

Национальная ассоциация специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (НП «НАСКИ»)

***Clostridium difficile*-ассоциированная диарея**

Федеральные клинические рекомендации

2017 (пересмотр каждые 3 года)

Оглавление

Оглавление	2
Ключевые слова:	5
Список сокращений.....	5
Термины и определения.....	5
1. Краткая информация	6
1.1 Определение:.....	6
1.2. Этиология и патогенез:	6
1.3. Эпидемиология:.....	6
Кодирование по МКБ-10:	7
2. Диагностика.	7
Тест-системы для диагностики CDI.....	8
Питательные среды для культивирования <i>Clostridium difficile</i>	8
Материал для исследования.....	8
Взятие, хранение, транспортировка биологического материала.....	9
Маркировка материала для лабораторного исследования	9
Транспортировка биологического материала	9
Оценка пригодности образцов	9
Диагностика CDI	10
Серологический метод.....	11
Определение ГДГ <i>C. difficile</i> в образцах просветных фекалий	11
Латекс-агглютинация	12
Принцип ИХА	12
Принцип ИФА.....	13
Определение токсинов <i>Clostridium difficile</i> в образцах просветных фекалий	14
Культуральный метод.....	14
Молекулярно-генетический метод диагностики CDI	16
СОП молекулярно-биологическая детекция ДНК методом ПЦР; выделение и очистка нуклеиновых кислот	18
Мультиплексные решения для диагностики CDI	20
Заключение	21
Схема трёхэтапного алгоритм лабораторного микробиологического исследования просветных фекалий при подозрении на CDI.....	23
Вариант 1.....	23
Схема трёхэтапного алгоритм лабораторного микробиологического исследования просветных фекалий при подозрении на CDI.....	24
Вариант 2.....	24
Оценка методики	25
3. Лечение.....	26
4. Реабилитация	28
5. Профилактика	28
Критерии оценки качества медицинской помощи	Ошибка! Закладка не определена.
Список литературы.....	29
Приложение А1. Состав Рабочей группы	36
Приложение А2. Методология разработки клинических рекомендаций	38
Методы, использованные для сбора/селекции доказательств	38
Методы, использованные для оценки качества и силы доказательств.....	38
Методы, использованные для анализа доказательств:	38
Методы, использованные для формулирования рекомендаций:	39
Экономический анализ:	39

Метод валидации рекомендаций:	39
Рабочая группа:.....	40
Основные рекомендации:	40
Целевая аудитория данных клинических рекомендаций:	40
Приложение А3. Связанные документы	41
Приложение Б. Алгоритмы ведения пациента	Ошибка! Закладка не определена.
Приложение В. Информация для пациента	Ошибка! Закладка не определена.

Clostridium difficile-ассоциированная диарея. Федеральные клинические рекомендации. - М., 2017.- 24 с.

В настоящих Федеральных клинических рекомендациях изложен трёхэтапный алгоритм исследования *Clostridium difficile*-ассоциированной инфекции (CDI), которая является одной из основных причин нозокомиальной диареи. Сложность лабораторной диагностики CDI ведёт к прогрессированию заболевания, вызывающему обширные воспалительные изменения стенки толстой кишки, характеризующиеся поверхностным некрозом слизистой оболочки с образованием «псевдомембран», приводящих к формированию токсического мегаколона, перфорации кишечной стенки, перитониту, сепсису. Ведущая роль в постановке диагноза принадлежит индикации возбудителя и детекции его токсинов. Трёхэтапный алгоритм исследования предназначен для быстрого и полного лабораторного выявления антибиотикассоциированных диарей, скрининга пациентов, поступающих в отделения эпидемиологического риска. Использование трёхэтапного алгоритма лабораторного исследования обеспечит правильную и своевременную диагностику, локальный микробиологический мониторинг и эпидемиологический надзор за CDI.

Предназначены для врачей общей практики, терапевтов, гастроэнтерологов, инфекционистов, педиатров, бактериологов, врачей КДЛ, клинических эпидемиологов, врачей различных специальностей с целью осуществления диагностики и профилактики заболеваний, сопровождающихся микробиологическими нарушениями, в том числе для мониторинга дисбиозов желудочно-кишечного тракта в медицинской организации как компонента эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи.

