

АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ CLOSTRIDIUM DIFFICILE-АССОЦИИРОВАННОЙ ДИАРЕИ

Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих, Москва

Цель. Разработка оптимального алгоритма лабораторной диагностики Clostridium difficile-ассоциированной диареи для достижения максимально достоверных результатов. *Материалы и методы.* В исследование были включены 211 пациентов с клинической картиной C.difficile-ассоциированной диареи. Материалом для исследования служили просветные фекалии. Все образцы исследовались одновременно иммунологическими (определение глутаматдегидрогеназы — ГДГ, токсинов А и В C. difficile иммуноферментным и иммунохроматографическим анализом), бактериологическим и молекулярно-биологическими (полимеразная цепная реакция с использованием системы «GENEexpert rtPCR system», Cepheid, США) методами. *Результаты.* Из 211 образцов просветных фекалий были изолированы 126 штаммов C. difficile. В образцах просветных фекалий, из которых был выделен возбудитель, ГДГ определялась в 54% (68) случаев методом иммунохроматографического анализа (ИХА), и в 11,1% (14) случаев методом иммуноферментного анализа (ИФА). При возрастании степени обсемененности фекалий C. difficile увеличивалась чувствительность иммунологических тестов выявления ГДГ ($p < 0,05$). Начиная со степени обсемененности 10^7 КОЕ/г наблюдается резкое увеличение чувствительности обнаружения ГДГ иммуноферментным методом. Использование для диагностики C. difficile-ассоциированной инфекции только иммунологических тестов определения токсинов А и В приведет к ложноотрицательным результатам в 19,8% и 55,6% случаев при присутствии токсина А и в 35,7% и 44,4% случаев при наличии токсина В. *Заключение.* Трехступенчатый алгоритм лабораторной диагностики антибиотикоассоциированной диареи характеризуется высокой воспроизводимостью результатов исследований, чувствительностью и специфичностью. Основан на поэтапном выполнении тестов для детекции токсигенной C. difficile. Использование такого алгоритма диагностики обеспечит своевременную постановку диагноза, локальный микробиологический мониторинг и эпидемиологический надзор за C.difficile-ассоциированной инфекцией.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 45—53

Ключевые слова: C. difficile-ассоциированная инфекция, глутаматдегидрогеназа, токсин А, токсин В, бинарный токсин, антибиотикоассоциированная диарея, чувствительность, специфичность

М.А.Sukhina, I.V.Obraztsov, V.I.Mikhalevskaya, S.I.Achkasov, A.L.Safin, Yu.A.Shelygin

ALGORITHM FOR LABORATORY DIAGNOSTICS OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE ASSOCIATED DIARRHEA

Ryzhikh State Scientific Centre of Coloproctology, Moscow, Russia

Aim. To develop an optimal algorithm for laboratory diagnosis of C. difficile associated diarrhea in context of obtaining the most reliable analysis results. *Materials and methods.* 211 patients with clinically significant C. difficile associated diarrhea participated in the study. Luminal faeces were analysed by immunological (immune chromatographic assay, ICA; ELISA) bacteriological and molecular (GENEexpert rtPCR system, Cepheid, USA) methods. *Results.* We isolated 126 C. difficile strains from 211 samples of luminal faeces. We identified glutamate dehydrogenase (GDH) in 54% of cases ($n=68$) by means of immune ICA, and in 11.1% of cases ($n=14$) by means of ELISA. The increase of bacterial concentration is associated with the growth of sensitivity of GDH detection by immunological tests ($p < 0.05$). We defined a dramatic increase of GDH detection sensitivity starting from 10^7 CFU/g concentration. Toxins A and B evaluation by immunological tests only leads to false-negative results in 19,8% (ICA) and 55,6% (ELISA) of toxin A positive

cases and in 35,7% (ICA) и 44,4% (ELISA) of toxin B positive cases. *Conclusion.* Three-step diagnostic algorithm for antibiotic-associated diarrhea is characterized by high replicability, sensitivity and specificity. It is based on step-by-step performance of the tests for detection of toxin-producing *C. difficile*. Application of such approach ensures timely diagnosis, local microbiological monitoring and epidemiological control of *C. difficile* associated infection.

