

полное соответствие отечественных питательных сред зарубежным аналогам и возможность их использования для селективного накопления, выделения, учёта *Enterobacteriaceae* из клинического материала и получения объективных результатов бактериологического контроля.

Результаты проведённых клинических испытаний учтены при проведении государственной регистрации в Росздравнадзоре РФ: на агар Мосселя и бульон Мосселя получены регистрационные удостоверения.

Обоснованное применение отечественных питательных сред позволит в полном объёме удовлетворить потребности клинической и санитарной микробиологии и отказаться от импортных поставок, не снижая при этом качества микробиологических исследований. Это обеспечит поддержание биобезопасности Российской Федерации на должном уровне и возможность дать адекватный ответ на возникающие вызовы и новые биологические угрозы [7].

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Алёшкин В.А. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(6): 63—5.
2. Шепелин А.П. Современное состояние и направления развития производства питательных сред в России. *Современная лабораторная диагностика*. 2015; 16(2): 18—20.
3. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Дятлов И.А. Питательные среды для выявления стафилококков в клинической и санитарной микробиологии. *Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение*. 2015; 56(4): 39—43.
4. *Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями*. МУ 04-723/3. М.: МЗ СССР; 1984.

5. Приказ Минздрава СССР № 535 *Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений*. 1985.
6. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. МУК 4.2.2316—08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
7. Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин А.П., Алёшкин В.А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; (8): 61—5.

#### REFERENCES

1. Shepelin A.P., Domotenko L.V., Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Aleshkin V.A. Current approaches to import substitution in the field of nutrient medium production. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(6): 63—5. (in Russian)
2. Shepelin A.P. Status and trends of development of nutrient medium production in Russia. *Sovremennaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 16(2): 18—20. (in Russian)
3. Shepelin A.P., Polosenko O.V., Marchikhina I.I., Sholokhova L.P., Dyatlov I.A. Nutrient media to identify staphylococci in clinical and sanitary microbiology. *Biopreparaty. Profilaktika. Diagnostika. Lechenie*. 2015; 4(56): 39—43. (in Russian)
4. Guidelines for microbiological diagnosis of enterobacteria-associated diseases [Metodicheskie ukazaniya po mikirobiologicheskoy diagnostike zabolevaniy, vyzyvayemykh enterobakteriyami]. МУ 04-723/3. Moscow: MH USSR, 1984. (in Russian)
5. The order of Ministry of Health USSR No. 535 On unification of microbiological (bacteriological) research methods being used by clinical diagnostic laboratories structured into medical-preventive institutions. 1985: 95. (in Russian)
6. *Methods to control bacteriological nutrient media. Methodical instructions [Metody kontrolya bakteriologicheskikh pitatel'nykh sred. Metodicheskie ukazaniya]*. МУК 4.2.2316—08. Moscow: Federal Center for Hygiene & Epidemiology, Rospotrebnadzor; 2008: 7. (in Russian)
7. Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Shepelin A.P., Aleshkin V.A. Status and trends of development of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and the problem of import substitution. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(8): 61—5. (in Russian)

Поступила 15.05.17

Принята к печати 25.05.17

© СУХИНА М.А., САФИН А.Л., 2017

УДК 616.34-008.311.4-022:579.852.13]-078

Сухина М.А., Сафин А.Л.

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*-АССОЦИИРОВАННЫХ ДИАРЕЙ; МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н. Рыжих» Минздрава РФ, 123423, Москва, Россия

*Clostridium difficile*-ассоциированная инфекция (CDI) — одна из основных причин нозокомиальной диареи. Сложность лабораторной диагностики ведёт к прогрессированию заболевания, вызывающему обширные воспалительные изменения в стенке толстой кишки, характеризующиеся поверхностным некрозом слизистой оболочки с образованием «псевдомембран», приводящих к формированию токсического мегаколона, перфорации кишечной стенки, перитониту, сепсису. Основная роль в постановке диагноза принадлежит индикации возбудителя и детекции его токсинов. Ни один лабораторный тест не может быть использован в качестве самостоятельного метода лабораторной диагностики CDI. Многоэтапная диагностика может стать адекватной стратегией для быстрого и полного выявления антибиотикоассоциированных диарей.

Ключевые слова: *Clostridium difficile*; *Clostridium difficile*-ассоциированная инфекция; глутаматдегидрогеназа; ПЦР риботина NAP/BI/027; токсигенные штаммы; токсин А; токсин В; бинарный токсин; антибиотикоассоциированная диарея.

Для корреспонденции: Сухина Марина Алексеевна, канд. биол. наук, рук. отд. микробиологических и иммунологических исследований; e-mail: marinamari272015@gmail.com

**Для цитирования:** Сухина М.А., Сафин А.Л. Современное состояние лабораторной диагностики *Clostridium difficile*-ассоциированных диарей; методы детекции токсигенных штаммов *Clostridium difficile* (Обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(10): 635-640. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-635-640>

Sukhina M.A., Safin A.L.

