

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ CLOSTRIDIUM DIFFICILE – АССОЦИИРОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ

А.С. Кветная, П.С. Макриди, М.К. Бехтерева

*Научно-исследовательский институт детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург*

### Modern Recent on the Laboratory Diagnosis of Clostridium Difficile-associated Infection

A.S. Kvetnaya, P.S. Makridi, M.K. Behtereva

Science Research Institute of Children's Infection of FMBA of Russia, Saint-Petersburg

**Резюме.** В обзоре представлены современные сведения о лабораторной диагностике *Clostridium difficile* – ассоциированной инфекции. Дана критическая оценка эффективности и специфичности современным методам диагностики: методам выделения и идентификации культур *Clostridium difficile* на основе изучения биохимических характеристик, использования тест-систем – API 20A и Rapid Ana II-тестов, определения белковых спектров с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Описаны способы выявления токсигенных штаммов *Clostridium difficile* на основе Дот-иммуноблоттинга, ПЦР и иммунохроматографии, а также методы индикации токсинов *Clostridium difficile* в пробах кала на основе определения цитотоксического действия токсинов на культуре ткани, реакции латекс-агглютинации, иммуноферментного и фермент-связанного флюоресцентного анализа.

**Ключевые слова:** *Clostridium difficile* – ассоциированная инфекция, токсины, методы лабораторной диагностики.

Распространенность *Clostridium difficile* – ассоциированной инфекции (Cld-АИ), постоянная тенденция к росту, биологические особенности *Clostridium difficile* (*C. difficile*) и уникальная способность возбудителя к развитию разнообразного по характеру течения инфекционного процесса объясняют интерес к интенсивному изучению различных аспектов этих заболеваний у детей и взрослых [1 – 7].

До недавнего времени считали, что два основных токсина А и В вызывают развитие диареи и колита: токсин А (TcdA) с молекулярным весом 308 кД и токсин В (TcdB) с молекулярным весом 269 кД. Оба токсина продуцируются возбудителем одновременно, действуют синергически и кодируются 19,6 кВ локусом патогенности PaLoc, отличающимся тем, что он содержит гены, кодирующие как положительные, так и отрицательные регуляторы экспрессии токсинов, а также холин, который способствует высвобождению токсинов. По патогенному действию TcdA относится к энтеротоксинам, TcdB – к цитотоксинам. TcdB лишен энтероток-

**Abstract.** In the review the current information on the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated infection. Made a critical assessment of the effectiveness and specificity of the modern methods of diagnosis: methods of isolation and identification of *Clostridium difficile* cultures by studying the biochemical characteristics, the use of test kits – API 20A and Rapid Ana II-tests, determination of protein spectra by means of MALDI-TOF mass spectrometry. Describes how to display toxigenic strains of *Clostridium difficile* based on Dot-immunoblotting, PCR, and immunochromatography, as well as methods for determining the toxin *Clostridium difficile* in stool samples by determining the cytotoxic effect of toxins on tissue culture, latex agglutination test, ELISA and enzyme-linked fluorescent assay.

**Key words:** *Clostridium difficile*, *Clostridium difficile* – associated disease, toxins, laboratory diagnostics.

сигенной активности, но в 10 раз более мощный по своему патогенному действию [5]. Пожалуй, самыми значимыми результатами исследований последних двух десятилетий являются исследования, связанные с открытием патогенетической и эпидемиологической значимости нового штамма возбудителя – гипервирулентного фторхинолонрезистентного штамма *C. difficile* PCR ribotype 027 North American pulsed-field type 1 (NAPI) (REA type B1, toxinotype III) [5, 8]. ПЦР-риботип 027 был впервые выделен в 1988 г. от 28-летней женщины с тяжелым псевдомембранозным колитом и до 2004 г. считался редко встречающимся ПЦР – рипотипом, так как обнаруживался только у 6% штаммов. К настоящему времени имеются сведения, что бинарный токсин выявляется почти у двух третей штаммов возбудителя. В течение последних двух десятилетий наблюдались крупные эпидемические вспышки Cld-АИ с существенным ростом летальности, охватывающие несколько стационаров, регистрируемые длительное время [3, 4, 6, 7, 9] и связанные с широким распространением нового

