

**ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ CLOSTRIDIUM
DIFFICILE: ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ И
ЛЕЧЕНИЮ**

Минск БГМУ 2014

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ *CLOSTRIDIUM* *DIFFICILE*: ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ

Учебно-методическое пособие



Минск БГМУ 2014

УДК

ББК

С.

Рекомендовано Научно-методическим советом университета в качестве учебно-методического пособия , протокол №

А в т о р ы : проф. И.А. Карпов, доц. Ю.Л. Горбич, асс. Н.В. Соловей,
асс. И.О.Стома

Р е ц е н з е н т ы: доц. каф. эпидемиологии Белорусского государственного медицинского университета, канд. мед. наук М.И. Бандацкая; зам. гл. врача по мед. части УЗ ГКИБ г. Минска, канд. мед. наук С.О. Вельгин.

Инфекции, вызванные *Clostridium difficile*: подходы к диагностике и лечению: учеб.-метод. пособие / И.А. Карпов (и др.). – Минск: БГМУ, 2014. – 36 с.

ISBN

Описываются особенности этиологии, факторы риска и механизмы развития, классификация, диагностика, лечение и профилактика инфекций, вызванных *Clostridium difficile*. Рассматриваются основные схемы антибактериальной терапии в зависимости от вариантов течения патологического процесса. Учебно-методическое пособие разработано в соответствии с программой по дисциплине «Инфекционные болезни» и предназначается для студентов 4, 5 и 6 курсов лечебного, педиатрического, медико-профилактического факультетов, а также может быть использовано врачами всех специальностей, оказывающих помощь пациентам с инфекциями, вызванными *Clostridium difficile*.

УДК
ББК

©Белорусский государственный
медицинский университет, 2014

ВВЕДЕНИЕ

По данным исследований европейских авторов средняя частота встречаемости нозокомиальных инфекций, вызванных *Clostridium difficile* (CDI), составляет 245 случаев на 100 000 пациенто-дней. В Соединенных Штатах Америки в 2008 году было зафиксировано 13,1 случаев CDI на 1000 госпитализированных пациентов. В Азии, по данным трех проспективных исследований, частота встречаемости инфекций, вызванных *Clostridium difficile*, среди госпитализированных пациентов с остро развившейся диареей варьирует от 11,1% до 26,6%. При этом 30-дневная летальность при CDI составляет 5,99% – 57%. А по данным американских авторов с 1999 по 2004 гг. от состояний, связанных с CDI в Соединенных Штатах Америки умерли 20 642 человека, что в 7 раз превышает смертность от всех кишечных инфекций вместе взятых.

Инфекция, вызванная *Clostridium difficile*, в абсолютном большинстве случаев связана с поражением кишечника, экстраинтестинальные поражения при данной патологии встречаются крайне редко. На долю данного микроорганизма приходится до 10-25% антибиотик-ассоциированных диарей, 50-75% антибиотик-ассоциированных колитов и 90-100% псевдомембранозных колитов. Наиболее часто CDI развивается у пациентов, имеющих следующие предрасполагающие факторы риска:

- антибактериальная терапия в предшествующие 1-3 месяца;
- пожилой возраст;
- неоднократные и длительные госпитализации;
- противоопухолевая и иммуносупрессивная терапия;
- тяжелая декомпенсированная сопутствующая патология;
- абдоминальные хирургические вмешательства в ближайшем анамнезе;
- госпитализация в учреждения здравоохранения, являющиеся эпидемиологически неблагополучными по CDI.

Клинические проявления CDI варьируют от бессимптомной колонизации до развития псевдомембранозного колита, осложненного токсическим мегаколоном, перфорацией кишечника, сепсисом или септическим шоком. Особую проблему инфекции, вызываемые *C.difficile*, представляют для пациентов пожилого возраста, у которых сочетаются сразу несколько предрасполагающих факторов: возрастные изменения состава микробиоты желудочно-кишечного тракта, наличие коморбидной патологии, частые госпитализации и системная антибактериальная терапия, а также «старение» иммунной системы.

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ CLOSTRIDIUM DIFFICILE

C.difficile-ассоциированная диарея – диарея с частотой неоформленного стула более 3 раз в сутки при наличии результата лабораторного подтверждения диагноза (токсигенная культура, ИФА определение токсинов, ПЦР) либо при наличии эндоскопических/гистологических признаков псевдомембранозного колита. Данное состояние у большинства пациентов дебютирует во время системной антибактериальной терапии или в течение ближайших трех недель после ее отмены (хотя у некоторых пациентов срок развития заболевания от момента прекращения антибиотикотерапии может достигать 1-3 месяцев). Тяжесть *C.difficile*-ассоциированной диареи может варьировать от легкой, саморазрешающейся после окончания антибиотикотерапии, до тяжелой профузной холероподобной, быстро приводящей к дегидратации пациента, диареи.

C.difficile-ассоциированный колит проявляется учащенными дефекациями от 3 до 10-15-20 раз в сутки с водянистыми испражнениями, спастическими болями преимущественно в нижних отделах живота (у 20-33%), субфебрильной либо фебрильной температурой (у 30-50%) и

умеренным лейкоцитозом в периферической крови (у 50-60% пациентов). При ректосигмоидоскопии или колоноскопии изменения стенки толстой кишки варьируют от очаговых участков гиперемии слизистой до изъязвлений в зависимости от тяжести процесса.