THE ACTUAL CONDITION OF LABORATORY DIAGNOSTIC OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE-ASSOCIATED DIARRHEA; THE METHODS OF DETECTION OF TOXIGENIC STRAINS (REVIEW OF PUBLICATIONS)

The A.N. Ryjikh state research center of coloproctology of Minzdrav of Russia, 123423 Moscow, Russia

*The Clostridium difficile-associated infection (CDI) is one of the main causes of nosocomial diarrhea. The complicity of laboratory diagnostic results in progression of disease bringing on extensive inflammatory alterations in the wall of large intestine and characterizing by superficial necrosis of mucous membrane with development of "pseudo-membranes" resulting in development of toxic megacolon, perforation of intestinal wall, peritonitis and sepsis. The main role in diagnosing plays indication of agent and detection of its toxins. None of laboratory tests can be applied as an independent technique of laboratory diagnostic of CDI. The multi-step diagnostic can become an appropriate strategy for quick and full detection of antibiotic-associated diarrhea.*

**Key words:** *Clostridium difficile*; *Clostridium difficile*-associated infection; glutamatedehydrogenase; polymerase chain reaction; ribotype NAP1/BI/027; toxigenic strains; toxin A; toxin B; binary toxin; antibiotic-associated diarrhea

**For citation:** Sukhina M.A., Safin A.L. The actual condition of laboratory diagnostic of *Clostridium difficile*-associated diarrhea; the methods of detection of toxigenic strains (review of publications). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (10): 635-640. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-10-635-640>

**For correspondence:** Sukhina M.A., candidate of biological sciences, the head of the department microbiological and immunologic studies. e-mail: [marinamari272015@gmail.com](mailto:marinamari272015@gmail.com)

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 20.05.2017  
Accepted 30.05.2017

**Введение.** Заселение кишечника и пролиферация токсигенных штаммов *Clostridium difficile* — одна из основных причин нозокомиальной диареи. Встречаемость CDI и частота рецидивов инфекции, устойчивой к стандартной терапии, постоянно растёт [1, 2]. Во многих странах ведётся мониторинг распространённости CDI [3]. Рост заболеваемости CDI в Северной Америке и Европе с начала XXI века связывают с появлением высоковирулентного штамма риботипа NAP<sub>1</sub>/BI/027, который характеризуется усиленной продукцией токсинов А, В и бинарного токсина [4, 5]. Данные штаммы высоко вирулентны, что обуславливает большую смертность от CDI, вызванной данным риботипом. В 2013 г. в Великобритании умерло 3 тыс. человек, в США — 20 тыс. [6]. Лечение пациентов требует больших материальных затрат, на одного впервые заболевшего необходимо более 16 тыс. долларов, расходы на лечение рецидивирующей CDI составляют более 28 тыс. долларов [7, 8]. Ещё большие материальные затраты необходимы для организации мероприятий по предотвращению распространения токсигенной *C. difficile* в лечебных учреждениях. В США в 2006 г. такие расходы превысили 3,2 млрд долларов [9].

Ещё одна проблема CDI — высокая частота носительства токсигенных штаммов *C. difficile* среди здорового населения. Доля носителей составляет до 15% здоровых взрослых, 84% новорождённых, 57% пожилых людей в домах престарелых [10]. Распространение *C. difficile* обусловлено биологическими свойствами микроорганизма, которые защищают бактерию от повреждающего воздействия кислорода, температуры, химических и дезинфицирующих веществ [11—13], что затрудняет лабораторную диагностику CDI.

Разработаны несколько алгоритмов диагностики [14]. Двухэтапный, включающий детекцию глутаматадегидрогеназы (ГДГ) в качестве скрининга и детекцию экзотоксинов TcdA и TcdB серологическим методом, — наиболее распространённый, поддержан Американскими и Европейскими национальными клиническими рекомендациями [15, 16]. Данный подход не позволяет диагностировать CDI в случае наличия штамма риботипа NAP<sub>1</sub>/BI/027, продуцирующего бинарный токсин. Оценён трёхэтапный алгоритм лабораторной диагностики CDI, включающий детекцию ГДГ в образцах стула на 1-м этапе с использованием ИФА тест-систем и выделение кокультуры *C. difficile* из положительных образ-

цов просветных фекалий [17]. Такой алгоритм позволяет на 24,4% (37/156) чаще выявлять *C. difficile* в сравнении с одноэтапным определением токсинов А и В *C. difficile* в стуле, что ведёт к снижению распространённости CDI на 4,2% (с 11,4 до 15,6%) [12].

**Лабораторная диагностика CDI.** Лабораторная диагностика CDI проводится культуральным, серологическими, молекулярно-генетическими методами. Золотым стандартом диагностики остаётся культуральный метод — выделение чистой культуры и определение её цитотоксичности на культуре клеток.

Существует несколько лабораторных тестов для индикации токсигенных *C. difficile*. В большинстве случаев используются тесты для определения токсинов непосредственно в образцах просветных фекалий. В США рынок коммерческих тест-систем для выявления токсигенных *C. difficile* составляет более 10 млн долларов в год [18]. Методы лабораторной диагностики CDI, в которых оценивалась чувствительность, специфичность, время, затраченное на осуществление методики, представлены в таблице [18].

**Определение ГДГ *C. difficile* серологическим методом в образцах просветных фекалий.** ГДГ — фермент, преобразующий глутамат в  $\alpha$ -кетоглутарат. Он имеется у многих эукариот и прокариот, включая ряд видов рода *Clostridium*, в том числе *C. difficile*. ГДГ кодируется геном *Glud* и присутствует у всех штаммов *C. difficile* вне зависимости от выработки токсинов. ГДГ обладает высокой чувствительностью для диагностики CDI и имеет прогностическую ценность. Недостаток этого исследования — наличие ГДГ у других представителей рода *Clostridium* (например, *C. sordellii*), что снижает специфичность метода и обуславливает перекрестное реагирование [19, 20].