штамма возбудителя, продуцирующего бинарный токсин. Так, в 2004 г. в двенадцати стационарах Квебека и других городах Канады частота заболеваемости Cld-АИ составила 22,5 случая на 1000 госпитализированных больных с показателем летальности 6,9%. Уровень заболеваемости и смертности при Cld-АИ коррелировал с пожилым возрастом пациентов (более 60 лет). В США в период 1996–2003 гг. количество тяжелых случаев Cld-АИ в госпиталях увеличилось вдвое. Причем половина случаев с тяжелым течением были связаны с изолятами группы В1 и ПЭФ (PFGE) типа NAP1, продуцирующими бинарный токсин. В Канаде (в госпиталях Онтарио) с мая 2011 г. число случаев Cld-АИ, связанных со штаммом *S. difficile* PCR ribotype 027, также увеличилось вдвое. В течение 3 месяцев зарегистрирован 61 эпизод Cld-АИ, в том числе 31 случай с летальным исходом. Вспышки Cld-АИ, обусловленные новым штаммом *S. difficile* PCR ribotype 027, были зарегистрированы в Европе, в стационарах Англии, Нидерландах и Бельгии. Имеют место эпидемические вспышки, обусловленные другими «эпидемическими» риботипами возбудителя. Например, в трех стационарах Японии более половины случаев (44–65%) были обусловлены риботипом «smz» [10]. Генетически стабильные штаммы серогруппы С в течение 10 лет оказались ответственны за возникновение вспышек Cld-АИ в Бельгии, Франции и Бенине [11]. Становятся актуальными и вспышки Cld-АИ, связанные с неэпидемическими штаммами возбудителя [12]. Появились сообщения об увеличении числа случаев за пределами стационаров. Так, если к началу XXI в. доля внебольничных случаев в США составляла 27%, то к 2012 г. она достигла 41% [13]. Внебольничные случаи Cld-АИ среди населения исследователями не рассматриваются как внутригоспитальные в связи с тем, что нередко заболевания регистрируются среди лиц, до этого не получавших антибиотикотерапию.

Наряду с влиянием конкретных антибиотиков — клиндамицина и линкомицина, установлено значение карбапенемов и цефалоспоринов II–III поколения в развитии антибиотикоассоциированных диарей (ААД), обусловленных *S. difficile* [14–16]. При этом получены доказательства, свидетельствующие о значительной роли и других предрасполагающих факторов в развитии Cld-АИ. Так, по данным CDC (The Centers for Disease Control and Prevention), в 2010 г. в США 94% выявленных случаев Cld-АИ были зарегистрированы преимущественно у лиц пожилого возраста и связаны с оказанием медицинской помощи.

Интенсивное накопление новых знаний в области биологии *S. difficile*, эпидемиологии, патогенеза и характера клинического течения Cld-АИ у детей

и взрослых определили постоянный поиск и разработку методов лабораторной диагностики Cld-АИ.

На сегодняшний день самым простым и общедоступным методом, позволяющим обнаружить в мазках, окрашенных по Граму, клетки, морфологически схожие с микроорганизмами рода *Clostridium*, является рутинный метод световой микроскопии. Материалом для исследования могут быть: подозрительные на клостридии колонии, кал, отпечатки или биоптат слизистой оболочки толстой кишки, полученный при эндоскопическом исследовании или во время оперативного вмешательства [2]. Главным недостатком метода световой микроскопии является отсутствие специфичности, поскольку аналогичным образом окрашиваются все грам-положительные спорообразующие бациллы. Тем не менее, обнаружение в мазках, окрашенных по Граму, грам-положительных палочек со спорами, морфологически схожих с клостридиями, можно расценивать как «сигнальный» (ориентировочный) результат для дальнейшего проведения целенаправленной лабораторной диагностики на *S. difficile*.

Широко используемым методом лабораторной диагностики *S. difficile* — ассоциированной инфекции является культуральный метод — метод выделения возбудителя на искусственных питательных средах [2, 17]. В нашей стране для выделения анаэробов, в том числе и микроорганизмов из рода *Clostridium*, широко используется среда Вильсона — Блера (железосульфитный агар) [2, 17]. Однако среда Вильсона — Блера не может быть отнесена к дифференциальной среде для выделения *S. difficile*, так как все представители рода *Clostridium*, в том числе и *S. difficile*, на данной среде образуют колонии черного цвета за счет образования соединений железа.