Псевдомембранозный колит по клинической картине напоминает *C.difficile*-ассоциированный колит, однако имеет более тяжелое течение, при этом эндоскопическое обследование выявляет формирование на слизистой толстой кишки псевдомембран – округлых, слегка возвышающихся, желтоватых бляшек из некротизированного эпителия, пропитанного фибрином. Обнаружение псевдомембран достаточно для верификации диагноза CDI *C.difficile*-ассоциированной инфекции и обнаруживаются в большинстве случаев в ректосигмоидном отделе толстой кишки. Однако у 1/3 пациентов типичные патоморфологические признаки псевдомембранозного колита имеются лишь в проксимальных отделах толстой кишки при интактной слизистой ректосигмоидной области, поэтому предпочтительным методом диагностики является все же выполнение фиброколоноскопии, а не ректосигмоидоскопии. Несмотря на наличие разнообразных альтернативных методов выявления токсигенных штаммов *C.difficile* в образцах фекалий, фиброколоноскопия сохраняет свою актуальность как для верификации диагноза псевдомембранозного колита, так и в дифференциальной диагностике CDI и другой патологии желудочно-кишечного тракта. При невозможности выполнить фиброколоноскопию для подтверждения диагноза псевдомембранозного колита возможно использования компьютерной томографии, при которой обнаруживают резко выраженное утолщение стенки толстой кишки, являющееся достаточно чувствительным маркером этого состояния.

Манифестация фульминантного *C.difficile*-ассоциированного псевдомембранозного колита проявляется выраженными болями, локализованными в нижних отделах живота либо диффузного характера, диареей (чаще водянистой, в редких случаях с примесью крови),

напряжением мышц передней брюшной стенки, лихорадкой, гиповолемией, лактат-ацидозом и выраженным лейкоцитозом (до $40 \times 10^9/\text{л}$ и более). В некоторых случаях диарея может быть малозаметной либо вовсе отсутствовать вследствие накопления жидкости при длительной кишечной непроходимости в дилатированной, атоничной толстой кишке.

Наиболее частые осложнения фульминантного *C.difficile*-ассоциированного псевдомембранозного колита – токсический мегаколон и перфорация толстой кишки. Токсический мегаколон является клиническим диагнозом, основанным на выявлении атонии и дилатации толстой кишки (более 7 см в наибольшем диаметре), сопровождающейся выраженной системной интоксикацией. На обзорной рентгенографии органов брюшной полости в этом случае регистрируются перерастяжение поперечной ободочной кишки с исчезновением гаустр, зубчатая исчерченность стенки толстой кишки, уровни жидкости и газа, иногда небольшая дилатация тонкой кишки. В случае развития перфорации толстой кишки в клинической картине превалируют дефанс мышц передней брюшной стенки, исчезновение кишечных шумов, выраженная болезненность в левом или правом нижних квадрантах живота с последующим развитием клиники разлитого перитонита. На обзорной рентгенографии органов брюшной полости выявляется свободный воздух.

К более редким кишечным поражениям при CDI относятся заворот поперечной ободочной кишки, энтеропатия с выраженной потерей белка и развитием асцита, перфорация толстой кишки без развития токсического мегаколона, перфорация тонкой кишки, *C.difficile*-ассоциированный аппендицит.

Внекишечные проявления CDI встречаются очень редко и включают бактериемию, часто с одновременным выделением из крови других представителей микрофлоры толстой кишки, абсцесс селезенки, остеомиелит, артриты (чаще протезированных суставов), инфекции кожи и мягких тканей, эмпиему плевры.

В целом, необходимо отметить, что клинические проявления CDI обладают значительной вариабельностью, при этом легкие формы заболевания при неадекватной тактике ведения пациентов могут прогрессировать с развитием жизнеугрожающих осложнений.

Клинико-лабораторные признаки и предикторы тяжелого и осложненного течения CDI. Клинические исследования указывают на необходимость выбора той или иной этиотропной терапии CDI в зависимости от тяжести ее течения. Использование предикторов тяжелого и осложненного течения CDI является тем клиническим инструментом, который позволит своевременно назначать необходимую терапию пациентам с неблагоприятным прогнозом заболевания.

Согласно рекомендациям Европейского общества по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (2014 г.) под тяжелой CDI понимается заболевание, протекающее с явлениями тяжелого колита (таблица 1) либо в случае наличия хотя бы одного из нижеследующих неблагоприятных прогностических факторов:

- 1) возраст ≥ 65 лет
- 2) выраженный лейкоцитоз (количество лейкоцитов $>15 \times 10^9/\text{л}$).
- 3) снижение уровня альбумина сыворотки (<30 г/л).
- 4) увеличение уровня креатинина сыворотки (≥ 133 мкмоль/л или $\geq 1,5$

раза от первоначального уровня до момента развития CDI).

Под осложненной CDI – заболевание, протекающее с выраженными системными токсическими эффектами, шоком, необходимостью в госпитализации в ОРИТ, выполнении колэктомии или заканчивающегося летально.

Таблица 1.

Клинические проявления, указывающие на наличие у пациента тяжелого колита при отсутствии иных причин для их возникновения.

Метод	Клинические проявления
-------	------------------------

исследования	
Физикальное исследование	<ul style="list-style-type: none"> - лихорадка (температура >38,5 °С); - озноб; - нестабильность гемодинамики пациента, включая признаки развивающегося шока; - дыхательная недостаточность, требующая проведения искусственной вентиляции легких; - клинические признаки перитонита; - клинические признаки кишечной непроходимости; - наличие крови в испражнениях при CDI наблюдается редко, вследствие чего связь данного признака с тяжестью течения колита не определена.
Лабораторные исследования	<ul style="list-style-type: none"> - выраженный лейкоцитоз (>15×10⁹/л); - выраженный лейкоцитарный сдвиг влево (палочкоядерные нейтрофилы >20%); - увеличение креатинина сыворотки крови (>50% от первоначального уровня); - увеличение лактата сыворотки крови (≥5 ммоль/л); - значительное снижение уровня альбумина сыворотки крови (<30 г/л).
Колоноскопия или ректороманоскопия	<ul style="list-style-type: none"> - псевдомембранозный колит; <p>Недостаточно данных о взаимосвязи эндоскопических признаков , которые могут быть при CDI (отек, гиперемия, рыхлость и легкая травматизация стенки кишки, язвообразование), и тяжестью CDI</p>
Рентгенологическое исследование	<ul style="list-style-type: none"> - растяжение толстой кишки (>6 см в поперечнике); - утолщение кишечной стенки, включая гипоинтенсивное утолщение стенки; - скручивание околокишечной жировой клетчатки; - асцит (при условии отсутствия иных причин для его возникновения); <p>Недостаточно данных по взаимосвязи тяжести заболевания и гаустрации или утолщения слизистой кишки (включая симптом «отпечатков большого пальца», псевдополипы и бляшки).</p>

В случае если CDI оценивается как тяжелая, необходим динамический мониторинг уровня лактата и креатинина сыворотки крови, а также оценка степени выраженности лейкоцитоза. Отрицательная динамика по данным маркерам должна приводить к пересмотру тактики ведения пациента, в том числе с привлечением хирургов для решения вопроса о необходимости хирургического вмешательства.

