile* 陽性検体、GDH 陽性にも関わらず発育しなかった検体またはいずれの試薬でも GDH 陰性となった検体を *C. difficile* 陰性検体と定義し、両試薬の感度・特異度を比較した。なお、発育コロニーの同定は VITEK MS で行い、培養は CCMA-EX 培地 (日水製薬) で 37.0°C 48 時間の嫌気培養を行った。

4. 糞便中 Toxin 検出成績の比較法

培養で発育したコロニーの *cdtA*、*cdtB* 遺伝子保有の有無を、対象菌株の解析と同様の PCR 法⁹⁾で確認した。*cdtB* 遺伝子が確認できた検体を Toxin 陽性検体、*cdtB* 遺伝子が検出されない検体または *C. difficile* 陰性検体を Toxin 陰性検体と定義し、Toxin 陽性検体に対する両試薬の Toxin 感度・特異度を比較した。

結 果

分離菌株を用いた評価

1. GDH 検出能 (Table 3)

検出限界は、CHEK COMPLETE で $\text{McF}2.0 \times 10^{-2}$ 、QUICK CHASER で $\text{McF}2.0 \times 10^{-1}$ であった。また、リボタイプの違いによる差はみられず、すべてのリボタイプで同一濃度までの検出能であった。

Table 3. Comparison of sensitivity to detection of GDH by *C. difficile* strains

| PCR-ribotype | Isolate No. | CHEK COMPLETE | | | | QUICK CHASER | | | |
|--------------|-------------|---------------|------------------|------------------|------------------|--------------|------------------|------------------|------------------|
| | | McF 2.0 | $\times 10^{-1}$ | $\times 10^{-2}$ | $\times 10^{-3}$ | McF 2.0 | $\times 10^{-1}$ | $\times 10^{-2}$ | $\times 10^{-3}$ |
| 369 | 1 | + | + | + | - | + | + | - | - |
| 018/018" | 4 | + | + | + | - | + | + | - | - |
| 014 | 6 | + | + | + | - | + | + | - | - |

Table 4. Comparison of sensitivity to detection of Toxin by *C. difficile* strains

| PCR-ribotype | Isolate No. | CHEK COMPLETE | | | QUICK CHASER | | |
|--------------|-------------|---------------|---------|---------|--------------|---------|---------|
| | | McF 4.0 | McF 3.0 | McF 2.0 | McF 4.0 | McF 3.0 | McF 2.0 |
| 369 | 1 | + | + | + | + | + | - |
| | 2 | + | + | + | - | - | - |
| | 3 | + | + | + | + | - | - |
| 018/018" | 4 | + | + | + | + | + | + |
| | 5 | + | + | + | + | + | + |
| 014 | 6 | + | + | - | + | + | - |
| | 7 | + | - | - | + | + | - |
| | 8 | + | + | + | + | - | - |

2. Toxin 検出能 (Table 4)

8株中 McF2.0 調整後菌液で検出できた株は CHEK COMPLETE で6株, QUICK CHASER で2株あった。リボタイプ 018/018" 型の2株は両試薬とも McF2.0 まで検出可能であった。一方, ToxinA (-) B (+) のリボタイプ 369 型では, CHEK COMPLETE では3株とも McF2.0 まで検出可能であったのに対し, QUICK CHASER では McF2.0 で検出できた株はなく, 1株は McF4.0 でも検出不能であった。リボタイプ 014 型の検出能は両試薬ともばらつきがみられ, McF3.0 または McF2.0 で検出できない株が存在した。

臨床検体を用いた評価

1. 糞便検体での GDH・Toxin 検出能

46 検体の結果を Table 5 に示す。*C. difficile* 培養陽性検体は 19 検体あり, GDH 検出の感度/特異度は, CHEK COMPLETE で 100.0%/96.3%, QUICK CHASER で 89.5%/100.0% であった (Table 6)。19 検体のうち 15 検体が ToxinB 陽性であり, 糞便検体での Toxin 検出の感度/特異度は, CHEK COMPLETE で 46.7%/100.0%, QUICK CHASER で 26.7%/100.0% であった (Table 7)。