Ключевые слова: *Clostridium difficile*, *Clostridium difficile*-ассоциированная инфекция, глутаматдегидрогеназа, иммуноферментный анализ, иммунохроматографический анализ, полимеразная цепная реакция, экзотоксин А *Clostridium difficile*, экзотоксин В *Clostridium difficile*, бинарный токсин *Clostridium difficile*.

Список сокращений:

ССФА — циклосерин-цефокситин-фруктозный агар (селективная среда для *Clostridium difficile*);

CDI — *Clostridium difficile*-ассоциированной инфекции;

GPP — индикаторы доброкачественной практики (Good Practice Points);

TcdA — экзотоксин А *Clostridium difficile*;

TcdB — экзотоксин В *Clostridium difficile*;

АГ — антиген;

АТ — антитело;

ГДГ — глутаматдегидрогеназа;

ГЖХ — газо-жидкостная хроматография;

ИФА — иммуноферментный анализ;

ИХА — иммунохроматографический анализ;

КО — контрольный образец;

ЛПУ — лечебно-профилактическое учреждение;

МПК — минимальная подавляющая концентрация;

НАСКИ — Национальная ассоциация специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи;

НК — нуклеиновые кислоты;

ПЦР — полимеразная цепная реакция;

РАЛ — реакция агглютинации латексов;

РН — реакция нейтрализации;

СОП — стандартные операционные процедуры;

ТЛ — тиолактон;

ФЗ — Федеральный закон;

ФКР — Федеральные клинические рекомендации;

ЦПД — цитопатическое действие;

Термины и определения

Clostridium difficile-ассоциированная инфекция — заболевание, развивающееся при нарушении кишечного микробиома с избыточной колонизацией *C. difficile*, токсины которой вызывают воспаление и повреждение толстой кишки [1-5].

Псевдомембранозный колит — колит, как правило, вызванный токсигенной *C. difficile*, характерным признаком служат фибриновые наложения на слизистой оболочке толстой кишки [5; 6].

1. Краткая информация

1.1. Определение: *Clostridium difficile*-ассоциированная инфекция — заболевание, развивающееся при нарушении кишечного микробиома с избыточной колонизацией *C. difficile*, токсины которой вызывают воспаление и повреждение толстой кишки. Псевдомембранозный колит — колит, как правило, вызванный токсигенной *C. difficile*, характерным признаком служат фибриновые наложения на слизистой оболочке толстой кишки [5; 6].

1.2. Этиология и патогенез: Заселение кишечника и пролиферация токсигенных штаммов *Clostridium difficile* обуславливает развитие *Clostridium difficile*-ассоциированной инфекции (CDI), одной из основных причин нозокомиальной диареи. Патогенез CDI обусловлен нерациональным и бесконтрольным применением антибактериальных препаратов, хирургическими вмешательствами, приёмом препаратов, вызывающих иммунодепрессию, биологическими свойствами самого возбудителя. Ведущими факторами патогенности *C. difficile* являются экзотоксины А, В и бинарный токсин. Токсин А — энтеротоксин, действующий на энтероциты кишечника и вызывающий секрецию и им жидкости, воспаление и некроз слизистой оболочки.

Токсин В — цитотоксин, блокирующий биосинтез белка на рибосомах энтероцитов и ведущий их к гибели [15].

Бинарный токсин *C. difficile* риботипа NAP1/BI/027 образует на мембране энтероцита комплекс, который проникает в цитоплазму и нарушает функции клетки посредством дезорганизации цитоскелета, что ведёт к её гибели [52]. Бинарный токсин усиливает адгезию и колонизацию *C. difficile* [16; 17].

При отсутствии рациональной антибактериальной терапии, направленной на иррадикацию токсигенных штаммов *C. difficile*, CDI может прогрессировать и вызывать обширные воспалительные изменения в стенке толстой кишки, характеризующиеся поверхностным некрозом слизистой оболочки с образованием «псевдомембран» (экссудативных бляшек) ведущих к формированию токсического мегаколона, перфорации кишечника, сепсису.