Другие показатели, которые рекомендуется оценивать у пациентов с тяжелой CDI, - водно-электролитный баланс, уровень альбумина и маркеры органной недостаточности (как при сепсисе). Следует подчеркнуть, что не стоит оценивать ответ на проводимую терапию по результатам повторных микробиологических исследований, т.к. бессимптомное носительство *C.difficile* после адекватной антибиотикотерапии отмечается у 25-30% пациентов к 30 дню после окончания лечения.

ДИАГНОСТИКА

Диагностика *Clostridium difficile*-ассоциированных инфекций (CDI), основана на: 1) совокупности клинических проявлений заболевания, микробиологическом обнаружении в стуле токсина или токсин-продуцирующего штамма *C. difficile* и отсутствии иной причины, объясняющей состояние пациента; или 2) обнаружении характерных проявлений псевдомембранозного колита при колоноскопии или гистопатологическом исследовании.

Диагностические тесты, которые могут быть использованы для установления диагноза CDI включают: 1) обнаружение продуктов (результатов) жизнедеятельности *C. difficile* (изучение цитотоксического эффекта в культуре клеток, обнаружение глутаматдегидрогеназы и токсинов А и/или В); 2) выделение токсин-продуцирующего штамма *C. difficile*; 3) молекулярно-биологические тесты, основанные на методике амплификации нуклеиновых кислот: 16S РНК, обнаружение генов, кодирующих продукцию

токсинов и/или глутаматдегидрогеназы. В настоящее время более предпочтительным для установления диагноза CDI является двух- или трехступенчатый алгоритм диагностики, основанный на подтверждении первого положительного результата одним или двумя подтверждающими тестами или референс-методом.

Реакция нейтрализации цитотоксина в культуре клеток (РНЦКК).

Данный тест осуществляется путем приготовления копрофильтрата страдающего диареей пациента, который затем наносится на монослой клеток подходящей клеточной линии (диплоидные фибробласты человека, клетки Vero, клетки McCoу, фибробласты легких MRC-5, Hep2 клетки и т.д.). После 24-48 часов инкубации клетки исследуются на наличие индуцированного токсином цитопатического эффекта. В случае выявления цитопатического эффекта проводится реакция нейтрализации с *C.difficile* антисывороткой для того, чтобы убедиться, что развившиеся изменения клеточной культуры не связаны с неспецифичной цитотоксичностью. Данный метод детектирует преимущественно наличие токсина В, обладающего в 100-1000 раз большим цитопатогенным действием на культуре клеток по сравнению с токсином А.

Исторически реакция нейтрализации цитотоксина в культуре клеток считается золотым стандартом диагностики CDI, однако ее чувствительность значительно уступает более современным методам диагностики, варьируя по данным различных исследований от 65 до 90%. Выполнение данного метода исследования может быть связано с целым рядом факторов. Токсин может разрушаться в образце, например, из-за задержек в доставке образца в лабораторию либо позднего начала работы с материалом, что может приводить к ложно-отрицательным результатам. Результаты исследования могут отличаться в зависимости от используемой культуры клеток, особенностей подготовки копрофильтрата, промежутка времени от начала появления клинической симптоматики CDI до проведения исследования, предшествующего лечению пациента активными в отношении *C.difficile*

антибиотиками и т.д. Таким образом, на сегодня РНЦКК не рассматривается как рутинный диагностический тест вследствие субоптимальной чувствительности, длительности исследования (от 24 до 48 часов) и высоких квалификационных требований к специалистам, работающим с клеточными культурами и интерпретирующими получаемые результаты.

Токсигенная культура. Данный метод основан на выделении культуры *C.difficile* из образца фекалий и определении, является ли выделенный изолят токсин-продуцирующим.

В роли исследуемого образца могут выступать фекалии, мазок из прямой кишки или мазок из периректальной области.

С целью культурального выделения *C.difficile* используется анаэробный агар или селективная среда с добавками, способными усиливать рост *C.difficile* и ингибировать рост сопутствующей микрофлоры. Наиболее часто используемая среда для выделения *C.difficile* содержит циклосерин, цефокситин и фруктозный агар (CCFA), хотя также используются среды, содержащие цефокситин, циклосерин, яичный желток (CCEY) или цефокситин, циклосерин, яичный желток с лизоцимом (CCEYL). В данные среды могут добавляться дополнительные субстраты, усиливающие вегетацию спор, - таурохолат, лизоцим. Независимо от состава среды и используемого метода выделения культуры *C.difficile*, предшествующее восстановление среды до инокуляции образца значительно увеличивает вероятность выделения микроорганизма. Культуры обычно инкубируются минимум 48 часов и в течение 7 дней регулярно изучаются, после чего, в случае отсутствия роста, делается заключение об отрицательном результате исследования.

Несколько исследований одновременно сравнивали различные среды и условия культивирования для выделения *C.difficile* из биологических образцов. Согласно данным Hink et al., наиболее чувствительным методом выделения *C.difficile* как из фекалий, так и из кишечных мазков являлось предварительное прогревание образца до 80°C перед инокуляцией на

маннитоловую среду с циклосерином, цефокситином, таурохолатом и лизоцимом.