Предложенная еще в 1979 г. W.L. George et al. [18] питательная среда ССФА (*Cycloserine Cofoxitin Fructose Agar*), приготовленная на основе яичного желтка и содержащая в качестве селективных компонентов циклосерин и цефокситин, а в качестве элективной добавки — фруктозу, сразу же получила всеобщее признание, так как отвечала физиологическим потребностям *S. difficile*. Более того, предварительное прогревание пробы фекалий перед посевом на среду ССФА при 70°C в течение 10 мин или обработка пробы кала абсолютным спиртом (в соотношении 1:1) в течение 1 ч обеспечивала через 24 ч инкубации первичных посевов образование довольно крупных (диаметром 4–6 мм), мутных, серых, неправильной формы колоний *S. difficile*. Вместе с тем, отмеченный рядом исследователей выраженный ингибирующий эффект на рост *S. difficile* определенных концентраций циклосерина и цефокситина, определил активное проведение исследований по созданию

нескольких вариантов модификации среды ССФА, дополнительно включающих 7% лошадиной сыворотки, таурохолат натрия и другие электро-селективные добавки [2].

В данном контексте следует упомянуть об электро-селективной среде для первичной изоляции *C. difficile* в фекальных образцах — Clostridium difficile Selective Agar (CDSA). Среда CDSA отличается от среды ССФА тем, что фруктоза заменена на маннитол. После 48–72 ч инкубации на среде CDSA *C. difficile* образуют плоские или слегка приподнятые колонии желтого цвета диаметром 2–3 мм, похожие на матовое стекло, со слегка волокнистыми краями. В зависимости от размера и времени инкубации колонии *C. difficile* могут быть окружены желтой зоной (без зоны гемолиза) 2–3 мм. Рост *C. difficile* сопровождается появлением характерного запаха р-крезола. Колонии *C. difficile* на среде CDSA также можно регистрировать по желтой флуоресценции в длинноволновом УФ-излучении в течение 1 ч после извлечения из анаэробной атмосферы [2]. Таким образом, предварительная идентификация *C. difficile* может быть выполнена на основании характерного роста на электро-селективных средах и морфологии колоний со специфическим запахом, результатов микроскопии мазков, окрашенных по Граму, в которых обнаруживаются грам-положительные палочки со спорами. Окончательная идентификация возбудителя может осуществляться на основании результатов определения биохимических свойств возбудителя с помощью наборов API 20A или Rapid Ana II [2].

Филлипс и Роджерс (цит. по S. Kafiz, и C.L. Oakley, 1976) [19] предложили простой способ идентификации *C. difficile*, основанный на феномене преобразования р-гидроксифенил уксусной кислоты в р-крезол на среде с р-гидроксифенил уксусной кислотой. В дальнейшем этот механизм явился основой при разработке газохроматографического метода быстрой идентификации возбудителя.

Метод масс-спектрометрии открывает принципиально новые возможности для окончательной идентификации *C. difficile*. Метод основан на определении белковых спектров (профилей) *C. difficile* с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии, что позволяет в течение 5–7 мин идентифицировать микроорганизм вида *C. difficile* при минимуме физических затрат. Однако широкое применение данного метода пока ограничено в связи с тем, что метод может использоваться при работе только с чистыми культурами возбудителя, что создает определенные трудности в связи с особыми условиями культивирования возбудителя [20].

Давая оценку вышеописанным методам выделения и идентификации *C. difficile*, необходимо отметить, что только выделение и идентификация

*C. difficile* без последующего определения продукции токсинов у выделенных штаммов приводит к гипердиагностике *C. difficile* — ассоциированных болезней, что связано с высокой распространенностью бессимптомного носительства нетоксигенных штаммов возбудителя [2].

В этой связи заслуживают внимания питательные среды и технологии, позволяющие дифференцировать токсигенные штаммы *C. difficile* от нетоксигенных. Так, например, на среде Cdifftox plate assay, в состав которой входит вещество X-gal (5-Бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид), токсигенные штаммы *C. difficile*, способные активно расщеплять это соединение, формируют колонии синего цвета, нетоксигенные штаммы возбудителя, не способные расщеплять вещество X-gal, формируют колонии пепельно-белого цвета [21, 22].

Описано успешное применение ПЦР для индикации токсигенных штаммов *C. difficile*. Для этого используется метод амплификации специфических участков генома возбудителя, кодирующих токсины А и/или В [23, 24]. С целью повышения специфичности метода ПЦР S.J. Kuhl et al. [25] предложили двухступенчатый протокол ПЦР, в котором используются праймеры к участку 16S рибосомальной РНК *C. difficile*. Особо следует отметить значение ПЦР в эпидемиологическом анализе вспышек. Благодаря ПЦР, к настоящему времени у *C. difficile* открыты более 150 риботипов и 24 токсинотипов, среди которых широко распространен риботип «бинарный токсин» [5, 26].