1.3. Эпидемиология: Во многих странах ведется мониторинг распространённости CDI [7]. В США из 500 млн. пациентов, обратившихся в систему неотложной медицинской помощи с 2006 по 2010 год, около 500 тыс. человек имели диагноз CDI [8; 13]. За этот же период в США отмечено увеличение заболеваемости CDI на 24%, с 34,1 до 42,3 случаев на 100 тыс. населения ($p < 0,01$). Высокий уровень заболеваемости CDI (163,18 случаев на 100 тыс. населения) характерен преимущественно для пациентов старше 65 лет [8].

Статистический учёт распространённости CDI в России не ведётся.

С 2003 года в Северной Америке и Европе рост заболеваемости CDI, связывают с появлением высоковирулентного токсигенного штамма - ПЦР риботипа NAP1/027, характеризующегося продукцией белковых токсинов А, В и бинарного. Появление данного штамма обусловлено мутацией со сдвигом рамки считывания в негативном регуляторе, гена кодирующего токсинообразование, что клинически проявляется развитием тяжёлой диареи [8].

Клиническое течение CDI, вызванной токсигенным штаммом *C. difficile* ПЦР риботипа NAP1/027 характеризуется тяжёлым течением и высокой летальностью. В 2013 году в Великобритании (население 64,1 млн. человек) от CDI умерло 3 тыс. человек, в США (население 316,5 млн человек) – 20 тыс. [9].

Расходы на лечение пациентов с CDI составляют более 13 тыс. USD на одного пациента, заболевшего впервые и более 28 тыс. USD на 1 пациента с рецидивирующей CDI [8]. Расходы на лечение и профилактику CDI в США в 2006 году превысили 3,2 млрд. USD [8; 10].

Среди здорового населения широко распространено носительство токсигенных штаммов *C. difficile*. Доля носителей составляет до 15% здоровых взрослых, 84% новорожденных, 57% пожилых людей в домах престарелых [11]. Распространение *C. difficile* в популяции и окружающей среде обусловлено биологическими особенностями возбудителя, защищающими его от оксидативного шока, химических и физических факторов [12; 13; 14].

Учитывая высокое медико-социальное значение заболевания необходима разработка алгоритма лабораторной диагностики CDI для быстрой индикации патогена и определения его чувствительности к антибактериальным препаратам.

За рубежом разработан ряд подходов к лабораторной диагностики CDI [20]. Американское и Европейское общества микробиологов рекомендуют двухэтапный подход, включающий скрининговый тест на обнаружение ГДГ и определение экзотоксинов TcdA и TcdB серологическим методом [60; 62]. Опробован трёхэтапный алгоритм лабораторной диагностики CDI [7], включающий индикацию ГДГ в пробах фекалий в ИФА, с последующей изоляцией копрокультур *C. difficile* из положительных образцов. Культуральный метод позволяет определять чувствительность *C. difficile* к антимикробным препаратам и типировать возбудитель.

Кодирование по МКБ 10: A04.7 Энтероколит, вызванный *Clostridium difficile*.

2. Диагностика

Тест-системы для диагностики CDI

— Диагностический экспресс-тест для качественного определения антигенов *C. difficile*: ГДГ, токсинов А и В. – метод ИХА.

— Диагностические тест-наборы для определения антигенов *C. difficile*: ГДГ, токсинов А и В. – метод ИФА.

— Диагностические тест-наборы для определения антигенов *C. difficile*: ГДГ, токсинов А и В. – иммунохемилюминесцентный анализ.

— Тесты для выявления ГДГ, токсинов А и В, бинарного токсина – ПЦР, в том числе мультиплексная.

Питательные среды для культивирования *Clostridium difficile*

Выбор питательных сред, условий, сроков культивирования определяется биологическими свойствами *C. difficile*.

Идентификация чистой культуры *C. difficile*. Для культивирования *C. difficile* и определения их чувствительности к антибактериальным препаратам, применяются оптимальные питательные среды и условия.

Для определения чувствительности *C. difficile* к антибактериальным препаратам используется метод серийных разведений в агаре или бульоне и коммерческие тест-системы, основанные на определении МПК, диско-диффузионный метод с использованием питательной среды «Агар Уилкинса-Чалдрена» (Wilkins Chalgren Agar) и наборов коммерческих дисков с антибактериальными препаратами.