После получения колоний возбудителя, они идентифицируются на основании результатов окраски по Граму, морфологии колоний, специфического запаха «амбарного сена» и набора биохимических тестов, таких как определение гидролиза L-пролин-нафтиламида и позитивного теста на индол. Под действие лучей УФ для колоний *C.difficile* характерна желто-зеленая флуоресценция. Для целей быстрой идентификации возбудителя возможно использование коммерческих биохимических тестов (например, RapidANA тест) или перспективного в настоящее время метода MALDI-TOF масс-спектрометрии.

После идентификации изолята *C.difficile* с целью дифференциации бессимптомного носительства от инфекции необходимо определение способности микроорганизма продуцировать токсины. Возможные варианты – это использование супернатанта выделенной культуры возбудителя в реакции нейтрализации цитотоксина в культуре клеток, ИФА для детекции токсинов, ПЦР-детекция генов, отвечающих за продукцию токсинов. В настоящее время предпочтение отдается быстро осуществимым высокочувствительным ИФА для детекции токсина, а также методам молекулярно-генетической диагностики.

В дополнение к традиционно проводимым культуральным методам диагностики для *C.difficile* также разработаны хромогенные среды, позволяющие ускорить выделение микроорганизма из образцов фекалий. Например, предположительная идентификация *C.difficile* может осуществляться на основе обнаружения черных колоний на ChromID агаре (bioMerieux). Несмотря на то, что хромогенные среды традиционно дороже, чем другие типы бактериологических сред, их высокая чувствительность и способность ускорять рост *C.difficile* может существенно улучшить диагностику CDI.

На сегодня токсигенная культура *C.difficile* в большей степени считается референс-методом, и не используется в практике большинства микробиологических лабораторий клинических учреждений. Это обусловлено высокими требованиями к квалификации персонала, трудоемкостью и длительностью метода. Кроме того, токсигенная культура определяется способностью штаммов *C.difficile* продуцировать токсин *in vitro* и не обязательно свидетельствует о продукции токсина *in vivo* в организме хозяина.

Токсигенная культура является золотым стандартом детекции *C.difficile* в образцах фекалий. В то же время часть экспертов высказывают мнение, что хотя токсигенная культура и способна выявлять больше позитивных образцов, она не обладает преимуществами перед реакцией нейтрализации цитотоксина в культуре клеток в диагностике подозреваемой на основе клинических данных CDI.

Иммунологические методы определения токсинов. Данная группа методов основана на использовании моноклональных или поликлональных антител к токсинам *C.difficile*. До недавнего времени детекция токсинов с помощью ИФА была наиболее часто используемым в клинических лабораториях методом диагностики CDI. На сегодня существует огромное количество коммерчески доступных ИФА тест-систем для идентификации токсинов *C.difficile*, включающих быстрые иммунохроматографические, микролуночные и твердофазные тесты. Ранее системы ИФА детектировали только токсин А *C.difficile*, однако сегодня рекомендуется использовать системы, детектирующие оба типа токсинов (А и В), так как штаммы микроорганизма, не продуцирующие токсин А, но продуцирующие токсин В, также способны вызывать CDI.

Стоимость одного ИФА теста для детекции токсинов *C.difficile* относительно низкая, время выполнения исследования варьирует в зависимости от используемой тест-системы, однако, как правило, не превышает 2-4 часов, что относит данный метод к быстрым тестам. В то же

время чувствительность и специфичность ИФА диагностики CDI варьирует в широких пределах, составляя от 40% до 100%.

Существует множество причин для гетерогенности результатов исследования даже одних и тех же ИФА тест-систем, включающих превалирующие типы *C.difficile* в том или ином географическом регионе (могут отличаться антигенной структурой токсинов), используемый для сравнения золотой стандарт, особенности антительного ответа пациентов, связывающих токсин *C.difficile* в просвете ЖКТ, различия в технике исследования между различными лабораториями, принципы отбора и транспортировки образцов между клиническими учреждениями, тестирование свежих либо замороженных образцов и т.д. В части исследований были внесены изменения в методику анализа, рекомендуемую производителем, например, изменены значения оптической плотности в микролуночном формате ИФА.

С учетом вышеперечисленных моментов, а также относительно невысокой чувствительности ИФА для определения токсинов *C.difficile*, в настоящее время данный метод не считается наилучшим для диагностики CDI. Последние рекомендации IDSA/SHEA и ESCMID не рекомендуют использовать ИФА как единственно достаточный тест для диагностики инфекций, вызываемых *C.difficile*.

Определение глутамат-дегидрогеназы. Глутамат-дегидрогеназа (ГДГ) является метаболическим ферментом, кодируемым геном *gluD* и продуцируемым в значительном количестве у всех изолятов *C.difficile* (токсигенных и нетоксигенных). Схожий по структуре фермент есть и у других клостридий, в частности, у *C.sordellii*. Вследствие этого определение глутамат-дегидрогеназы является скрининговым тестом для диагностики CDI, позитивный результат которого должен обязательно быть подтвержден другим тестом – ИФА определением токсина или ПЦР, детектирующей гены токсинообразования. Имеющиеся на сегодня исследования показали, что определение ГДГ в качестве скринингового теста обладает высокой

чувствительностью, а также подходящей отрицательной прогностической ценностью.

Как и в иммуноферментном анализе, тесты для определения ГДГ доступны в формате микролуночных ИФА и иммунохроматографии. Чувствительность (80-100%) и отрицательная прогностическая ценность для тест-систем детекции ГДГ практически сопоставима независимо от специфического типа диагностикума или используемого для сравнения золотого стандарта. Данный тест может значительно сократить общее время исследования для отрицательных результатов и требует минимального участия персонала лаборатории, он характеризуется низкой стоимостью, особенно по сравнению с молекулярно-генетическими методами.

Детекция ГДГ является привлекательным скрининговым исследованием для быстрого исключения CDI в лабораториях, где нет возможности осуществлять молекулярно-генетическое тестирование. Однако данная методика будет работать адекватно лишь в случае высокой консервативности структуры глутамат-дегидрогеназы среди всех штаммов *C.difficile*. В настоящее время большинство экспертов считает маловероятным влияние на производительность тестов для детекции ГДГ региональных или географических различий в распространенности тех или иных риботипов *C.difficile*.