Zh.Mikrobiol. (Moscow), 2018, No.2, P. 45—53

Key words: *C. difficile* associated infection, glutamate dehydrogenase, toxin A, toxin B, binary toxin, antibiotic-associated diarrhea, sensitivity, specificity

ВВЕДЕНИЕ

Иррациональное и бесконтрольное применение антибактериальных препаратов провоцирует возникновение антибиотикассоциированных диарей. Это осложнение часто возникает в послеоперационном периоде у пациентов, перенесших обширные хирургические вмешательства [9]. Основным этиологическим агентом считается *Clostridium difficile* [5]. С 2003 года в странах Северной Америки и Европы тяжесть заболевания связывают с появлением нового высоковирулентного штамма — ПЦР риботипа NAP1/027, характеризующегося усиленной продукцией всех известных токсинов *C. difficile* [5].

Широкое распространение возбудителя *Clostridium difficile*-ассоциированной инфекции, частота рецидивов, высокая смертность и большие экономические затраты на лечение определили поиск и разработку оптимальных и максимально эффективных методов и алгоритмов лабораторной диагностики данного заболевания [2]. Современные подходы к детекции токсигенных штаммов *Clostridium difficile* должны быть направлены на получение аналитически надежных и клинически высокоинформативных данных, необходимых для постановки диагноза и назначения адекватной терапии.

В процессе клинического лабораторного исследования, как правило, решается несколько аналитических задач: разделение биологической смеси веществ/клеток и выделение из нее нужного компонента; детекция (идентификация) искомого компонента, в случае необходимости количественная оценка содержания определенного компонента; интерпретация результатов исследования.

Решение данных задач характеризуется надежностью лабораторных исследований. Качество лабораторных исследований отражает аналитическая надежность, которая характеризует степень достоверности лабораторных данных об изучаемом биоматериале. Достоверность полученных данных лабораторного исследования дает возможность использовать их при принятии клинических решений: для установления диагноза, назначения необходимых лечебных мер, оценки тяжести болезни и эффективности проводимого лечения.

Иммунологические методы детекции глутаматдегидрогеназы и токсинов А и В *C. difficile* относятся к визуальным неколичественным методам [1]. Их оценка происходит по частоте выявления фермента ГДГ и токсинов А и В *C. difficile* в биоматериале. Традиционно для оценки правильности лабораторной диагностики *C. difficile*-ассоциированной инфекции осуществляется относительно общепринятого «золотого стандарта» бактериологического метода и основана на градациях отрицательных и положительных результатов. Ключевым понятием в биомедицине является понятие достоверности, которое

определяет комплекс критериев оценки результатов диагностических и скрининговых тестов. К числу основных компонентов понятия достоверности относятся чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов. Каждый из данных критериев представляет собой определенный статистический показатель. Все методики, используемые в нашем исследовании, были оценены с позиции понятия достоверности.

Понятие чувствительность того или иного метода характеризует способность выявить возбудитель при минимальных его концентрациях. При этом чувствительность иммунологического теста всегда привязана к конкретной тест-системе, а не только к принципу самого метода. Чувствительность зависит от многих факторов: аффинности и avidности взаимодействия используемых (или искомым) антител с искомым (или используемым) антигеном, от других реагентов, включенных в систему, от условий проведения реакции.

Еще один термин, который характеризует достоверность исследований — это аналитическая специфичность метода. Это понятие определяется как способность метода обнаруживать или определять только искомый компонент в биоматериале и оценивается по степени влияния различных веществ биоматериала на результат анализа. Специфичность — это параметр, который позволяет не путать с другими заболеваниями искомую инфекцию.