Многообразие условий и факторов, способствующих развитию тяжелых форм *C. difficile* — ассоциированной инфекции, определили разработку нескольких способов индикации токсинов возбудителя непосредственно в пробах биологического материала больных. Исторически первым методом индикации токсинов *C. difficile* в копрофильtrate является метод определения цитотоксического действия токсинов А/В в культуре ткани. В сущности, определение цитотоксичности копрофильtrата при антибиотико-ассоциированных колитах и привело к открытию этиологической роли *C. difficile* в их патогенезе [27]. Одновременно с выявлением цитопатического эффекта в культуре клеток при проведении цитопатогенного теста ставят реакцию нейтрализации токсина специфическим антитоксином, что значительно повышает специфичность данного метода исследования. Для проведения цитопатогенного теста и реакции нейтрализации цитотоксина *C. difficile* широко используются коммерческие тест-системы. В наборы входят микропланшеты с культурой клеток определенной линии (чаще всего фибробласты человека), специфический антитоксин, буфер и другие реактивы, необходимые для реакции нейтра-

лизации. В классическом варианте цитопатогенный тест и реакция нейтрализации цитотоксина проводятся следующим образом: после получения бесклеточного супернатанта фекалий его смешивают с буфером и вносят в культуру одновременно с антитоксином, представляющим специфические токсиннейтрализующие антитела. Цитотоксический эффект оценивают через 4, 24 и 48 ч инкубации. Чаще всего положительный результат наблюдается через 24 ч. Результат исследования считается положительным, если цитопатический эффект, проявляющийся в виде изменения формы клеток, регистрируется в лунках с супернатантом фекалий и отсутствует в лунках, содержащих специфический антитоксин. Такой методологический подход обеспечивает высокую эффективность проводимых исследований [2].

Попытки заменить метод определения цитотоксического действия токсинов А/В в культуре ткани способом определения цитотоксического действия токсинов *in vivo* на новорожденных белых мышах так и не вышли за рамки экспериментальных разработок ввиду его низкой эффективности [28].

Наибольшее распространение в последние годы получил метод ИФА — метод иммуноферментного анализа, основанный на определении в фекальной суспензии токсинов возбудителя [2]. В настоящее время практическому здравоохранению предложено более 8 коммерческих тест-систем для постановки ИФА. Все они несколько различаются по чувствительности и специфичности, однако в целом обладают высокой достоверностью результатов [2, 29]. Различные модификации данного метода позволяют определять в кале одновременно токсины А и В. Естественно, приоритет при этом принадлежит тест-системе, позволяющей обнаружить оба токсина *S. difficile*. Связано это с тем, что некоторые штаммы возбудителя (в частности, относящиеся к серогруппе F) продуцируют только токсин В [2]. Следует иметь в виду также, что у некоторых клинических изолятов *S. difficile*, продуцирующих токсин А, токсин не определяется при иммунологических исследованиях в связи с мутацией гена *tcdA* в 139-й позиции [30].

К достоинствам метода ИФА относятся: простота постановки, экспрессность получения результатов (в течение 2–3 ч исследования), специфичность, относительно невысокая стоимость и отсутствие необходимости работы с культурами клеток. По данным сравнительных исследований, у пациентов с клинической картиной *S. difficile* — ассоциированной диареи и колита, подтвержденных положительными результатами культурального исследования и теста на определение токсина в культуре клеток, чувствительность метода ИФА составляет 63–94%, специфичность — 75–100%.

В некоторых лабораториях для подтверждения диагноза Cld-АИ используют комбинацию двух методов — цитотоксического и ИФА. Так, Y. C. Manabe et al. [31] установили, что при одновременном использовании цитотоксического метода и ИФА, характеризующихся высокими уровнями чувствительности (84–92%) и специфичности (96–100%), значительно повышается эффективность диагностики Cld-АИ с 72 до 81% [32, 33].

В качестве примера высокоэффективного теста индикации токсинов А/В *S. difficile* следует привести тест «RIDASCREEN Clostridium difficile Toxin A/B», технология которого предусматривает использование моноклональных антител для одновременного и специфического обнаружения в образцах кала пациентов токсина А и токсина В в течение 2,5 ч.