Проведена оценка диагностической точности обнаружения ГДГ при диагностике CDI [21] на основании 42 источников, включающих 3055 положительных и 2618 отрицательных сравнений (DOR 115; 95% ДИ: 77—172, I2 = 12%). Установлено, что детекция ГДГ обеспечивает быстрое отсеивание отрицательных результатов, при этом себестоимость теста, особенно по сравнению с молекулярными методами диагностики, низка [21].

Для детекции ГДГ в фекалиях ранее использовалась латекс-агглютинация (РАЛ), основанная на определении

токсина А *C. difficile* в просветных фекалиях за счёт связывания со специфическими антителами, фиксированными на частицах латекса. РАЛ обладала рядом достоинств: низкой стоимостью, простотой, быстротой исполнения (результаты можно оценить через 30 мин). Несмотря на преимущества, РАЛ имеет низкую чувствительность и специфичность. Сейчас РАЛ вытеснили количественные серологические тесты. В лабораторной практике используется иммуноферментный (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА). Результаты ИХА могут быть оценены через 15—20 мин, с заявленной чувствительностью 93% и специфичностью — 75% [22]. Преимуществом ИФА в отличие от РАЛ является более высокая специфичность за счёт количественной оценки с использованием стандарта. Широкое распространение получили автоматические ИФА-анализаторы, которые нивелируют человеческий фактор при интерпретации результатов, имеются доступные коммерческие ИФА-тест-системы низкой стоимости. Различные модификации ИФА позволяют одновременно выявить токсины А и В в просветных фекалиях. По данным сравнительного исследования, чувствительность ИФА составляет 66%, специфичность — 93—96% [22].

Проведены сравнения нескольких методов диагностики: ИФА — определение ГДГ (*C. DIFFSNEK-60TM*, TechLab Inc.; США), токсинов А и В (*C. diff tox A + B*; Diagnostic Auto Inc.; США), полимеразной цепной реакции (ПЦР) (*GeneXpert C. difficile*; Cepheid, США) [19]. В качестве скринингового теста для индикации *C. difficile* предлагается использовать определение ГДГ, что может предотвратить ложноотрицательные результаты и повысить точность диагностики CDI [19]. Детекция ГДГ в образцах просветных фекалий не позволяет судить о способности *C. difficile* продуцировать токсины и вызывать заболевание. Дальнейший диагностический алгоритм предполагает определение токсинов А и В в стуле больных доступными методами: 1) ИФА, ИХА; 2) выделение чистой культуры *C. difficile*, с определением её токсигенности (ПЦР), что имеет высокую прогностическую ценность [21].

**Определение токсинов *C. difficile* в образцах просветных фекалий.** Одним из значимых результатов исследований последних 30 лет стало с открытием нового возбудителя CDI — гипервирулентного фторхинолонрезистентного штамма

*C. difficile* риботипа NAP<sub>1</sub>/BI/027. С продукцией 3 токсинов связывают патогенность *C. difficile*.

Токсин А (TcdA) с молекулярной массой 308 кД — энтеротоксин. Воздействуя на кишечный эпителий, он вызывает секрецию жидкости, воспаление и некроз слизистой оболочки. Механизм токсина В, молекулярная масса которого составляет 269 кД, обусловлен цитотоксическим действием, вызывающим гибель энтероцитов [23]. *C. difficile* риботипа NAP<sub>1</sub>/BI/027 содержит дополнительный фактор вирулентности, она способна синтезировать бинарный токсин, который образует на поверхности энтероцита комплекс, состоящий из АДФ-рибозил-трансферазы и рецептора, проникающего в клетку путём рецептор-опосредованного эндоцитоза и эндосомального обмена. В цитоплазме этот комплекс нарушает нормальные клеточные функции посредством АДФ-рибозилирования глобулярного актина, что вызывает дезорганизацию цитоскелета и ведёт к гибели клетки [23]. Бинарный токсин улучшает адгезию и увеличивает способность к колонизации *C. difficile*, индуцируя синтез микротрубочек в основании клеточных выступов [23]. ИФА-детекция токсинов — более быстрая и менее трудоёмкая, но имеют низкую чувствительность (52—90%) и специфичность (75%) [24—26] по сравнению с культуральным методом. Коммерческие ИФА тест-системы позволяют детектировать один из токсинов либо одновременно оба токсина. Предпочтение следует отдавать тест-системам, которые позволяют определять оба токсина в просветных фекалиях одновременно. Это обусловлено тем, что некоторые штаммы возбудителя (в частности, относящиеся к серогруппе F) продуцируют только токсин В [18]. Встречаются штаммы *C. difficile*, вызывающие развитие заболевания, продуцирующие токсин А, который не обнаруживается серологическим методом. Такие штаммы имеют мутацию гена *tcdA* в 139-й позиции [30—32].

Преимущества ИФА заключаются в невысокой себестоимости и достоверности получаемых результатов [24].

Для увеличения чувствительности с сохранением скорости тестирования в 2008 г. разработан 2-этапный алгоритм лабораторной диагностики [6, 27, 28]. Данный алгоритм имеет ограничение — невозможность определить чувствительность возбудителя к антибактериальным препаратам.