Параметр диагностическая эффективность, используемый при характеристике той или иной тест-системы, показывает возможность конкретной тест-системы одновременно правильно определять позитивные пробы как позитивные, а негативные пробы как негативные. И еще одно понятие, которое характеризует надежность получаемых результатов — это положительная и отрицательная предсказательная значимость тест-систем. Эти характеристики позволяют оценить реальную распространенность данного инфекционного заболевания в обследуемых популяциях населения. Положительная предсказательная значимость рассчитывается как частота встречаемости инфицированных людей среди всех индивидуумов, определенных данной тест-системой как позитивные. Отрицательная предсказательная значимость тест-системы рассчитывается, как частота неинфицированных людей среди всех индивидуумов, определенных данной тест-системой как отрицательные [1].

Традиционно для определения присутствия в фекалиях *C. difficile* проводят детекцию фермента глутаматдегидрогеназы [1, 3]. ГДГ это метаболический фермент, кодируемый геном *Glud*. Он присутствует у всех штаммов *Clostridium difficile* вне зависимости от выработки токсинов, кроме того этот фермент определяется и у других видов рода *Clostridium* (например, *C. sordelli*). Данные разных исследователей показывают высокую чувствительностью и высокую прогностическую ценность определения ГДГ в кале для диагностики *C. difficile*-ассоциированной диареи [8]. Но наличие этого фермента у других представителей рода *Clostridium* снижает специфичность данного метода и обуславливает перекрестное реагирование. Чувствительность выявления ГДГ по данным литературы и производителей тест-систем методом иммунохроматографии составляет 94%, а специфичность 93% [4]. Таким образом, определение фермента ГДГ, как считают многие исследователи, может быть использовано на первом этапе диагностики *C. difficile*-ассоциированной диареи, при этом положительные результаты должны тестироваться на наличие токсинов различными доступными методами [2, 4].

Целью нашей работы было определение оптимального алгоритма лабора-

торной диагностики *C. difficile*-ассоциированной диареи для достижения максимально достоверных результатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 211 пациентов с клинической картиной *C. difficile*-ассоциированной диареи. Материалом для исследования служили просветные фекалии. Все образцы просветных фекалий исследовались одновременно иммунологическими, бактериологическим и молекулярно-биологическими методами.

Просветные фекалии тестировались иммунологическими методами — иммунохроматографический и иммуноферментный анализ на присутствие фермента ГДГ, токсинов А и В *C. difficile*. Независимо от результатов иммунологического исследования биоматериал подвергался бактериологическому исследованию с целью выделения токсигенной культуры *C. difficile*; 49 образцов просветных фекалий были дополнительно тестированы с помощью молекулярно-биологического метода с использованием системы GeneXpert® компании «Цефеид» (США), которая обеспечивает автоматизацию всех этапов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Метод ПЦР является быстрым, наиболее чувствительным и специфичным методом определения токсигенных *C. difficile*. Кроме того, тест-система, которая была использована нами для детекции возбудителя молекулярно-биологическим методом, является закрытой автоматизированной системой ПЦР-анализа, позволяющей определять не только присутствие *C. difficile* продуцирующей токсина А и В, но и определять наличие штаммов, продуцирующих бинарный токсин, а также ПЦР риботипа 027/NAP1/VI. Праймеры и пробы теста Xpert *C. difficile* выявляют последовательности генов токсина В (*tcdB*), комбинированного токсина (*cdt*) и делеции *tcdC*. Новый штамм 027/NAP1/VI с делецией в гене репрессора продукции токсинов А и В (*tcdC*) вырабатывает в 16 раз больше токсина А и в 23 раза больше токсина В, а также продуцирует бинарный токсин. Штамм *C. difficile* 027/NAP1/VI характеризуется повышенной резистентностью к антимикробным препаратам, что дает ему возможность распространяться в лечебных учреждениях. Присутствие такого штамма у пациентов свидетельствует о высоком риске летального исхода. Метод ПЦР позволяет обнаруживать минимальные микробные нагрузки. С его помощью можно обнаружить *C. difficile* с более высокой чувствительностью, чем культуральный метод, хотя именно культуральный метод обычно рассматривают как «золотой стандарт» диагностики.