Комбинированные тесты – ИФА для определения ГДГ и токсинов *C.difficile*. В последние годы на рынке диагностических тест-систем появились ИФА тесты, комбинирующие определение ГДГ и токсина *C.difficile* в одном тесте. Данные комбинированные тесты относительно быстро выполняются, а их стоимость также ниже стоимости молекулярно-генетических методов. Чувствительность компонента теста, отвечающего за определение ГДГ, сопоставима с чувствительностью схожих автономных тестов детекции ГДГ, в то время как чувствительность компонента, отвечающего за детекцию токсинов уступает аналогичным автономным тестам детекции токсинов *C.difficile*. В целом считается, что отрицательный

и положительный результат исследования при использовании комбинированных тест-систем высоко достоверен в случае получения обоих отрицательных или обоих положительных результатов определения ГДГ и токсина *C.difficile* (т.е. когда каждый из компонентов тестов дает конкордантный результат исследования). Образцы, которые позитивны в тесте определения ГДГ, но негативны в тесте ИФА детекции токсина должны подвергаться подтверждающему тестированию (РНЦКК или ПЦР) для исключения CDI.

Молекулярно-генетические методы для прямой детекции *C.difficile* в клинических образцах. Первые описания использования методов амплификации нуклеиновых кислот для обнаружения *C.difficile* в образцах фекалий появились в научных публикациях начала 90-х гг. XX столетия. Эти тест-системы использовали традиционные методы ПЦР, процесс экстракции нуклеиновых кислот был трудоемким и время-затратным, а продукты амплификации детектировались с помощью гель-электрофореза и/или саузерн-блота. Чувствительность данных методик была значительно выше по сравнению с существующими тогда бактериологическим методом и реакцией нейтрализации цитотоксина в культуре клеток.

Спустя буквально одно десятилетие методы экстракции ДНК из фекальных образцов существенно улучшились и упростились благодаря появлению готовых коммерческих наборов, содержащих смесь РНКаз, протеаз и других составляющих реагентов, а также методик концентрации и очистки нуклеиновых кислот. Техника проведения амплификации нуклеиновых кислот также улучшилась, появилось оборудование для проведения ПЦР в режиме реального времени (например, Cepheid SmartCycler, Roche LightCycler, iCycler IQ и др.), что позволило осуществить широкое внедрение данного метода в клинические условия. В то же время первая ПЦР тест-система для детекции *C.difficile* в образцах фекалий BD GeneOhm Cdiff (BD Diagnostics Inc.) была одобрена FDA только в 2009 году. В данной количественной ПЦР тест-системе амплифицируется

консервативный регион *tcdB* гена, а детекция продуктов амплификации осуществляется с использованием мишень-специфичных флуоресцентных зондов (молекулярных беконгов). Для амплификации, детекции и интерпретации результатов применяется термоциклер Cepheid SmartCycler. Использование внутреннего контрольного образца (ВКО) позволяет отследить проблемы с ингибированием образца. Существующая тест-система, одобренная FDA (США), основана на ручном выделении ДНК в несколько этапов до момента помещения образца в амплификатор. Общее время экстракции ДНК занимает от 75 до 90 минут в зависимости от количества образцов. Автоматизированная версия (BD Max Cdiff), также недавно получившее одобрение FDA (США), значительно уменьшает время пробоподготовки. Образец фекалий с помощью петли вносится в специальный буферный раствор, который затем помещается на конвейер инструмента BD Max Cdiff, где уже находятся необходимые реагенты для пробоподготовки и осуществления реакции амплификации. Как и ручной аналог, BD Max Cdiff амплифицирует *tcdB* ген. Для проведения амплификации, детекции и интерпретации получаемых результатов используется герметичный одноразовый микрофлюидный катридж, предотвращающий возможность контаминации образца. Общее время исследования в этом случае составляет около 3 часов, варьируя в зависимости от количества образцов.

В настоящее время одной из наиболее распространенных ПЦР систем для диагностики CDI является Cepheid GeneXpert. Данная система позволяет выполнять все процедуры проведения ПЦР анализа в специальном картридже, включающем в себя все необходимые реагенты и расходные материалы. Время ручного внесения образца фекалий не превышает 2 минут и может быть осуществлено даже медицинским персоналом, не специализирующимся в области лабораторной диагностики. Среднее время получения результата составляет около 45 минут, а чувствительность и специфичность метода по данным различных исследований близка к 100%.

Внедрение молекулярно-генетических методов существенно увеличило чувствительность выявления *C.difficile* в образцах фекалий, но в то же время возникло множество вопросов о показаниях для практического использования ПЦР диагностики. Одним из существенных с практических позиций является вопрос, насколько выявление генов, кодирующих токсины А и В, коррелирует с экспрессией данных токсинов *C.difficile* (всегда ли экспрессируются данные гены?). Ответить на этот вопрос помогли ряд клинических исследований, сравнивающих ПЦР с токсигенной культурой, при этом отмечалось ряд ситуаций, когда невозможно было выделить из образца фекалий токсигенный микроорганизм. Однако осталось неясным, связано это было с концентрацией микроорганизма ниже предела детекции тест-системы, проблемами с забором образца или ошибками персонала, осуществляющего исследование.

Другой важный вопрос, возможно ли эволюционное изменение участков генетического материала, кодирующих гены токсинообразования *C.difficile*, и как это влияет на результативность молекулярно-генетического исследования. Учитывая, что все тест-системы ПЦР сфокусированы на детекции консервативных участков генов токсигенности, обнаруживаемых у всех риботипов возбудителя, вероятность ошибок детекции штаммов *C.difficile* в клинических образцах маловероятно, хотя и не исключена полностью.