#### Методы лабораторной диагностики CDI [18]

Метод исследования	Цель исследования	Чувствительность, %	Специфичность, %	Время, необходимое для выполнения исследования	Примечание
Культуральный	Выделение токсигенной культуры	89—100	84—99	48—72 ч	Высокая чувствительность и специфичность, возможность изучения резистентности к антибактериальным препаратам. Трудность культивирования, необходимость использования специального оборудования
Исследование на культуре клеток, ЦПД	Токсин В	67—100	85—100	28—48 ч	Рекомендуется использовать в сочетании с культуральным методом. Возможно количественное определение путём титрования проб. (L.R. Peterson и соавт., 1988)
Реакция нейтрализации токсина (на культуре фибробластов)	Токсин В	—	—	28—48 ч	Хорошая чувствительность и специфичность. Использовать целесообразно в сочетании с цитопатогенным тестом
РАЛ	ГДГ	58—92	80—96	30 мин	Низкая чувствительность и специфичность. Можно использовать только для экспресс-диагностики
ИФА	ГДГ, токсины А/В	63—99	75—100	2—4 ч	Можно использовать как скрининговый тест. Для окончательной диагностики может потребоваться 2—3-кратное исследование
ИХА	ГДГ, токсины А/В	—	—	15 мин	Можно использовать как скрининговый тест. Для окончательной диагностики может потребоваться 2—3-кратное исследование
ПЦР	Ген кодирующий токсин А, В, бинарный токсин	—	—	2—4 ч	Хорошая чувствительность и специфичность, возможно определение бинарного токсина

Методы, направленные на детекцию ГДГ, токсинов А, В, бинарного токсина — быстрые, но не позволяют определить чувствительность возбудителя к антибиотикам.

**Выделение токсигенной культуры *Clostridium difficile*.** Выделение *C. difficile* из образцов просветных фекалий с последующим её типированием по способности продуцировать токсины и определением чувствительности к антибактериальным препаратам остается золотым стандартом диагностики CDI.

*Clostridium difficile* — грамположительная спорообразующая палочка. По типу дыхания — облигатный анаэроб. Впервые культуру *C. difficile* выделили I.C. Hall и E. O'Toole в 1935 г. [29] из фекалий здоровых новорождённых. В 1977 г. J. Bartlett [30] связал наличие этого возбудителя с возникновением колита, развившегося после терапии клиндамицином. Изначально микроорганизм назван *Bacillus difficilis* из-за характерной морфологии и трудности культивирования.

Для выделения *C. difficile* используется селективная среда CCFA (Cycloserine Co-foxotin Fructose Agar), предложенная в 1979 г. W. George и соавт. [31], содержащая цефокситин, циклосерин, фруктозу. Эта питательная среда получила широкое распространение, в том числе в России, так как отвечает пищевым потребностям *C. difficile*. Проведение предварительной пробоподготовки перед посевом на питательную среду, такое как прогревание проб фекалий при 70°C в течение 10 мин или обработка пробы абсолютным спиртом 1 ч, обеспечивает образование плоских, округлой или неправильной формы, с неровным или ризонидным краем, матовых, диаметром 2—4 мм, бело-жёлтых колоний *C. difficile* через 24—48 ч инкубации в бескислородной атмосфере. Рост *C. difficile* сопровождается появлением характерного запаха, подобного запаху р-крезола или лошадиного помёта. Использование для выделения *C. difficile* других питательных сред, например агара с циклосерином и маннитолом, кровяного агара с циклосерином и маннитолом, не имеет преимуществ перед средой CCFA. Различные добавки к среде CCFA стимулируют рост *C. difficile* [31, 32].

Поскольку выделение культуры *C. difficile* не означает её способность вызывать заболевание, у клинических изолятов необходимо определять токсигенность *in vitro*. Для этого отбирают 4—6 колоний, которые культивируются в сердечно-мозговом бульоне в анаэробных условиях при температуре 35—37°C в течении 24 ч. В фильтратах суточной бульонной культуры выявляют наличие экзотоксина. Для этого определяют наличие цитопатического действия (ЦПД) в культуре клеток, либо ген токсинов А, В, бинарного токсина методом ПЦР с использованием коммерческих тест-систем. Описаны культуры *C. difficile*, не проявляющие ЦПД в культуре клеток, но *in vitro* продуцирующие токсин, хотя титр токсина у них ниже, чем у штаммов, обладающих ЦПД в культуре клеток [24, 33]. Это объясняет расхождение между клиническими и лабораторными результатами.

Недостаток культурального метода диагностики состоит в его трудоёмкости, необходимости специальных навыков работы с культурой и анаэробного оборудования. Выделение токсигенной культуры *C. difficile* возможно только в хорошо оснащённых лабораториях, имеющих высококвалифицированный персонал.

Чувствительность культурального метода диагностики CDI достигает 98% [24, 31], но исследование длится 2—3 сут. Актуальным остаётся поиск новых методов диагностики CDI, перспективные молекулярно-биологические методы исследования.