Хорошо зарекомендовал себя и высокочувствительный иммунохроматографический экспресс-тест для качественного выявления антигена токсина А и токсина В *S. difficile* в кале, основанный на использовании коммерческого набора «DUO TOXIN A + B-CHECK-1». Тестовое устройство представляет собой пластиковый корпус, в который помещены два мембранных стрипа, один — для определения токсина А, другой — токсина В. Конъюгат частиц коллоидного золота и моноклональных антител к токсину А или токсину В *S. difficile* нанесен в левой части соответствующей мембраны [34]. Постановка теста отличается простотой. Несколько капель экстракта фекалий, предварительно обработанных в экстрагирующем растворе, вносятся в каждое из двух окон для образца тестового устройства. По мере прохождения исследуемой пробы вдоль мембран тестового устройства конъюгат, содержащий меченые антитела, связывается с антигеном токсина А или токсина В пробы (если таковой присутствует), образуя комплекс «антиген — антитело». Этот комплекс взаимодействует с соответствующими поликлональными антителами (к токсину А или токсину В) в тестовой зоне устройства, образуя каждый в своем мембранном стрипе окрашенную полосу. При отсутствии токсина А или токсина В в пробе окрашенная полоса в тестовой зоне не образуется. Вне зависимости от результата теста в каждом стрипе несвязанный конъюгат, продолжая продвигаться по слою адсорбента, достигает контрольной зоны, взаимодействует с реагентом в контрольной зоне тестового устройства, образуя розовую окрашенную полосу, что указывает на корректное проведение теста.

Большие надежды как на метод, который станет еще более доступным методом выявления токсинов в пробах фекалий *S. difficile*, были возложены на реакцию латекс-агглютинации (РЛА) [33, 35]. РЛА основана на определении токсина А *S. difficile*, присутствующего в кале, за счет связы-

вания со специфическими антителами, фиксированными на частицах латекса. Несмотря на низкую стоимость, простоту постановки и экспрессность (результаты исследования можно оценить уже через 30 мин), метод латекс-агглютинации не получил должного признания в связи с низкой чувствительностью и специфичностью, так как антиген, распознаваемый в этом тесте, является ферментом глутаматдегидрогеназой, не играющим определенной роли в развитии болезни. В связи с этим положительную реакцию дают как токсикогенные, так и нетоксикогенные штаммы *S. difficile*, а также некоторые другие микроорганизмы.

Сравнительная оценка эффективности используемых методов лабораторной диагностики *S. difficile* — ассоциированной инфекции приведена в таблице.

В обзоре Ю.В. Лобзина и соавт. [2] четко сформулированы противопоказания к использованию теста на токсины *S. difficile*: у пациентов с оформленным калом (исключение составляют случаи кишечной непроходимости, возможно, связанной с *S. difficile*); у детей в возрасте до 1 года, так как высокий процент ложноположительных результатов в данной группе связан с отсутствием корреляции между частотой клинических форм заболеваний и частотой обнаружения токсина в кале; и при проведении контроля эффективности лечения, так как у определенной части пациентов еще длительное время после полного клинического выздоровления в кале обнаруживается токсин *S. difficile*.

В последние годы признание получил скрининг-метод, основанный на проведении фермент-связанного флюоресцентного анализа в анализаторе «VIDAS» с использованием коммерческого набора «*S. difficile* Toxin A & B (CDAB)» (фирмы «БиоМерье»), предназначенного для качественного определения токсинов А и В *S. difficile* в фекалиях [36].

В НИИ детских инфекций (Санкт-Петербург) разработан алгоритм проведения этиологической диагностики *S. difficile* — ассоциированной инфекции, основанный на данных анамнеза, результатах оценки характера клинического течения заболевания, выделении культуры *S. difficile* на селективно-элективной среде и ее идентификации масс-спектрометрическим методом в анализаторе Bruker, а также индикации токсина в исследуемой пробе фекалий в фермент-связанном флуоресцентном анализе, выполненном на автоматическом анализаторе «VIDAS» [36].