Присутствие ГДГ определяли с помощью иммунохроматографического экспресс-теста «Экспресс-тест для качественного выявления глутаматдегидрогеназы *Clostridium difficile* в кале» (Vegal Farmaceutica, Испания) и иммуноферментного анализа с использованием ИФА тест-системы «CoproELISA TM *C. difficile* GDH. Глутаматдегидрогеназа *Clostridium difficile*. Иммуноферментный набор для определения глутаматдегидрогеназы *Clostridium difficile* в образцах кала» (Savyon Diagnostics Ltd., Израиль). Токсины А и В определяли с помощью иммунохроматографических экспресс-тестов «Токсины А/В *Clostridium difficile* для определения в кале» (VEDA.LAB, Франция) и иммуноферментных тест-систем «Набор для определения токсинов А+В *Clostridium difficile* иммуноферментным методом в образцах кала и суспензиях культур» (Serazym®, Германия).

Все этапы бактериологического исследования просветных фекалий проводили в условиях анаэробной рабочей станции Bactron (Sheldon Manufacturing

Inc., США), позволяющей работать на протяжении всего исследования, от первичного посева до идентификации и изучения антибиотикорезистентности, в условиях постоянного анаэробнозиса, что исключает гибель облигатно анаэробных бактерий. Материал просветных фекалий засеивался на кровяной агар (Columbia agar с 7% эритроцитов баранов), агар для селективного выделения *S. difficile* («Copan», Италия) и культивировался в анаэробных условиях при 37°C в течение 48 часов. Идентификацию проводили с помощью времяпролетного масс-спектрометра с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) (Bruker, США). Методика основана на выявлении уникального набора белков бактерии. Экстракцию рибосомальных белков проводили муравьиной кислотой. Для этого 24 часовую культуру клостридий собирали в количестве 1 бактериологической петли (объемом 10 мкл) в пробирку с деионизированной водой, гомогенизировали на приборе Vortex, добавляли этанол, центрифугировали 2 минуты на максимальной скорости (14 000 об/мин.). После этого удаляли супернатант и опять центрифугировали, чтобы удалить остатки этанола. Осадок высушивали при комнатной температуре, добавляли 70% муравьиную кислоту пропорционально количеству осадка, ацетонитрил, центрифугировали 2 минуты на максимальной скорости (14 000 об/мин.). На мишень MALDI наносили супернатант, затем покрывали высушенный экстракт раствором матрицы HCCA. Идентификация считалась достоверной при score $\geq 1,9$. Полученные результаты исследования были статистически обработаны при помощи программы Microsoft Office Excel 7.0. Оценивали диагностическую чувствительность, специфичность, а также точность и предсказательную ценность положительного и отрицательного результата обсуждаемых тестов. Чувствительность рассчитывали как долю истинноположительных результатов среди всех истинноположительных и ложно-отрицательных результатов, специфичность — как долю истинноотрицательных результатов среди всех истинноотрицательных и ложноположительных результатов. Точность диагностических методов оценивали как долю правильных результатов среди всех выполненных тестов. Предсказательную ценность положительного и отрицательного результатов рассчитывали как долю правильных результатов среди всех положительных или отрицательных результатов, соответственно. Достоверность различий между долями оценивали на основании критерия χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из 211 образцов просветных фекалий было изолировано 126 штаммов *S. difficile*. В образцах просветных фекалий, из которых был выделен возбудитель, фермент ГДГ определялся в 54% (68) случаев методом иммунохроматографического анализа (ИХА) и в 11,1% (14) случаев методом иммуноферментного анализа (ИФА). В образцах фекалий, имеющих положительную копрокультуру, в 46% (58) и 88,9% (109) случаев не обнаруживалась глутаматдегидрогеназа методами ИХА и ИФА соответственно. В образцах просветных фекалий, у которых не была выделена культура *S. difficile*, фермент ГДГ детектировался в 8,2% (7) случаев методом ИХА и в 3,5% (3) случаев методом ИФА.