CHEK COMPLETE と QUICK CHASER で結果が乖離した検体が 6 検体あり (Table 5), GDH 乖離 3 検体はいずれも CHEK COMPLETE で陽性, QUICK CHASER で陰性の結果であった。そのうち 2 検体 (サンプル No.25, 33) は培養法で陽性となり, QUICK CHASER の偽陰性と判断した。一方, 1 検体 (サンプル No.39) は培養法で陰性となり, Xpert *C. difficile* 「セフィエド」での測定で糞便中 *cdtB* も陰性であったことから, CHEK COMPLETE の偽陽性と判断した。Toxin 乖離 3 検体はいずれも CHEK COMPLETE で陽性, QUICK CHASER で陰性の結果であり, PCR 法で ToxinB 陽性となったことから, QUICK CHASER の偽陰性と判断した。このうち 1 検体 (サンプル No.28) は遺伝子検査の結果より, ToxinA (-) ToxinB (+) 株であることが確認さ

れた。

考 察

C. difficile の産生する Toxin により引き起こされる CDI は, その病態に対しての適切な抗菌薬治療が求められるだけでなく, 院内感染対策においても重要な菌である。それ故, 正確な診断のための検査が求められ, 腸管感染症検査ガイドライン³⁾には, 検査感度を高めるための 3 ステップアルゴリズム法の操作手順が示されている。

今回我々は, この 3 ステップアルゴリズム法における EIA 試薬の有用性評価を目的に CHEK COMPLETE と QUICK CHASER の性能を比較した。従来試薬である CHEK COMPLETE が 1 テストあたり 980 円で, 2step の操作が必要であり, 25 分の検査時間であるのに対し, 新規試薬である QUICK CHASER は 800 円で, 操作は 1step のみであり, 検査時間も 15 分と短時間である。そのため, QUICK CHASER は, 操作性とコスト面でより優れた試薬といえる。CDtoxin 検査の問題点の一つとして, EIA 法であるクロストリジオイデス・ディフィシル抗原定性検査の保険点数が 80 点であることが挙げられる⁹⁾。これは CHEK COMPLETE の価格を下回る低い点数であり, QUICK CHASER を使用することではじめて保険点数内での検査が可能となる。また, QUICK CHASER は測定時間が短い点でより迅速な結果報告ができ, 臨床においても有用であると考えたため, 今回の比較検討試薬とした。添付文書上の GDH の検出感度は, CHEK COMPLETE 0.80 ng/mL に対して, QUICK CHASER 0.30 ng/mL であることから, QUICK CHASER の GDH 検出性能が高いことが予想された。しかし, 今回我々の行った分離菌株を用いての検出能の比較では, CHEK COMPLETE が McF2.0 $\times 10^{-2}$ まで検出可能であったのに対し, QUICK CHASER は McF2.0 $\times 10^{-1}$ までであった。同様に臨床検体での比較でも, CHEK COMPLETE がより検出感度が高い結果となった。