При сборе анамнеза выясняли анамнестические данные об антибиотикотерапии (после 5–10 дней от начала применения антимикробного препарата), о перенесенных кишечных инфекциях, о ранее диагностированных иммунодефицитных состояниях, об онкологических заболеваниях, о проведенной гормональной и химиотерапии, ВИЧ-инфекции,

кандидозе, аспирационной терапии, дефиците питания, кишечной непроходимости, почечной недостаточности, инфекции мочевыводящих путей, остеомиелите, катетеризации профессиональных и бытовых условий, в том числе артерий и вен, гемодиализе, наличии гастростомы, биопсии костного мозга, эндоскопических исследованиях, операции на органах брюшной полости. При сборе жалоб фиксировали внимание на выявление и определение характера нарушений стула, наличие поноса, болей в животе — тупых или схваткообразных. При осмотре определяли клинические признаки диареи, обращали внимание при обследовании области живота — вздутие живота, при пальпации — наличие диффузной болезненности, шума плеска, спастически сокращенного толстого кишечника. Особое внимание уделялось правилам отбора и доставки проб испражнений в бактериологическую лабораторию. Для исследования отбирали 2 образца кала: первая — для определения токсинов А\В *S. difficile* на анализаторе «VIDAS», вторая — для выделения культуры *S. difficile*.

Анализ литературных данных свидетельствует о высоком уровне, достигнутом в разработке методов лабораторной диагностики заболеваний, обусловленных *S. difficile*. Ведущую роль в установлении и подтверждении диагноза инфекции *S. difficile* играют специфические лабораторные методы исследования по обнаружению возбудителя и его токсинов. Оценка эффективности каждого из разработанных методов свидетельствует о том, что на сегодняшний день ни один из лабораторных тестов не может быть использован в качестве самостоятельного метода диагностики *S. difficile* — ассоциированных болезней. Оптимальным является использование комбинации двух лабораторных тестов, позволяющих достичь максимально высокой чувствительности и специфичности исследования.

Одновременное проведение цитопатогенного теста и использование методов определения продукции токсина *in vitro* позволяет разрешить эту проблему, однако методы отличаются трудоемкостью и требуют дополнительных экономических затрат. Несмотря на длительность исследования (до трех суток), культуральный метод с последующим тестированием выделенных штаммов на токсигенность является надежным методом диагностики *S. difficile* — ассоциированной инфекции, обладающим более высокой чувствительностью и равнозначной специфичностью по сравнению с таковыми цитопатогенного теста. Следует заметить, что исследования, ориентированные только на выделение культуры возбудителя и определение его токсигенности, может привести к гипердиагностике в связи с достаточно высокой частотой бактерионосительства токсигенных штаммов *S. difficile* [2].

Таблица

Сравнительная характеристика различных методов лабораторной диагностики инфекции *S. difficile* (цитировано по Ю.В. Лобзину и соавт., 2002) [2]

Метод исследования	Цель исследования	Время, необходимое для исследования, ч	Чувствительность, %	Специфичность, %	Комментарии	Невысокие чувствительность и специфичность. Используется только для экспресс диагностики
Исследование на культуре тканей, цитопатогенный тест (ЦПТ)	Токсин В	28 – 48	67 – 100	85 – 100	Высокая чувствительность. Возможно полуколичественное определение путем титрования проб. Хорошая чувствительность	Невысокие чувствительность и специфичность. Используется только для экспресс диагностики
Реакция нейтрализации токсина (на культуре фибробластов)	Токсин В	28 – 48	–	–	Рекомендуется использовать в сочетании с бактериологическим исследованием	Хорошие специфичность и чувствительность. Может потребоваться 2 – 3-кратное повторение исследования
Латекс-агломинация	Глутамат дегидрогеназа	0,5	58 – 92	80 – 96	Хорошие чувствительность и специфичность. Используется в сочетании с ЦПТ	
Иммуноферментный анализ	Токсин А или токсина А и В одновременно	2 – 4	63 – 99	75 – 100		
Дот-иммуноблоттинг	Токсин А	0,5	–	–		
Полимеразная цепная реакция	Ген, кодирующий токсин В, ген, кодирующий токсин А, или оба гена	2 – 4	–	–	Хорошая чувствительность и высокая специфичность	
Культуральный метод	Микроорганизм и его токсигенность <i>in vitro</i>	24 – 72	89 – 100	84 – 99	Хорошая чувствительность, низкая специфичность в связи с высокой частотой носительства у госпитализированных пациентов, особенно получающих антибиотики	

Практика показала, что чаще при тяжелых формах диарей и фибринозно-некротических колитах используются ускоренные методы определения токсинов *A/B C. difficile* в фекалиях. Интерес к ускоренным методам лабораторной диагностики *C. difficile* — ассоциированной инфекции обусловлен в первую очередь потребностями своевременной этиотропной терапии. Среди методов, направленных на быстрое определение бактериальных экзотоксинов возбудителя, наибольшее распространение получил метод ИФА. В этом аспекте Дот-иммуноблоттинг, полимеразная цепная реакция, масс-спектрометрия и фермент-связанный флуоресцентный анализ относят к новым высокотехнологическим и весьма перспективным методам ранней диагностики *C. difficile* — ассоциированной инфекции.