**Молекулярно-биологические методы диагностики CDI.** Молекулярно-биологические методы позволяют детектировать геном *C. difficile* и его репликацию. К таким методам относятся: 1) полимеразная цепная реакция (ПЦР) — типирование, данный метод получил распространение из-за своей доступности, эффективности, высокой специфичности (97%) и чувствительности (91%); 2) гель-электрофорез в пульсирующем поле; 3) мультилокусный анализ и определение мультилокусной последовательности [25]. ПЦР — пер-

спективный метод диагностики CDI. Для выявления токсигенных штаммов *C. difficile* используется амплификация специфических участков генома возбудителя, кодирующих токсин А и/или В. Разработана методика, позволяющая амплифицировать специфический для *C. difficile* участок гена, кодирующий токсин А и не имеющий перекрестной реакции с участком ДНК токсигенных штаммов *C. sordellii* [34]. ПЦР позволяет определять способность *C. difficile* к токсинообразованию и синтезу других факторов патогенности, что важно для диагностики CDI [35, 36]. Существуют разные модификации ПЦР. Для повышения эффективности ПЦР предложен 2-этапный протокол [37], в котором использованы праймеры к участку 16S рибосомальной РНК *C. difficile* (Downstream primer: B CCGTCAATTCMTTTRAGTTT / Upstream primer: PG-48 CTCTTGAAACTGGGAGACTTGA), что позволило получить 100% чувствительность по сравнению с культуральным методом. Высокая чувствительность (95,5%) и специфичность (99%) показана в исследованиях с использованием тест-системы Becton Dickinson (BD) MaxCdiff на основе ПЦР для детекции токсигенных *C. difficile* [38]. Совпадение детекции *C. difficile* с помощью тест-системы BD MaxCdiff и выделение токсигенной культуры составило 98,5% [36]. Амплификация нуклеиновых кислот для детекции токсигенной *C. difficile* обладает высокой чувствительностью и специфичностью, но в России она не доступна для клинической лабораторной диагностики из-за отсутствия зарегистрированных Росздравнадзором тест-систем.

Рост резистентности к антибиотикам вызывает обеспокоенность клиницистов, фармакологов, микробиологов, так как появляется большое количество мультирезистентных штаммов бактерий, что ставит под угрозу способность лечить инфекции, повышает расходы на лечение и смертность. Широкое применение антибактериальных препаратов способствует селекции резистентных микроорганизмов и появлению бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Растущая популяция *C. difficile* синтезирует токсин-индуцирующий мессенджер, относящийся к группе тиолактона, который накапливается во внеклеточной среде, активируя 2-компонентную систему AgrC<sub>2</sub>A<sub>2</sub>, что повышает активность транскрипции генов, кодирующих токсины, и играет ключевую роль в развитии кластридиального колита. Новые тест-системы для диагностики CDI позволили раскрыть ряд механизмов передачи сигнала AgrC<sub>2</sub>A<sub>2</sub> [39].

Лабораторная диагностика CDI базируется на сочетании методов: детекция ГДГ и токсинов в стуле пациента серологическим методом, ПЦР-РВ, микроскопия, выделение токсигенной культуры. Эти методы показали хорошую производительность [40—42], но имеют ряд недостатков, таких как низкая чувствительность, специфичность, трудоёмкость, субъективность и т. д.

**Мультиплексные решения для диагностики CDI.** Развивается мультиплексный молекулярный анализ для индикации и идентификации патогенов, в том числе возбудителей антибиотикассоциированной диареи. Проведено сравнение 3 коммерческих мультиплексных панелей [FilmArray GI панель (BioFire Диагностика), Luminex xTag GI патоген панель (GPP) (Luminex Corporation, Канада), Nanosphere Verigene кишечно-патогенный тест (Nanosphere, Inc., Northbrook, IL)], одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) для индикации возбудителей желудочно-кишечных заболеваний (в том числе *C. difficile*) из клинических образцов фекалий [43]. Каждая из мультиплексных панелей для диагностики CDI утверждена в качестве дополнительного средства диагностики, использование этих тестов при скрининге бессимптомных пациентов не утверждено и требует дальнейшего изучения [44]. Учитывая сложность диагностики и необходимость индикации вирулентных штаммов *C. difficile*, продуцирующих не только токсины А и

В, но и бинарный токсин, целесообразно использовать тест-систему Verigene CDF Test, позволяющую протестировать 1 образец за 2,5 ч и определить наличие *C. difficile*, токсинов А и В, штаммов риботипа NAP<sub>1</sub>/BI/027, продуцирующих бинарный токсин, не детектируемый серологическим методом. Используются микрочип нуклеиновой кислоты, который обнаруживает *C. difficile* токсины А и В в неоформленных образцах стула и может адекватно идентифицировать риботип NAP<sub>1</sub>/BI/027. Применение мультиплексных панелей увеличивает скорость и количество определяемых патогенов [43].

Проблемы, связанные с интерпретацией результатов, полученных с помощью мультиплексных панелей, не позволяют использовать их для скрининговых исследований. Разработка и внедрение высокоэффективных мультиплексированных молекулярных панелей позволит клиническим лабораториям быстро и правильно диагностировать CDI [41, 45—47].