Table 5. Test results of patient fecal specimens

| Sample No. | Sample storage condition (°C) | Bristol Stool Scale | GDH results | | Toxin results | | Culture | Toxin gene (ToxinB/ToxinA) |
|------------|-------------------------------|---------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------|----------------------------|
| | | | CHEK COMPLETE | QUICK CHASER | CHEK COMPLETE | QUICK CHASER | | |
| 1 | -80 | 5 | - | - | - | - | ND | ND |
| 2 | -80 | 6 | - | - | - | - | ND | ND |
| 3 | -80 | 7 | - | - | - | - | ND | ND |
| 4 | -80 | 7 | - | - | - | - | ND | ND |
| 5 | -80 | 5 | - | - | - | - | ND | ND |
| 6 | -80 | 6 | + | + | + | - | + | + / + |
| 7 | -80 | 7 | - | - | - | - | ND | ND |
| 8 | -80 | 5 | - | - | - | - | ND | ND |
| 9 | -80 | 6 | + | + | + | + | + | + / + |
| 10 | -80 | 7 | - | - | - | - | ND | ND |
| 11 | -80 | 5 | + | + | - | - | + | - / - |
| 12 | -80 | 6 | + | + | - | - | + | + / + |
| 13 | -80 | 5 | + | + | - | - | + | + / + |
| 14 | -80 | 5 | + | + | - | - | + | - / - |
| 15 | -80 | 6 | - | - | - | - | ND | ND |
| 16 | -80 | 6 | - | - | - | - | ND | ND |
| 17 | -80 | 7 | - | - | - | - | ND | ND |
| 18 | -80 | 6 | - | - | - | - | ND | ND |
| 19 | -80 | 5 | + | + | - | - | + | + / + |
| 20 | -80 | 7 | - | - | - | - | ND | ND |
| 21 | -80 | 6 | + | + | + | - | + | + / + |
| 22 | -80 | 6 | - | - | - | - | ND | ND |
| 23 | -80 | 6 | - | - | - | - | ND | ND |
| 24 | -80 | 5 | - | - | - | - | ND | ND |
| 25 | -80 | 5 | + | - | - | - | + | + / + |
| 26 | -80 | 6 | - | - | - | - | ND | ND |
| 27 | -80 | 6 | - | - | - | - | ND | ND |
| 28 | -80 | 5 | + | + | + | - | + | + / - |
| 29 | -80 | 5 | - | - | - | - | ND | ND |
| 30 | -80 | 6 | + | + | - | - | + | - / - |
| 31 | -80 | 6 | + | + | + | + | + | + / + |
| 32 | 4 | 5 | + | + | + | + | + | + / + |
| 33 | 4 | 6 | + | - | - | - | + | + / + |
| 34 | 4 | 5 | + | + | - | - | + | + / + |
| 35 | 4 | 5 | + | + | - | - | + | + / + |
| 36 | 4 | 7 | + | + | - | - | + | + / + |
| 37 | 4 | 6 | + | + | + | + | + | + / + |
| 38 | 4 | 5 | + | + | - | - | + | - / - |
| 39 | 4 | 5 | + | - | - | - | - | - * / ND |
| 40 | 4 | 5 | - | - | - | - | ND | ND |
| 41 | 4 | 7 | - | - | - | - | ND | ND |
| 42 | 4 | 6 | - | - | - | - | ND | ND |
| 43 | 4 | 6 | - | - | - | - | ND | ND |
| 44 | 4 | 6 | - | - | - | - | ND | ND |
| 45 | 4 | 7 | - | - | - | - | ND | ND |
| 46 | 4 | 6 | - | - | - | - | ND | ND |

補足) ※ Result of Gene Xpert assay

ND : No data available

■ : Specimens with divergent results

EIA 法での検査結果に基づき、必要に応じて NAAT 法または TC 法で検査を行うとする 3 ステップアルゴリズム³⁾において、EIA 法の GDH 検出感度は非常に重要であり、EIA 法

で GDH を検出できなければ、CDI を見逃すことに繋がる。我々の研究では、EIA 法陰性検体の培養を行わなかったため、培養法と比較した GDH の検出感度は示せないが、CHEK

Table 6. Comparative results of GDH detectability using patient fecal samples

| Material | <i>C. difficile</i> | | Sensitivity (%) | Specificity (%) | PPV (%) | NPV (%) |
|---------------|---------------------|----------|-----------------|-----------------|---------|---------|
| | Positive | Negative | | | | |
| CHEK COMPLETE | Positive | 19 | 100.0 | 96.3 | 95.0 | 100.0 |
| | Negative | 0 | | | | |
| QUICK CHASER | Positive | 17 | 89.5 | 100.0 | 100.0 | 93.1 |
| | Negative | 2 | | | | |