Результаты детекции токсинов А и В иммунологическими методами имели различия при использовании тест-систем, основанных на методах ИХА и ИФА. Уровень совпадений этих результатов с бактериологическим исследованием колебался от 19,8% до 64,3%. Среди образцов фекалий, из которых была изолирована культура *S. difficile*, токсин А определялся в 19,8% (25) и

55,6% (70) случаев методами ИХА и ИФА соответственно. Токсин В только в 64,3% (81, ИХА) и 55,6% (70, ИФА) случаев совпадал с результатом бактериологического исследования. Образцы просветных фекалий, из которых не была изолирована культура *C. difficile* в скрининговом тесте детекции токсинов иммунологическими методами, обнаруживали наличие токсина А в 1,2% (1, ИХА) и 18,8% (16, ИФА) случаев. Токсин В определялся в 37,6% (32, ИХА) и 18,8% (16, ИФА) образцов. Таким образом, использование для диагностики *C. difficile*-ассоциированной инфекции только иммунологических тестов определения токсинов А и В приведет к ложноотрицательным результатам в 19,8% и 55,6% случаев при присутствии токсина А и в 35,7% и 44,4% случаев при наличии токсина В. Тем не менее, по данным Le Guern R. (2013), в большинстве французских лабораторий для выявления токсинов А и В *C. difficile* используют иммуноферментный анализ. Этот метод обеспечивает быстрый ответ (в течение 4 часов), но обладает низкой чувствительностью (около 50%) при высокой специфичности (95%).

Титр обсемененности *C. difficile* исследуемых образцов фекалий колебался от 10^3 до 10^9 КОЕ/г. При возрастании степени обсемененности фекалий *C. difficile* увеличивалась чувствительность иммунологических тестов выявления ГДГ ($p < 0,05$). Начиная со степени обсемененности 10^7 КОЕ/г наблюдается резкое увеличение чувствительности обнаружения ГДГ иммуноферментным методом (с 5% до 50%) и с 45% до 67% — иммунохроматографическим методом.

Кривая зависимости определения токсинов А и В от степени обсемененности просветных фекалий *C. difficile* методами ИФА и ИХА была идентична. Высокая степень положительных ответов присутствия токсинов при титре 10^3 КОЕ/г, далее происходило снижение позитивных результатов. Начиная с титра обсемененности 10^7 КОЕ/г — резкое увеличение положительных результатов детекции токсинов А и В *C. difficile*.

Среди 49 образцов просветных фекалий, которые были исследованы с помощью метода полимеразной цепной реакции, не наблюдалось ни одного ложноположительного и ложноотрицательного результата по сравнению с результатом бактериологического исследования; 7,7% (1 из 13) проб в тесте ИХА показывали присутствие ГДГ, в то время как при проведении ПЦР и бактериологическом исследовании не была выявлена *C. difficile*.

В этих образцах изолировались другие представители рода *Clostridium*. 9,09% проб имели ложноположительный результаты детекции ГДГ методом ИХА в сравнении с ПЦР и культуральным методом. Определение токсинов А и В методом ИХА показало несоответствие с ПЦР исследованием (60,6% токсин В и 33,3% токсин А).

Еще один показатель надежности диагностических тестов, который был использован при характеристике проводимых исследований — это сходимость результатов, которая характеризует степень согласованности результатов измерений, полученных одним и тем же методом на единичных объектах испытаний в одной и той же лаборатории одним и тем же испытателем. Сходимость результатов определения ГДГ методами ИФА и ИХА составила 94,03% при отсутствии фермента в образце и 13,64% при исследовании образцов просветных фекалий, у которых присутствовал данный фермент. Сходимость положительных результатов детекции токсинов А методом ИХА и ИФА составила 50%, токсинов В — 53,1% случаев. При отрицательном результате сходимость методов ИХА и ИФА составила при определении токсина А 58,38%, токсинов В — 69,39% случаев. Меньше всего несоответствий

среди результатов исследований, выполненных разными методами, наблюдалось при детекции токсина В, чем токсина А. Методом ИФА токсины А и В нельзя было дифференцировать, во всех положительных пробах методом ИФА определялись одновременно токсины А и В.