#### Литература

1. Малов, В.А. Роль *Clostridium difficile* в патологии человека / В.А. Малов, В.М. Бондаренко, С.Г. Пак // Журн. микробиол. — 1996. — № 1. — С. 91–96.
2. Лобзин, Ю.В. Современные представления об инфекции *Clostridium difficile* / Ю.В. Лобзин, С.М. Захаренко, Г.А. Иванов // Клин. микроб. антимикроб. химиотер. — 2002. — Т. 4, № 3. — С. 200–232.
3. Soler, P. Rates of *Clostridium difficile* infection in patients discharged from Spanish hospitals, 1997–2005 in The Netherlands / P. Soler, F. Nogareda, R. Cano // Clin. Infect. Dis. — 2007. — V. 45. — P. 695–703.
4. Lyytikäinen, O. Hospitalizations and deaths associated with *Clostridium difficile* infection, Finland, 1996–2004 / O. Lyytikäinen [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2009. — V. 15. — P. 761–765.
5. *Clostridium difficile*, Methods in Molecular Biology / P. Mullany, A.P. Roberts (eds.) // Springer Science + Business Media, LLC. — 2010. — 646 p.
6. Zilberberg, M.D. *Clostridium difficile* Infections among Hospitalized Children, United States, 1997–2006 / M.D. Zilberberg, G.S. Tillotson, L.C. McDonald // Emerg. Infect. Dis. — April 2010. — V. 16, № 4. — P. 604–609.
7. Захаренко, С.М. Заболевания, ассоциированные с *Clostridium difficile* / С.М. Захаренко, С.В. Пономарев // Лечение и профилактика. — 2012. — Т. 3, № 4. — С. 82–89.
8. Bacci, S. Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection / S. Bacci [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2011. — V. 17, № 6. — P. 976–982.
9. Vital Signs: Preventing *Clostridium difficile* Infections // MMWR. — 2012. — V. 61, № 9. — P. 157–162.
10. Kato, H. Analysis of *Clostridium difficile* Isolates from Nosocomial Outbreaks at Three Hospitals in Diverse Areas of Japan / H. Kato [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2001. — V. 39. — P. 1391–1395.
11. Van Dijck, P. Genotyping of out break related and sporadic isolates of *Clostridium difficile* belonging to serogroup C / P. Van Dijck, V. Avesani, M. Delmee // J. Clin. Microbiol. — 1996. — V. 34. — P. 3049–3055.
12. Rupnik, M. Heterogeneity of large clostridium toxin: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes // FEMS Microbiol. Rev. — 2008. — V. 32. — P. 541–555.
13. Khanna, S. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study / S. Khanna [et al.] // Am. J. Gastroenterol. — 2012. — V. 107, № 1. — P. 89–95.
14. Шульпекова, Ю.А. Антибиотикоассоциированная диарея // Русский медицинский журнал. — 2007. — Т. 15, № 6. — С. 1–6.
15. Hensgens, M.P. Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics / M.P. Hensgens [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. — 2012. — V. 67, № 3. — P. 742–748.
16. Sundram, F. *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 106: clinical outcomes and risk factors / F. Sundram [et al.] // J. Hosp. Infect. — 2009. — V. 72. — P. 111–118.
17. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и диагностика инфекций / под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой. — М.: БИНОМ, 2010. — 1152 с.
18. George, W.L. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile* / W.L. George [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1979. — V. — P. 21–219.
19. Kafiz, S. *Clostridium difficile*: isolation and characteristics / S. Kafiz., C.L. Oakley // J. Med. Microbiol. — 1976. — № 9. — P. 129–137.
20. Van Veen, S.Q. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories / S.Q. Van Veen, E.C. Claas, E.J. Kuijper // J. Clin. Microbiol. — 2010. — V. 48, № 3. — P. 900–907.
21. Darkoh, Ch. Novel One-Step Method for Detection of *Clostridium difficile* Strains Directly from Isolation of Active-Toxin-Producing Stool Samples / Ch. Darkoh, H.L. DuPont, H.B. Kaplan // J. Clin. Microbiol. — 2011. — V. 49, № 12. — P. 4219.
22. Willey, S.H. Cultures for *Clostridium difficile* in stools containing a cytotoxin neutralized by *Clostridium sordellii* antitoxin / S.H. Willey, J.G. Bartlett // J. Clin. Microbiol. — 1979. — V. 10. — P. 880–884.
23. Goorhuis, A. Application of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis to determine clonal spread of toxin A-negative *Clostridium difficile* in a general hospital in Buenos Aires, Argentina / A. Goorhuis [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. — 2009. — V. 15. — P. 1080–1086.
24. Kato, N. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction / N. Kato [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1991. — V. 29. — P. 33–37.
25. Kuhl, S.J. Diagnosis and monitoring of *Clostridium difficile* infections with the polymerase chain reaction / S.J. Kuhl [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 1993. — V. 16 (Suppl 4). — P. 234–238.
26. Rupnik, M. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis / M. Rupnik, M.H. Wilcox, D.N. Gerding // Nat. Rev. Microbiol. — 2009. — V. 7. — P. 526–536.
27. Borriello, S.P. Molecular, immunological and biological characterization of a toxin A negative, toxin B positive strain of *Clostridium difficile* / S.P. Borriello [et al.] // Infect. Immun. — 1992. — V. 60. — P. 4192–4199.
28. Третьяков, В.А. Определение биологической активности токсинов *Clostridium difficile* в экспериментах *in vivo* и *in vitro* / В.А. Третьяков // Журн. микроб. эпид. и иммунол. — 1998. — Т. 1, № 6. — С. 11–18.
29. Vanpoucke, H. Evaluation of six commercial assays for the rapid detection of *Clostridium difficile* toxin and/or antigen in stool specimens / H. Vanpoucke [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. — 2001. — V. 7. — P. 55–64.
30. Sambol, S.P. Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease. / S.P. Sambol [et al.] // Infect Immun. — 2000. — V. 68. — P. 5480–5487.