補足) PPV : Positive predictive value

NPV : Negative predictive value

Table 7. Comparative results of Toxin detectability using patient fecal samples

| Material | | ToxinB Gene | <i>C. difficile</i> or ToxinB Gene | Sensitivity (%) | Specificity (%) | PPV (%) | NPV (%) |
|---------------|----------|-------------|------------------------------------|-----------------|-----------------|---------|---------|
| | | Positive | Negative | | | | |
| CHEK COMPLETE | Positive | 7 | 0 | 46.7 | 100.0 | 100.0 | 79.5 |
| | Negative | 8 | 31 | | | | |
| QUICK CHASER | Positive | 4 | 0 | 26.7 | 100.0 | 100.0 | 73.8 |
| | Negative | 11 | 31 | | | | |

補足) PPV : Positive predictive value

NPV : Negative predictive value

COMPLETE が高感度であることはすでに評価されており、検出感度は 90.2%-95.7% であるとされる^{10)~12)}。一方、QUICK CHASER は、培養法と比較した検出感度の報告がなく、CHEK COMPLETE で報告されている検出感度より低い可能性が示唆された。

また、Toxin の検出についても臨床分離株、臨床検体のいずれの比較でも CHEK COMPLETE が優れた結果を示した。添付文書上の ToxinA・B 検出感度は、CHEK COMPLETE ToxinA : 0.63 ng/mL, ToxinB : 0.16 ng/mL, QUICK CHASER ToxinA 0.67 ng/mL, ToxinB : 0.50 ng/mL となっている。今回、Toxin A (-) B (+) のリボタイプ 369 型で検出能に顕著な差が表れた要因が、この ToxinB の検出感度の違いによるものと考えられる。臨床検体での検出能においても、CHEK COMPLETE でのみ検出可能であった Toxin A (-) B (+) 検体が 1 件あり、ToxinB の検出感度が CHEK COMPLETE で優れるという添付文書上の内容を裏付ける結果となった。*C. difficile* のリボタイプ型別の分布には地域的な特徴があり、海外ではリボタイプ 017, 019, 023, 027, 033, 078 型などがみられる⁵⁾。一方で、日本におけるリボタイプの分離頻度は、018/018⁺ 型が最も多く (29%)、次いで 014 型 (23%)、002 型 (12%)、369 型 (11%) である¹³⁾。このように国内の臨床からは今回検討に使用した 018/018⁺ 型、014 型、369 型が一定の割合で検出されるため、国内で検出される頻度の高いリボタイプ株の検出性能も試薬の選定において重要であると考えられる。今回、リボタイプの型別のみで GDH の検出能に差はみられなかったが、Toxin 検出能はリボタイプにより異なる結果となり、018/018⁺ 型では両試薬ともに McF2.0 まで検出できたが、リボタイプ 014 型では McF3.0 または McF2.0 で検出できない株が存在した。また、369 型は QUICK CHASER において McF4.0 でも検出できな