Таким образом, самый простой тест для выявления присутствия фермента ГДГ, токсинов А и В *S. difficile* в образце просветных фекалий это иммунохроматографический и иммуноферментный анализ. Оба этих метода позволяют получить быстрый ответ, но обладают низкой чувствительностью (ИФА) и специфичностью (ИХА), что определяет большое количество ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

К сожалению, выделение чистой культуры *S. difficile* не всегда рекомендуется в некоторых зарубежных клинических рекомендациях, вероятно, из-за технических трудностей работы с облигатно анаэробными бактериями. Но *S. difficile*-ассоциированная диарея, являясь нозокомиальной инфекцией, приводит к длительному пребыванию в лечебном учреждении, тем самым увеличивая финансовые расходы на лечение пациентов. Кроме того, вызывает серьезное беспокойство рост резистентности к антибактериальным препаратам у бактерий, в том числе и у *S. difficile*. Применение антибактериальных препаратов способствует селекции резистентных микроорганизмов. Это лежит в основе появления бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Поэтому необходим мониторинг антибактериальной резистентности *S. difficile*, что невозможно без выделения чистой культуры возбудителя.

Первым шагом в правильном лечении *S. difficile*-ассоциированной инфекции является быстрый и точный диагноз. Однако ни один из существующих методов выявления токсигенных *S. difficile* не является совершенным с точки зрения точности, стоимости и времени исполнения. Наличие положительного теста на ГДГ не позволяет определить способность *S. difficile* продуцировать токсины, дает большое количество ложных результатов. Дальнейший диагностический алгоритм предполагает определение токсинов А и В в кале доступными методами: ИФА, ИХА, выделение чистой культуры *S. difficile*, с последующим определением ее токсигенности молекулярно-генетическими методами (ПЦР), что имеет высокую прогностическую ценность. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам важно в свете нарастающей проблемы появления резистентных штаммов бактерий.

Использование одного из методов детекции токсигенной *S. difficile* приводит к ложноотрицательным или ложноположительным результатам, что негативно отражается на лечении пациентов с *S. difficile*-ассоциированной инфекцией. Использование в качестве первого и единственного скринингового метода диагностики *S. difficile*-ассоциированной инфекции определение фермента ГДГ иммунологическими методами приводит к ложноотрицательным результатам в 46% случаях при использовании ИХА и 88,9% случаях при использовании ИФА тест-систем. Вероятность выявления наличия фермента ГДГ иммунологическими (скрининговыми) методами повышается после достижения обсемененности кишечного биотопа *S. difficile* более 10^7 КОЕ/г.

В зарубежных клинических рекомендациях предлагается комбинировать тесты в двух- или трехэтапном алгоритме диагностики *S. difficile*-ассоциированной инфекции. На первом этапе определяют ГДГ *S. difficile*. Многими авторами считается, что в случае отрицательного результата дальнейшее обследование больного не требуется, при положительном необходимо проведение тестов, подтверждающих наличие токсинов (ПЦР или ИФА) [6, 7].

Для решения аналитических задач клинического лабораторного исследования с целью получения надежных лабораторных данных для постановки диагноза *C. difficile*-ассоциированной диареи, по нашему мнению, необходимо сочетание нескольких методов детекции токсигенных *C. difficile*. Трехэтапный алгоритм сочетает поэтапное выполнение тестов для детекции токсигенной *C. difficile*: на первом этапе — определение метаболического фермента ГДГ в просветных фекалиях, затем следует второй этап — выявления токсинов А, В, бинарного токсина; и третий этап — выделение токсигенной культуры *C. difficile* с обязательным тестированием ее чувствительности к антибактериальным препаратам. Таким образом, для достижения максимально высокой чувствительности и специфичности исследования при диагностике *C. difficile*-ассоциированной инфекции оптимален трехэтапный алгоритм лабораторной диагностики, включающий сочетание лабораторных методов. Многоэтапная лабораторная микробиологическая диагностика является адекватной стратегией, при которой низкая стоимость скринингового исследования и быстрота его исполнения, а именно определение ГДГ в просветных фекалиях, используется на первом этапе, за которым следует определение токсинов А и В в просветных фекалиях. При наличии диареи и отрицательных тестов на ГДГ и токсины А и В необходимо исключить наличие бинарного токсина. Бинарный токсин детектируется методом ПЦР. Определение токсигенных штаммов *C. difficile*, продуцирующих бинарный токсин, в лечебных учреждениях на современном этапе возможна только с использованием метода ПЦР, который имеет регистрационное удостоверение, выданное Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения. В нашем исследовании была использована единственная зарегистрированная на сегодняшний день ПЦР тест-система для анализатора GeneXpert DX. Заключительным этапом микробиологической диагностики является выделение токсигенной культуры *C. difficile* и определение ее чувствительности к антибактериальным препаратам.