31. Manabe, Y.C. Clostridium difficile colitis: An efficient clinical approach to diagnosis / Y.C. Manabe [et al.] // Ann. Intern. Med. — 1995. — V. 123. — P. 835–840.
32. Ridell, S. Evaluation of the ImmunoCard Toxin A membrane EIA for Clostridium difficile toxin A. Proceedings of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology / S. Ridell [et al.] // Am. Soc. Microbiol. — 1997. — P. 165.
33. Staneck, J.L. Multicenter evaluation of four methods for Clostridium difficile detection: ImmunoCard C. difficile, cytotoxin assay, culture, and latex agglutination. / J.L. Staneck [et al.] / J. Clin. Microbiol. — 1996. — V. 34. — P. 2718–2721.
34. Gerding, D.N. Clostridium difficile associated diarrhea and colitis / D.N. Gerding [et al.] // Infect. Control. Hosp. Epidemiol. — 1995. — V. 16. — P. 459–477.
35. Shahrabadi, M.S. Latex agglutination test for detection of Clostridium difficile toxin in stool samples / M.S. Shahrabadi [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1984. — V. 20. — P. 339–3341.
36. Макриди, П.С. Частота регистрации токсигенных штаммов Clostridium difficile у детей с ОКИ / П.С. Макриди [и др.] // Журнал инфектологии. — 2012. — Т. 4, № 12. — С. 88–89.

---

*Авторский коллектив:*

*Кветная Ася Степановна* — ведущий научный сотрудник, руководитель отдела микроэкологии человека Научно-исследовательского института детских инфекций ФМБА России д.м.н., профессор; тел.: 8(812)234-36-73; +7-911-713-64-96; e-mail: asya41@mail.ru;

*Макриди Прасковья Степановна* — врач-инфекционист отдела кишечных инфекций Научно-исследовательского института детских инфекций ФМБА России, заочный аспирант отдела микроэкологии человека Научно-исследовательского института детских инфекций ФМБА России; тел.: 8(812)234-36-73; +7-952-216-01-93; e-mail: p\_makridi@yahoo.gr;

*Бехтерева Мария Константиновна* — старший научный сотрудник, руководитель отдела кишечных инфекций Научно-исследовательского института детских инфекций ФМБА России к.м.н.; тел.: 8(812)234-52-30; +7-911-749-44-02; e-mail: mkbechtereva@rambler.ru.