**Выявление *Clostridium difficile* на основании определения летучих органических соединений.** Один из методов диагностики CDI — определение летучих органических соединений в стуле больного. Летучие органические соединения (ЛОС) — конечные продукты жизнедеятельности микроорганизмов, которые могут быть использованы для диагностики заболевания [48, 49]. Проведены исследования, в которых запах стула пациентов, имеющих CDI, различали медицинские работники, ухаживающие за этими больными. Сотрудники в состоянии различить CDI стул с чувствительностью 55% и специфичностью 83%, с отрицательной прогностической ценностью 92%. Средний медицинский персонал правильно определил *C. difficile* в 31 из 37 случаев, с чувствительностью 84% и специфичностью 77% [50, 51]. Исследование собачьего обоняния показало 83% чувствительность и 98% специфичность идентификации *C. difficile* [52]. Для быстрой идентификации ЛОС профиля, связанного с *C. difficile*, *Campylobacter jejuni* и ротавирусами, использована газожидкостная масс-спектрометрия (GC-MS) [53]. В просветных фекалиях, ассоциированных с *C. difficile*, обнаружены продукты брожения фруктозы и производных фуранозы. В 2007 г. GC-MS применена для идентификации ЛОС в кале, полученном от пациентов с язвенным колитом и больных CDI [54]. В 2014 г. использован «электронный нос» для газовой хроматографии, результаты, обработанные искусственными нейронными сетями, применены для распознавания образцов, позволявших различать *C. difficile*-положительный и -отрицательный стул с 85% чувствительностью и 80% специфичностью [49].

Несмотря на обнадеживающие результаты, демонстрирующие высокую чувствительность и специфичность, использование 2-фтор-4-метилфенола как одного маркера для диагностики CDI нецелесообразно. Имеются более быстрые и доступные методы выявления токсигенной *C. difficile*.

**Заключение.** В мире отмечается экспоненциальный рост заболеваемости клостридиальной инфекцией [6]. Неразрешимой проблемой остаётся отсутствие единого подхода к лабораторной диагностике CDI.

Чаще всего используют ускоренные методы детекции токсинов А и В *C. difficile* в просветных фекалиях, такие как ИХА и ИФА. Бинарный токсин возможно обнаружить только с помощью ПЦР. Длительная диагностика CDI обуславливает несвоевременное проведение профилактических и противозидемических мероприятий, что создаёт предпосылки к персистенции возбудителя и его широкому распространению как в пределах одного отделения, так и в рамках всего лечебного учреждения. Исследования, направленные на разработку оптимального диагностического алгоритма клостридиальной инфекции, чрезвычайно актуальны и позволяют применять персонализированный подход в лечении CDI.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА (pp. 3—17, 19—31, 33—54 см. REFERENCES)

1. Skříčka T., Hemmelová B., Mitáš L.K. Z. (Перевод с английского: Пикунов Д.Ю.). Клостридиальный колит — важная проблема в хирургии. *Колопроктология* 2014; 4(50): 17—23.
2. Шельгин Ю.А., Абдулганиева Д.И., Абдулхаков Р.А., Алексеева О.П., Ачкасов С.И., Барановский А.Ю. и др. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению взрослых больных язвенным колитом. *Российский журнал гастроэнтерологии гепатологии и колопроктологии*. 2015; 25(1): 48—65.
3. Лобзин Ю.В., Захаренко С.М., Иванов Г.А. Современные представления об инфекции *Clostridium difficile*. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2002; 4: 200—32.
4. Кветная А.С., Макриди П.С., Бехтерева М.К. Современное состояние лабораторной диагностики *Clostridium difficile*-ассоциированной инфекции. *Журнал Инфектологии*. 2013; 5: 5—12.

## REFERENCES

1. Skříčka T., Hemmelová B., Mitáš L.K. Z. (Translation from English: Pikunov D.Y.). Clostridial colitis is an important problem in surgery. *Koloproktologiya* 2014; 4(50): 17—23. (in Russian)
2. Shelygin Y.A., Abdulganieva D.I., Abdulkhakov R.A., Alekseeva O.P., Achkasov S.I., Baranowski A.Y. et al. Recommendations of the Russian Gastroenterological Association and Association of Coloproctologists of Russia for the diagnosis and treatment of adults with ulcerative colitis. *Rossiiskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii i koloproktologii*. 2015; 25(1): 48—65. (in Russian)
3. Cole S.A., Stahl T.J. Persistent and Recurrent *Clostridium difficile* Colitis. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2015; 28: 65—9.
4. Killgore G., A.T., Johnson S., Brazier J., Kuijper E., Pepin J., Frost E.H., Savelkoul P., Nicholson B., van den Berg R.J., Kato H., Sambol S.P., Zuckowski W., Wood C., Limbago B., Gerdin D.N. and MLC. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: Restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat an. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46: 431—7.
5. Hunt J.J., Ballard J.D. Variations in virulence and molecular biology among emerging strains of *Clostridium difficile*. *Microbiology and molecular biology Reviews*. 2013; 77: 567—81.
6. Tschudin-Sutter S., Braissant O., Erb S., Stranden A., Bonkat G., Frei R. et al. Growth Patterns of *Clostridium difficile* — Correlations with Strains, Binary Toxin and Disease Severity: A Prospective Cohort Study. *PLoS One*. 2016; 11: 1—10.
7. Drozd E.M., Inocencio T.J., Braithwaite S., Jagun D., Shah H., Quon N.C. et al. Mortality, Hospital Costs, Payments, and Readmissions Associated With *Clostridium difficile* Infection Among Medicare Beneficiaries. *Infectious Diseases in Clinical Practice (Baltimore, Md.)*. 2015; 23: 318—23.
8. Rodrigues R., Barber G.E., Ananthkrishnan A.N. A Comprehensive Study of Costs Associated With Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2017; 7: 38: 196—202.
9. Judith A., Brien, Lahue B.J., Caro J.J., Davidson D.M., Hogenauer C., Hammer H.F. et al. The emerging infectious challenge of *clostridium difficile*-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2007; 28: 1219—27.
10. Surawicz C.M., Brandt L.J., Binion D.G., Ananthkrishnan A.N., Curry S.R., Gilligan P.H. et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *The American Journal of Gastroenterology*. 2013; 108: 478—98; quiz 499.
11. Na X., Martin A.J., Sethi S., Kyne L., Garey K.W., Flores S.W. et al. A multi-center prospective derivation and validation of a clinical prediction tool for severe *Clostridium difficile* infection. *PLoS One* 2015; 10.
12. Kurti Z., Lovasz B.D., Mandel M.D., Csima Z., Golovics P.A., Csako B.D. et al. Burden of *Clostridium difficile* infection between 2010 and 2013: Trends and outcomes from an academic center in Eastern Europe. *World Journal Gastroenterology*. 2015; 21: 6728—35.
13. Kazanowski M., Smolarek S., Kinnarney F., Grzebieniak Z. *Clostridium difficile*: Epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities — A systematic review. *Techniques in Coloproctology*. 2014; 18: 223—32.
14. Benedek O., Podbielski A., Warnke P. Laboratory experience with the liaison analyzer in the diagnosis of *Clostridium difficile* — associated diarrhea. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2016; 6: 215—8.
15. Cohen S.H., Gerding D.N., Johnson S., Kelly C.P., Loo V.G.,