Интерпретация результатов трехступенчатого алгоритма осуществляется следующим образом:

1. При положительном результате детекции ГДГ и токсинов А/В необходимо проведение дальнейшего исследования, направленного на выделение токсигенной культуры *C. difficile* и определение ее чувствительности к антибактериальным препаратам.

2. При отрицательном результате иммунологического исследования просветных фекалий на ГДГ необходимо проведение ПЦР анализа для верификации отрицательного результата.

3. Просветные фекалии, положительные по ГДГ и отрицательные по наличию токсина А/В, продолжают исследоваться на наличие возбудителя.

4. Просветные фекалии, положительные по токсинам и отрицательные по ГДГ, исследуются культуральным методом.

5. При выделении нетоксигенного штамма *C. difficile* результат следует расценивать как сомнительный, что требует дополнительного подтверждения.

6. При отсутствии ГДГ, токсинов А/В/бинарного токсина, а также возбудителя результат считается отрицательным.

Такой алгоритм характеризуется высокой воспроизводимостью результатов исследований, чувствительностью и специфичностью.

В последнее десятилетие отмечается повышенный интерес к проблеме клостридиальной инфекции. Длительная диагностика обуславливает несвоевременное проведение профилактических и санитарно-эпидемиологических

мероприятий. Все это создает предпосылки к персистенции возбудителя и его широкому распространению как в пределах одного отделения, так и в рамках целых учреждений. Именно поэтому исследования, направленные на создание оптимального диагностического алгоритма клостридиальной инфекции, чрезвычайно актуальны и позволят применить персонифицированный подход в ее лечении. Трехступенчатый алгоритм является эффективным способом обнаружения токсигенных *C.difficile*, позволяет диагностировать больше случаев, которые могут быть пропущены при исследовании биоматериала каким-либо одним методом. Уменьшение количества ложноотрицательных результатов позволяет снизить частоту внутрибольничной передачи, тем самым уменьшить годовые затраты, вытекающие из длительной госпитализации, снизить смертность от *C.difficile*-ассоциированной инфекции. Использование трехэтапного алгоритма исследования обеспечит правильную и своевременную диагностику, локальный микробиологический мониторинг и эпидемиологический надзор за *C.difficile*-ассоциированной инфекцией.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ Р 53022.2-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность). *Clinical laboratory technolog*, 2008.
2. Сафин А.Л., Ачкасов С.И., Сухина М.А. Сушков О.И. Факторы риска развития диареи, ассоциированной с *Clostridium difficile*, у колопроктологических больных. *Колопроктология*. 2017, 1 (59): 59-67.
3. Arimoto J., Horita N., Kato S. et al. Diagnostic test accuracy of glutamate dehydrogenase for *Clostridium difficile*: Systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 2016, 6: 29754. doi: 10.1038/srep29754.
4. Burnham C.A., Carroll K.C. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, 26: 604-630.
5. Kazanowski M., Smolarek S., Kinnarney F. et al. *Clostridium difficile*: Epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities — A systematic review. *Techniques in coloproctology*. 2014, 18: 223-232.
6. Martin J., Monaghan T., Wilcox M.H. *Clostridium difficile* infection: advances in epidemiology, diagnosis and understanding of transmission. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2016, 13: 206-216.
7. Moon H-W., Kim H.N., Hur M. et al. Comparison of diagnostic algorithms for detecting toxigenic *Clostridium difficile* in routine practice at a tertiary referral hospital in Korea. *PLoS One*. 2016; 11 (8): e0161139; doi:10.1371/journal.pone.0161139.
8. Putsathit P., Morgan J., Bradford D. et al. Evaluation of the BD Max Cdiff assay for the detection of toxigenic *Clostridium difficile* in human stool specimens. *Pathology*. 2015, 47 (2): 165-168.
9. Skříčka T., Hemmelová B., Mitáš L. et al. Клостридиальный колит — важная проблема в хирургии. *Колопроктология*. 2014, 4 (53): 17-23.