Еще одной значимой проблемой является оценка специфичности и позитивной прогностической ценности методов амплификации нуклеиновых кислот, учитывая, что все они детектируют ген, а не собственно продуцируемый токсин. ПЦР детекция токсинов *C.difficile* в образцах фекалий обладает высокой чувствительностью и специфичностью при проведении аналитических исследований, ее специфичность в клинических условиях может быть субоптимальной; детекция *C.difficile* методом ПЦР не обязательно равнозначна наличию инфекционного процесса, так как ПЦР будет позитивной как в случае колонизации, так и в случае клинически

явного заболевания. В будущем возможно появление тест-систем, которые будут определять не только наличие *C.difficile*, но также специфических биомаркеров (лактоферрин фекалий, различные цитокины), коррелирующих с активной CDI.

Дополнительные тесты и биомаркеры для диагностики CDI. В течение последних десятилетий для дифференциации между воспалительными и невоспалительными причинами диареи было предложено множество различных методов детекции фекальных биомаркеров воспаления (лактоферрина, кальпротектина, провоспалительных цитокинов). На сегодня диагностическая ценность и клиническая применимость данных методов в случаях CDI остается неясной.

Алгоритмы лабораторной диагностики CDI. Как отмечалось выше, ПЦР для детекции генов токсинообразования *C.difficile* является более чувствительным методом, чем ИФА, и может быть использована в качестве самостоятельного диагностического теста. В то же время молекулярно-генетические методы являются более дорогими и требуют большего количества рабочего времени в сравнении с другими распространенными в клинической практике методами диагностики CDI. С целью оптимизации лабораторной диагностики инфекций, вызываемых *C.difficile*, были предложены двух- или трехэтапные алгоритмы диагностики. Образцы фекалий первоначально тестируются на наличие глутамат-дегидрогеназы, и если результат данного теста отрицательный, сообщается об отрицательном результате исследования на CDI без дополнительного тестирования. Если результат исследования образца фекалий на ГДГ положительный, далее проводится подтверждающее тестирование. В двухступенчатом алгоритме подтверждающим тестом обычно является ПЦР, в зависимости от результата которой и сообщается о положительном или отрицательном результате исследования на CDI. В трехступенчатом алгоритме подтверждающим тестом служит ИФА для детекции токсинов *C.difficile*. Токсин-положительные образцы сообщаются как положительный результат исследования на CDI, а

ГДГ-позитивные, ИФА-негативные образцы тестируются дополнительно методом ПЦР. Данный многоступенчатый подход может быть особенно полезен для лабораторий, не обладающих возможностью работать с молекулярно-генетическими тестами, так как позволяет ограничить число образцов, необоснованно направляемых в референс-лаборатории.

Хотя многоступенчатые алгоритмы представляют собой потенциально экономически выгодный подход к диагностике CDI, существует множество факторов, о которых следует помнить, прежде чем внедрять данные алгоритмы в рутинную практику. Во-первых, это распространенность глутамат-дегидрогеназа-позитивных образцов в конкретной популяции. Например, у детей распространенность ГДГ-позитивных образцов может быть очень высокой, что приводит к необходимости выполнять подтверждающий тест в большинстве случаев и, соответственно, повышает необоснованные экономические затраты. Во-вторых, многоступенчатые алгоритмы диагностики занимают больше времени, и это необходимо учитывать в случае тяжелых форм CDI, где быстрый и точный диагноз может играть жизненно важное значение. В-третьих, выполнение нескольких тестов последовательно требует хорошей квалификации персонала, соответствующего оснащения лаборатории и адекватных процедур контроля качества. В-четвертых, методы детекции ГДГ обладают несколько меньшей чувствительностью по сравнению с ПЦР, что может приводить в очень небольшом проценте случаев к ложноотрицательным результатам исследования. Таким образом, каждая лаборатория должна исследовать многоступенчатые алгоритмы диагностики CDI с учетом особенностей популяции пациентов конкретного учреждения здравоохранения и выбрать оптимальный подход.

Общие подходы к тестированию клинических образцов. Рекомендуется тестировать каждого госпитализированного пациента, который имеет три и более эпизода неоформленного стула за 24-часовой период. При этом необходимо подчеркнуть, что тестировать необходимо

только неоформленные образцы стула за исключением очень редких клинических ситуаций, таких как кишечная непроходимость. Кроме того, нет необходимости тестировать асимптомных пациентов, даже для контроля микробиологической эрадикации возбудителя после лечения.

Повторное тестирование образцов также имеет ограниченное значение, хотя в данном вопросе существуют определенные споры. Практика трехкратной отправки образцов фекалий для тестирования на CDI является стандартом для многих клинических лабораторий после широкого внедрения недостаточно чувствительных методов ИФА. Клиницисты посылают несколько образцов от одного и того пациента с целью компенсировать недостаточную чувствительность используемых лабораторных тестов. Однако многочисленные исследования продемонстрировали, что независимо от используемого диагностического метода (ИФА, реакции нейтрализации цитотоксина в культуре клеток или ПЦР) и тестируемой популяции пациентов, повторная отправка образцов фекалий не увеличивает результативность диагностики и может быть обманчивой, так как положительная прогностическая ценность уменьшается с каждым последующим тестом. В случае эпидемических вспышек заболевания диагностическая ценность повторного тестирования может быть выше, и, возможно, это единственная ситуация, в которой для диагностики CDI полезно повторное проведение ИФА.

ЛЕЧЕНИЕ

В случае установления диагноза инфекции, вызванной *C. difficile*, необходимо немедленное введение адекватных мер инфекционного контроля для предотвращения распространения возбудителя внутри стационара. К этим мерам относятся: 1) как можно более раннее установление диагноза CDI; 2) микробиологический контроль объектов госпитальной среды; 3) обучение медицинского персонала; 4) адекватная контактная

профилактика; 5) гигиена рук; 6) защитная одежда; 7) дезинфекция/стерилизация объектов, окружающих пациента, и медицинского оборудования.

Кроме того, необходимые лечебные мероприятия включают в себя:

- отмену всех назначенных антимикробных препаратов (при наличии возможности);
- адекватное восполнение теряемой жидкости и электролитов;
- запрет на назначение препаратов, угнетающих моторику желудочно-кишечного тракта (лоперамида и его аналогов);
- оценку необходимости продолжения терапии препаратами, снижающими кислотность желудочного сока.