い株が存在した。EIA 法における Toxin の検出感度は、地域のリボタイプの分布状況に影響をうける可能性があると考えられている。今回の検討に使用したリボタイプ 014 型は、EIA 法で低い感度のリボタイプ型のひとつとする報告があり¹⁴⁾¹⁵⁾、今回の我々の研究でも 014 型の株での検出能が低かった。in vitro の研究では、*C. difficile* の毒素産生量はリボタイプごとに異なり、また同一のリボタイプでも菌株により産生量は異なると報告されている^{16)~18)}。このような毒素産生量の違いにより、本研究においても、リボタイプや菌株による Toxin の検出限界に差が見られたと考える。また、毒素産生量は、培養条件や培地のアミノ酸組成、グルコース濃度に影響をうけるとされる¹⁹⁾²⁰⁾。腸管感染症検査ガイドラインでは、EIA 法で GDH 陽性、Toxin 陰性の場合に実施する TC 法の操作として、選択培地で 48 時間培養して発育したコロニーを McF4.0 に菌液調整して実施することを推奨しており³⁾、CHEK COMPLETE を使用した研究において、選択培地を使用して TC 法を実施することで、検出感度が向上するといった報告もある²¹⁾。QUICK CHASER において McF4.0 で検出できなかった株が存在した点は注意が必要であるが、本研究では非選択培地に発育した菌株を使用したため、McF4.0 で検出できなかった株についても、選択培地からのコロニーを用いることで検出できた可能性があると考えられる。原らの報告による本邦の CHEK COMPLETE を使用しての TC 法と PCR 法の一致率は 100% であり²²⁾、今回の我々の研究でも、CHEK COMPLETE において McF4.0 で Toxin を検出できなかった株はなく、TC 法においても十分な検出性能であると考えた。その一方で、QUICK CHASER を使用しての TC 法を評価した報告はないため、今後、QUICK CHASER で TC 法を行う場合は、リボタイプ 369 型や 014 型を含めた菌株を使用して評価する必要があると考える。

本研究にはいくつかのLimitationがある。第一に、分離菌株8株と臨床検体46検体を用いての研究であったため、リボタイプごとの検出能や臨床検体での検出感度・特異度の傾向はつかめたものの、評価するためには菌株や検体数を増やしての研究が必要である。また、菌株を用いての評価で、非選択培地を使用した点について、腸管感染症検査法ガイドラインの推奨とは異なる操作方法であったため、TC法での使用については、選択培地を用いて研究をする必要がある。

結語として、本研究において、CHEK COMPLETEは試薬コストが保険点数を上回るという問題点があるが、3ステップアルゴリズム法における検証が十分にされている試薬であり、今回の検討においてもその性能は十分であることが確認された。一方で、QUICK CHASERは1step15分と操作性は簡便であるが、CHEK COMPLETEより検出感度が低い可能性があり、また、TC法で使用する場合は、リボタイプにより検出しにくい株が存在することを考慮する必要があると考える。