- McDonald L.C. 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). *Infection control and hospital epidemiology*. 2010; 31: 431—55.
16. Goret J., Blanchi J., Eckert C., Lacombe S., Petit A., Barbut F. et al. Comparison of a novel chemiluminescent based algorithm to three algorithmic approaches for the laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection. *Gut Pathogens*. 2015; 7: 33.
17. Wright Donna FR. Largest Ever European Clinician Consensus Report on Clostridium Difficile Infection Provides Recommendations for Improved Management of CDI / Pressemittteilung Astellas EMEA 2014.
18. Lobzin Y.V., Zakharenko S.M., Ivanov G.A. Modern ideas about the infection of Clostridium difficile. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2002; 4: 200—32. (in Russian)
19. Yoldas O., Altindis M., Cufali D., Asik G., Kesli R. A Diagnostic Algorithm for the Detection of Clostridium difficile-Associated Diarrhea. *Balkan Medical Journal*. 2016; 33: 80—6.
20. Girinathan B.P., Braun S., Sirigreddy A.R., Lopez J.E., Govind R. Importance of glutamate dehydrogenase (GDH) in Clostridium difficile colonization in vivo. *PLoS One* 2016; 11: 1—18.
21. Arimoto J., Horita N., Kato S., Fuyuki A., Higurashi T., Ohkubo H. et al. Diagnostic test accuracy of glutamate dehydrogenase for Clostridium difficile: Systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2016; 6: 29754.
22. Vanpoucke H., Baere T.D., Claeys G. Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of Clostridium difficile toxin and/or antigen in stool specimens. *Clinical Microbiology and Infection*. 2001; 2: 55—64.
23. Awad M.M., Johanesen P.A., Carter G.P., Rose E., Awad M.M., Johanesen P.A. et al. Clostridium difficile virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen Clostridium difficile virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes*. 2014; 5: 579—93.
24. Turgeon D.K., Novicki T.J., Quick J., Carlson L., Miller P., Ulness B. et al. Six Rapid Tests for Direct Detection of Clostridium difficile and Its Toxins in Fecal Samples Compared with the Fibroblast Cytotoxicity Assay. *Journal Clinical Microbiology*. 2003; 41: 667—70.
25. Le R., Wallet G.F. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile infection. *Ann. Biol. Clin. Synthèse Ann. Biol. Clin.* 2013; 71: 395—400.
26. Ticehurst J.R., Aird D.Z., Dam L.M., Borek A.P., Hargrove J.T., Carroll K.C. Effective detection of toxigenic Clostridium difficile by a two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin. *Journal Clinical Microbiology*. 2006; 44: 1145—9.
27. Fenner L., Widmer A.F., Goy G., Rudin S., Frei R. Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of Clostridium difficile. *Journal Clinical Microbiology*. 2008; 46: 328—30.
28. Burnham C.-A.D., Carroll K.C. Diagnosis of Clostridium difficile infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013; 26: 604—30.
29. Hall I., O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, Bacillus difficilis. *American Journal of Diseases*. 1935; 49(2): 390—402.
30. Bartlett J.G., Onderdonk A.B., Cisneros R.L., Kasper D.L. Clindamycin-Associated Colitis Due to a Toxin-Producing Species of Clostridium in Hamsters. *The Journal of Infectious Diseases*. 1977; 136: 701—5.
31. George W.L., Sutter V.L., Citron D., Finegold S.M. Selective and differential medium for isolation of Clostridium difficile. *Journal Clinical Microbiology*. 1979; 9: 214—9.
32. Kvetnaya A.S., Makridi P.S., Bekhtereva M.K. The current state of laboratory diagnosis of Clostridium difficile-associated infection. *Zhurnal Infektologii*. 2013; 5: 5—12. (in Russian)
33. Qa'Dan M., Ramsey M., Daniel J., Spyres L.M., Safiejko-Mroccka B., Ortiz-Leduc W. et al. Clostridium difficile toxin B activates dual caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in intoxicated cells. *Cellular Microbiology*. 2002; 4: 425—34.
34. O'Horo J.C., Jones A., Sternke M., Harper C., Safdar N. Molecular techniques for diagnosis of Clostridium difficile infection: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings*. 2012; 87: 643—51.
35. Kim H., Jeong S.H., Kim M., Lee Y., Lee K.. Detection of Clostridium difficile toxin A/B genes by multiplex real-time PCR for the diagnosis of C. difficile infection. *Journal of Medical Microbiology*. 2012; 61: 274—7.