Специфическая антимикробная терапия инфекций, вызванных *C.difficile*, определяется исходя из тяжести и особенностей течения CDI, а также сопутствующей патологии пациента.

1. Первый эпизод CDI: не тяжелое течение.

В не эпидемических ситуациях и при (нетяжелой) CDI, явно индуцированной приемом антибактериальных средств, может быть приемлемым прекратить прием причинного антибиотика и наблюдать за клиническим эффектом в течение 48 часов, однако пациент в течение данного промежутка времени должен тщательно оцениваться на предмет появления любых клинических признаков ухудшения, когда немедленно назначается терапия.

В случае необходимости назначения лекарственных средств препаратом выбора является метронидазол перорально 500 мг 3 раза в день 10 дней. В качестве альтернативной терапии могут быть использованы: ванкомицин (перорально 125 мг 4 раза в день 10 дней), тейкопланин (перорально 400 мг 2 раза в день 10 дней) или фидаксомицин (перорально 200 мг 2 раза в день 10 дней).

2. Тяжелая CDI.

В случае тяжелой CDI в качестве препарата выбора должны быть использованы ванкомицин (перорально 125 мг 4 раза в день 10 дней) или тейкопланин (перорально 400 мг 2 раза в день 10 дней). Возможно использование фидаксомицина (перорально 200 мг 2 раза в день 10 дней), однако в настоящее время нет доказательных данных, поддерживающих использование фидаксомицина в случае жизнеугрожающей CDI.

Использование метронидазола перорально при тяжелой CDI или жизнеугрожающем течении болезни крайне нежелательно.

Хирургическое лечение.

У части пациентов с тяжелыми инфекциями, вызванным *Clostridium difficile*, консервативная терапия не позволяет добиться улучшения состояния пациента и предотвращения неблагоприятного исхода лечения.

Показаниями к выполнению хирургического вмешательства служат:

- перфорация толстой кишки
- появление признаков синдрома системного воспалительного ответа и ухудшения клинического состояния, не отвечающего на антибактериальную терапию (включая токсический мегаколон, острый живот и тяжелую кишечную непроходимость).

Выполнение оперативного вмешательства оптимально в течение 48 часов после начала консервативной терапии (в случае отсутствия клинико-лабораторного ответа на ее проведение), или при появлении признаков полиорганной недостаточности или перфорации кишечника. Для хирургического лечения инфекций, вызванных *Clostridium difficile*, могут быть использованы два вмешательства: колэктомия и формирование илеостомы с возможным последующим кишечным лаважом ванкомицином.

3. Первый рецидив ИЛИ риск рецидива CDI.

У данной категории пациентов при назначении антибактериальной терапии возможно использовать как ванкомицин (тейкопланин), так и метронидазол в зависимости от тяжести течения CDI. При наличии

возможности показано назначение фидаксомицина перорально 200 мг 2 раза в день 10 дней.

Возможно назначение двухнедельного курса рифаксимицина после окончания 10-дневного стандартного курса терапии ванкомицином, тейкопланином или метронидазолом.

4. Многократно рецидивирующая CDI.

Препаратом выбора является фидаксомицин перорально 200 мг 2 раза в день 10 дней. В качестве альтернативы возможно использование - ванкомицина перорально 125 мг 4 раза в день 10 дней с последующей пульс-терапией или постепенным снижением дозы.

Для многократных рецидивов CDI, не отвечающей на повторные курсы антибиотиков, рекомендуется трансплантация фекалий в комбинации с пероральной антибиотикотерапией.

Технически трансплантация фекалий выполняется путем введения жидкой суспензии испражнений через назогастральный или назодуоденальный зонд, колоноскоп или высокие клизмы в желудочно-кишечный тракт пациента. В настоящее время возможно также введение фекалий per os в виде капсул с кишечнорастворимой оболочкой.

Трансплантация фекалий показана пациентам: 1) с рецидивирующими или повторными инфекциями, вызванными *Clostridium difficile*; 2) с более чем 3 эпизодами нетяжелой CDI; 3) с более чем 2 эпизодами тяжелой CDI, требующими госпитализации; 4) не отвечающих на «пульс-терапию» ванкомицином в течение 6-8 недель; 5) не отвечающим на стандартную терапию CDI в течение 1 недели (для нетяжелой инфекции) / 48 часов (для тяжелой инфекции, вызванной *Clostridium difficile*).

В качестве редких осложнений данной методики к настоящему времени описаны илеус, диарея, боль и дискомфорт в животе, вздутие и урчание в животе, отрыжка, дискомфорт в области анального отверстия. Кроме того, описаны два случая заражения норовирусами в результате выполнения трансплантации фекалий от клинически здоровых доноров.

Необходимо отметить, что все антимикробные препараты при лечении инфекций, вызванных *C.difficile*, необходимо назначать per os.

В случае, если прием пероральных антибиотиков невозможен при нетяжелой CDI следует назначать метронидазол 500 мг внутривенно 3 раза в день 10 дней, а при тяжелой CDI – метронидазол 500 мг внутривенно 3 раза в день 10 дней в сочетании с ванкомицином в виде удерживающих клизм 500 мг на 100 мл 0,9% натрия хлорида 4 раза в день внутрикшечно или в сочетании с ванкомицином 500 мг через оральный/назогастральный зонд 4 раза в день в течение 10 дней.

5. Использование пробиотиков при инфекциях, вызванных *C.difficile*.

На сегодняшний день недостаточно доказательств для назначения пробиотиков, токсин-связывающих смол и полимеров или моноклональных антител для лечения инфекции, вызванной *C. difficile*.