謝辞：本試験で使用した、PCRリボタイプと*slpA* sequence typeが特定された菌株DNA溶液を提供してくださいました、国立感染症研究所薬剤耐性研究センター 加藤はる先生に厚く御礼申し上げます。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- Nasiri, M.J., M. Goudarzi, B. Hajikhani, et al. 2018. *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea: A systematic review and meta-analysis. *Anaerobe* 50: 32-37.
- Motamedi, H., M. Fathollahi, R. Abiri, et al. 2021. A worldwide systematic review and meta-analysis of bacteria related to antibiotic-associated diarrhea in hospitalized patients. *Plos one* 16 (12): e0260667.
- 館田一博. 2021. 腸管感染症の検査対象となる微生物と特定ポイント. p. 90-94, 17. 抗菌薬関連下痢症. 腸管感染症検査法ガイドライン (第2版).
- 加藤はる, 妹尾充敏. 2021. 日本の *Clostridioides difficile* 感染症の分子疫学. *日臨微誌* 31 (2): 66-74.
- 國島広之. 2018. *Clostridioides (Clostridium) difficile* 感染症診療ガイドライン, p. 13-14, p. 64-65.
- 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 (8): 2178-2182.
- Kato, H., H. Kita, T. Karasawa, et al. 2001. Colonisation and transmission of *Clostridium difficile* in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Med. Microbiol.* 50 (8): 720-727.
- Stubbs, S.L., J.S. Brazier, G.L. O'Neill, et al. 1999. PCR Targeted to the 16S-23S rRNA Gene Intergenic Spacer Region of *Clostridium difficile* and Construction of a Library Consisting of 116 Different PCR Ribotypes. *J. Clin. Microbiol.* 37 (2): 461-463.
- 医学通信社 2022. 第3部, 検査診療点数早見表 2022年4月版, p. 469.
- 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: 261-268.
- Yoo, I.Y., D.J. Song, H.J. 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 (2): 214-217.
- 西尾美津留, 宮木祐輝, 小川有里子, 他. 2018. *Clostridium difficile* Toxin および GDH 抗原同時検出試薬の検出性能に関する比較検討. *医学検査* 67 (4): 469-474.
- Kato, H., M. Senoh, H. Honda, T. Fukuda, et al. 2019. *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection burden in Japan: A multicenter prospective study. *Anaerobe* 60: 102011.
- Lee, Y., M. Kim, H. Kim, et al. 2014. Comparison of Sensitivity of Enzyme Immunoassays for Toxin A and B in different *C. difficile* PCR Ribotypes. *Annals of Clinical Biochemistry* 44 (1): 38-41.
- Rizzardi, K., T. Åkerlund, T. Norén, et al. 2020. Impact of ribotype on *Clostridioides difficile* diagnostics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 39: 847-853.
- Haslam, S.C., J.M. Ketley, T.J. Mitchell, et al. 1986. Growth of *Clostridium difficile* and production of toxins A and B in complex and defined media. *Journal of medical microbiology* 21 (4): 293-297.
- Karlsson, S., L.G. Burman, T. Åkerlund. 1999. Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI 10463 by amino acids. *Microbiology* 145 (7): 1683-1693.
- Carlson, P.E. Jr, S.T. Walk, A.E. Bourgis, et al. 2013. The relationship between phenotype, ribotype, and clinical disease in human *Clostridium difficile* isolates. *Anaerobe* 24: 109-116.
- Åkerlund, T., B. Svenungsson, A. Lagergren, et al. 2006. Correlation of disease severity with fecal toxin levels in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea and distribution of PCR ribotypes and toxin yields in vitro of corresponding isolates. *Journal of clinical microbiology* 44 (2): 353-358.
- Dupuy, B., A.L. Sonenshein. 1998. Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Molecular microbiology* 27 (1): 107-120.
- 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 (6): 680-685.
- 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 (3): 186-191.

Evaluation of the usefulness of reagents for detecting *Clostridioides difficile* Toxin in a 3-step algorithmic method

Mikiko Chiba, Asami Nakayama, Yuriko Miura, Makoto Katsumi, Yuko Abe, Shin-ichi Fujimaki, Toru Fujiwara
Department of Clinical Laboratory, Tohoku University Hospital

In order to evaluate the potential usefulness of 3-step algorithm-based *Clostridioides difficile* Toxin detection³⁾, we compared conventional reagent (C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE [CHEK COMPLETE]; Kozin Bio., Japan) with the newer reagent (Quick Chaser CD GDH/TOX [QUICK CHASER]; Mizuho Med., Japan). In the evaluation with stored strains, CHEK COMPLETE showed higher detection sensitivity for both GDH and Toxin than QUICK CHASER. However, the detection sensitivity for Toxin was affected by the ribotypes; CHEK COMPLETE and QUICK CHASER showed lower detection sensitivity against ribotypes 014 and 014/369, respectively. In the evaluation with patient stool samples, the sensitivity/specificity for CHEK COMPLETE and QUICK CHASER were 100.0%/96.3% and 89.5%/100.0% (GDH), 46.7%/100.0% and 26.7%/100.0% (Toxin), respectively. Based on our results, CHEK COMPLETE exhibits sufficient quality in 3-step algorithm-based *Clostridioides difficile* Toxin detection, while there remains a concern regarding the high cost of the reagent. On the other hand, QUICK CHASER is easy to use, requiring only 15 minutes per step, while showing lower detection sensitivity for GDH than CHEK COMPLETE. In addition, when QUICK CHASER is used by Toxigenic culture method³⁾, it would be necessary to aware that the approach could show lower detection sensitivity for some strains according to the ribotypes.