36. Collins D., Elliott B., Riley T.V. Molecular methods for detecting and typing of Clostridium difficile. *Pathology*. 2015; 47: 211—8.
37. Kuhl S.J., Tang Y.J., Navarro L., Gumerlock P.H., Silva J. Diagnosis and Monitoring of Clostridium difficile Infections with the Polymerase Chain Reaction. *Clinical Infectious Diseases*. 1993; 16: 4: S234—S238.
38. Putsathit P., Morgan J., Bradford D., Engelhardt N., Riley T.V. Evaluation of the BD Max Cdiff assay for the detection of toxigenic Clostridium difficile in human stool specimens. *Pathology*. 2015; 47: 165—8.
39. Ciaran P., Kelly M.D., Thomas J., La Mont M.D. Clostridium difficile —associated diarrhea and colitis. *The New England Journal of Medicine*. 2008; 1939—40.
40. Beckmann C., Heining U., Marti H., Hirsch H.H. Gastrointestinal pathogens detected by multiplex nucleic acid amplification testing in stools of pediatric patients and patients returning from the tropics. *Infection* 2014; 42: 961—70.
41. Vocale C., Rimoldi S.G., Pagani C., Grande R., Pedna F., Arghittu M. et al. Comparative evaluation of the new xTAG GPP multiplex assay in the laboratory diagnosis of acute gastroenteritis. Clinical assessment and potential application from a multicentre Italian study. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015; 34: e33—7. A
42. Mengelle C., Mansuy J.M., Prere M.F., Grouteau E., Claudet I., Kamar N. et al. Simultaneous detection of gastrointestinal pathogens with a multiplex Luminex-based molecular assay in stool samples from diarrhoeic patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013; 19: E458—65.
43. Binnicker M.J. Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection: Performance, result interpretation, and cost-effectiveness. *Journal Clinical Microbiology*. 2015; 53: 3723—8.
44. Spina A., Kerr K.G., Cormican M., Barbut F., Eigentler A., Zerva L. et al. Spectrum of enteropathogens detected by the FilmArray GI Panel in a multicentre study of community-acquired gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015; 21: 719—28.
45. Stockmann C., Rogatcheva M., Harrel B., Vaughn M., Crisp R., Poritz M. et al. How well does physician selection of microbiologic tests identify Clostridium difficile and other pathogens in paediatric diarrhoea? Insights using multiplex PCR-based detection. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015; 21: 179.e9—179.e15.
46. Spigaglia P., Mastrantonio P. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among Clostridium difficile clinical isolates. *Journal Clinical Microbiology*. 2002; 40: 3470—5.
47. Rand K.H., Tremblay E.E., Hoidal M., Fisher L.B., Grau K.R., Karst S.M. Multiplex gastrointestinal pathogen panels: Implications for infection control. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015; 82: 154—7.
48. Chan D.K., Leggett C.L., Wang K.K. Diagnosing gastrointestinal illnesses using fecal headspace volatile organic compounds. *World Journal Gastroenterology*. 2016; 22: 1639—49.
49. McGuire N.D., Ewen R.J., de Lacy Costello B., Garner C.E., Probert C.S.J., Vaughan K. et al. Towards point of care testing for C. difficile infection by volatile profiling, using the combination of a short multi-capillary gas chromatography column with metal oxide sensor detection. *Measurement Science and Technology*. 2014; 25: 65108.
50. Wilson A.D., Baietto M. Advances in electronic-nose technologies developed for biomedical applications. *Sensors*. 2011; 11: 1105—76.
51. Chan D.K., Leggett C.L., Wang K.K. Diagnosing gastrointestinal illnesses using fecal headspace volatile organic compounds. *World Journal Gastroenterology*. 2016; 28; 22: 1639—49.
52. Maurer M., McCulloch M., Willey A.M., Hirsch W., Dewey D. Detection of Bacteriuria by Canine Olfaction. *Open Forum Infectious Diseases*. 2016; 3: ofw051.
53. Bomers M.K., Menke F.P., Savage R.S., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., van Agtmael M.A., Covington J.A. et al. Rapid, accurate, and on-site detection of C. difficile in stool samples. *The American Journal of Gastroenterology*. 2015; 110: 588—94.
54. Garner C.E., Smith S., de Lacy Costello B., White P., Spencer R., Probert C.S.J. et al. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *The FASEB Journal*. 2007; 21: 1675—88.