С другой стороны, назначение пробиотиков одновременно с антибактериальными препаратами у пациентов с факторами риска развития инфекций, вызванных *Clostridium difficile*, снижает риск развития антибиотик-ассоциированных диарей и CDI, что убедительно показано в двух мета-анализах. Мета-анализ 16 релевантных рандомизированных клинических исследований, опубликованных к маю 2012 года, продемонстрировал, что одновременное назначение антибиотиков и пробиотиков приводит к снижению риска развития как антибиотик-ассоциированной диареи (отношение рисков 0,61; 95% доверительный интервал 0,47–0,79), так и инфекций, вызванных *Clostridium difficile* (отношение рисков 0,37; 95% доверительный интервал 0,22–0,61). А по данным мета-анализа 7 рандомизированных клинических исследований, оценивавших эффективность использования только *Lactobacillus spp.* при CDI и опубликованных до декабря 2012 года, назначение пробиотиков снижает вероятность развития *C. difficile*-ассоциированной диареи (отношение рисков 0,38; 95% доверительный интервал 0,22–0,67).

ПРОФИЛАКТИКА

Предотвращение внутрибольничного распространения *C. difficile* основано на строгом контроле обработки рук медицинского персонала, мерах изоляции носителей и тщательной обработке предметов окружающей среды. Раствор хлорноватистой кислоты считается наиболее эффективным средством для обработки предметов окружающей среды с целью профилактики распространения *C. difficile*.

ЛИТЕРАТУРА

Основная:

1. Страчунский, Л.С. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л.С.Страчунский, Ю.Б.Белоусов, С.Н.Козлов. – Смоленск: МАКМАХ, 2007. – 464 с.
2. Шлоссберг, Д. Дифференциальная диагностика инфекционных болезней: практическое руководство для врачей и студентов / Д.Шлоссберг, И.А.Шульман. – СПб.: Невский Диалект, 2000. – 306 с.
3. Электронный учебно-методический комплекс по дисциплине «Инфекционные болезни» для студентов, обучающихся по специальностям 1-79 01 01 «Лечебное дело» и 1-79 01 02 «Педиатрия». Режим доступа: http://student.bsmu.by/bootest/?module=view_books. Дата доступа: 11.06.2014.

Дополнительная:

4. Cohen, S.H. 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) / S.H. Cohen et al. // Infection control and hospital epidemiology. – 2010. – Vol. 31, № 5. – P. 431–455.
5. Debast, S.B. et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection / S.B. Debast et al. // Clinical microbiology and infection. – 2014. – Vol. 20 suppl 2. – P. 1–26.
6. Hookman, P. , Barkin, J.S. Clostridium difficile associated infection, diarrhea and colitis / P. Hookman, J.S. Barkin // World journal of gastroenterology: WJG. – 2009. – Vol. 15, № 13. – P. 1554–1580.
7. Bartlett, J.G. , Gerding, D.N. Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection / J.G. Bartlett, D.N. Gerding // Clinical infectious diseases. – 2008. – Vol. 46 suppl 1. – P. S12–18.
8. Burkart, N.E. et al. Indications and Relative Utility of Lower Endoscopy in the Management of Clostridium difficile Infection / N.E. Burkart et al. // Gastroenterology research and practice. – 2011. – Vol. 2011, – P. 626582.
9. Girotra, M. et al. Clinical predictors of fulminant colitis in patients with Clostridium difficile infection / M. Girotra et al. // Saudi journal of gastroenterology. – 2012. – Vol. 18, № 2. – P. 133–139.
10. Butt, E. et al. Derivation and validation of a simple, accurate and robust prediction rule for risk of mortality in patients with clostridium difficile

- infection / E. Butt et al. // BMC infectious diseases. – 2013. – Vol. 13, № 1. – P. 316.
11. Brown, T.A. et al. Acute appendicitis in the setting of Clostridium difficile colitis: case report and review of the literature / T.A. Brown et al. // Clinical gastroenterology and hepatology. – 2007. – Vol. 5, № 8. – P. 969–971.
 12. Hayetian, F.D. et al. Ileal perforation secondary to Clostridium difficile enteritis: report of 2 cases / F.D. Hayetian et al. // Archives of surgery (Chicago, Ill.: 1960). – 2006. – Vol. 141, № 1. – P. 97–99.
 13. Libby, D.B. , Bearman, G. Bacteremia due to Clostridium difficile--review of the literature / D.B. Libby, G. Bearman // International journal of infectious diseases. – 2009. – Vol. 13, № 5. – P. E305–309.
 14. Voth, D.E. , Ballard, J.D. Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease / D.E. Voth, J.D. Ballard // Clinical microbiology reviews. – 2005. – Vol. 18, № 2. – P. 247–263.
 15. Planche, T., Wilcox, M. Reference assays for Clostridium difficile infection: one or two gold standards? / T. Planche, M. Wilcox // Journal of clinical pathology. – 2011. – Vol. 64, № 1. – P. 1–5.
 16. Cohen, S.H. 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) / S.H. Cohen et al. // Infection control and hospital epidemiology. – 2010. – Vol. 31, № 5. – P. 431–455.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ CLOSTRIDIUM DIFFICILE	5
ДИАГНОСТИКА	10
ЛЕЧЕНИЕ	22
1. Первый эпизод CDI: не тяжелое течение.	23
2. Тяжелая CDI.	23
3. Первый рецидив ИЛИ риск рецидива CDI.	24
4. Многократно рецидивирующая CDI.	25
5. Использование пробиотиков при инфекциях, вызванных C.difficile.....	26
ПРОФИЛАКТИКА	27
ЛИТЕРАТУРА	28
<i>Основная:</i>	28
<i>Дополнительная:</i>	28

Учебное издание

Карпов Игорь Александрович
Горбич Юрий Леонидович
Соловей Никита Владимирович
Стома Игорь Олегович

**Инфекции, вызванные *Clostridium difficile*: подходы к
диагностике и лечению**

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск И.А.Карпов
Редактор
Компьютерная верстка.....

Подписано в печать_____. Формат 60x84/16. Бумага писчая.
Усл. печ. л. _____ Уч.-изд. л._____. Тираж__75__экз. Заказ_____.

Издатель и полиграфическое исполнение –

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009;

ЛИ № 02330/0150484 от 25.02.2009.

Ул. Ленинградская, 6, 220006, г. Минск.