Поступила 04.10.17

Контактная информация: Сухина Марина Алексеевна, к.б.н.,
123423, Москва, ул. Саляма Адиля, 2

АКТИВНОСТЬ ЛАКТОФЕРРИНА РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ ГРАМПЛОЖИТЕЛЬНЫХ КОККОВ И *CANDIDA ALBICANS*

Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования

Цель. Изучение влияния лактоферрина (ЛФ) коровы и человека на штаммы *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus*, *Candida albicans*. **Материалы и методы.** Суточные агаровые культуры музейных и клинических штаммов микроорганизмов стандартизировали, развели физиологическим раствором до 5000 микробных клеток/мл, вносили по 0.1 мл в ступенчатое разведение ЛФ (от 1000 мкг/мл), инкубировали 18 — 24 часов при 37°C. Количество ЛФ в образце с полной видимой задержкой роста микробов являлось минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) для штамма. **Результаты.** МИК ЛФ человека была в 4 — 8 раз меньше, чем ЛФ коровы. Самые малые дозы требовались для подавления *C. albicans* ($11,3 \pm 1,5$ и $43,8 \pm 9,5$ мкг/мл соответственно), самые большие при использовании человеческого ЛФ необходимы для подавления *S. aureus* ($38,2 \pm 4,6$), а коровьего — *E. faecalis* ($206,3 \pm 51,1$). **Заключение.** ЛФ человека значительно эффективнее в подавлении бактериальной инфекции, однако в процессе эволюции наблюдается рост резистентности штаммов *S. aureus* к ЛФ. Учитывая большую доступность коровьего ЛФ и отсутствие тенденции к повышению резистентности, целесообразно использовать коровий ЛФ в высоких дозах при лечении инфекций, вызванных резистентными формами бактерий и *C. albicans*.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 54—58

Ключевые слова: лактоферрин, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, лекарственная устойчивость, минимальная ингибирующая концентрация

V.N.Zorina, O.N.Vorobeva, N.A.Zorin

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE HUMAN AND BOVINE LACTOFERRIN AGAINST GRAM-POSITIVE BACTERIA AND *CANDIDA ALBICANS*

Novokuznetsk State Institute for Further Training of Physicians — Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Russia

Aim. A comparative study of the effect of bovine and human lactoferrin (LF) on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* strains. **Materials and methods.** The daily agar cultures of museum and clinical strains of microorganisms were standardized, diluted with physiological solution up (from 5000 microbial cells/ ml to 0.1 ml) was added to the stepwise dilution of LF (from 1000 µg /ml) and incubated 18 — 24 hours at 37°C. The amount of LF in the sample with the total apparent growth retardation of the microbes was the minimum inhibitory concentration (MIC) for the strain. **Results.** The MIC of human LF was 4 — 8 times less than MIC of bovine LF. The smallest dose was required for the suppression of *C. albicans* (11.3 ± 1.5 and 43.8 ± 9.5 µg/ml respectively), the largest when using human LF was needed to suppress *S. aureus* ($38,2 \pm 4,6$), and in a case of bovine LF — *E. faecalis* ($206,3 \pm 51,1$). **Conclusion.** Human LF is much more effective in suppressing bacterial infection, but in the course of evolution, there is an increase in the resistance of *S. aureus* to LF. The higher availability of bovine LF and the lack of a tendency to increase resistance, it is advisable to use high-doses of bovine LF in the treatment of resistant forms of bacteria and *C. albicans*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 54—58

Key words: lactoferrin, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, drug resistance, minimal inhibitory concentration