Материал для исследования

Преаналитический этап определяет правильный выбор, отбор, хранение и использование биологического материала. Материал должен соответствовать конкретной нозологии заболевания, содержать максимальное количество возбудителя, быть доступным для получения не инвазивными методами.

Материалом для диагностики CDI являются образцы свежих просветных фекалий. Минимальное количество материала, необходимого для трёхэтапной диагностики составляет 10 мл/г просветных фекалий. Предпочтительно исследовать водянистые испражнения в количестве 10-15 мл. Исследование просветных фекалий необходимо осуществлять у пациентов с диареей. Для эпидемиологического исследования по установлению распространённости токсигенных *C. difficile* в той или иной популяции в качестве биоматериала для исследования можно использовать оформленный стул. При клинической картине непроходимости и подозрении на наличие токсигенных *C. difficile* можно исследовать мазки, взятые из кишечника.

Допускается исследование содержимого просвета или биоптата слизистой оболоч-

ки толстой кишки, полученные при эндоскопическом исследовании или во время операции.

Взятие, хранение, транспортировка биологического материала

Просветные фекалии забираются в одноразовый стерильный контейнер. Адекватное количество возбудителя для бактериологического исследования сохраняется в испражнениях при температуре $+4-5^{\circ}\text{C}$ в течении двух суток. Для более длительного хранения образцы кала замораживаются при -70°C . Замораживание даже при -20°C снижает цитотоксическую активность [65]! Образцы для проведения латекс-агглютинации замораживаться не должны.

Маркировка материала для лабораторного исследования

На этикетке контейнеров с материалом указывается: Ф.И.О., возраст пациента, тип биоматериала. В направлении необходимо указать: наименование учреждения/отделения, которое направляет биоматериал на исследования, Ф.И.О. обследуемого лица; возраст или дата рождения; пол; дату взятия биоматериала для лабораторного исследования; дату заболевания; предварительный клинический диагноз или повод к обследованию; степень тяжести заболевания; данные о применении антибактериальных препаратов (наименование и длительность приёма); Ф.И.О., должность, мед. работника, отправившего биоматериал, дату отправки биоматериала и контактный телефон, по которому можно связаться с данным мед. работника.

Транспортировка биологического материала

При транспортировке внутри одного здания, контейнеры с биологическим материалом помещают в штативы и специальные герметичные контейнеры-переноски. При длительной транспортировке образцы помещают в индивидуальный герметичный пакет с адсорбирующим материалом, упаковывают в общий герметичный пакет, и помещают в термоконтейнер. Транспортировка производится при температуре от $+2^{\circ}\text{C}$ до $+8^{\circ}\text{C}$. Сопроводительные документы помещаются в индивидуальную упаковку отдельно от биологического материала и прочно прикрепляются снаружи контейнера. Полученные образцы транспортируются в герметичных пластиковых или стеклянных стерильных контейнерах. Транспортировка в лабораторию при комнатной температуре допускается не более двух часов. При невозможности быстрой транспортировки образцы должны быть помещены в транспортные среды для анаэробов.

Оценка пригодности образцов

При доставке образца в лабораторию сотрудник лаборатории, принимающий материал, должен проверить правильность оформления направления на исследование, целостность контейнеров с биологическим материалом, зарегистрировать поступивший

материал в рабочем журнале в бумажной или электронной форме. Нумерация образцов при регистрации должна быть идентична нумерации в бланках направлений на исследование.

Непригодными для исследования являются образцы:

- немаркированные или несущие неверную/нечитаемую маркировку;
- без даты получения материала;
- хранившиеся и транспортировавшиеся с нарушением установленных требований для биологического материала;
- с нарушением целостности и/или герметичности контейнеров.

В случае непригодности доставленного образца необходимо уведомить врача, назначившего исследование, и рекомендовать повторное взятие материала с соблюдением всех перечисленных правил.

Диагностика CDI

Диагноз CDI основывается на анамнезе (недавнее применение антибиотиков), клинической картине (диарея) и результатах лабораторного микробиологического исследования.

Для лабораторной диагностики CDI используют культуральный, серологический, молекулярно-генетический методы. Золотым стандартом диагностики является выделение чистой культуры возбудителя и определение её цитотоксичности на культуре клеток.

Для диагностики CDI используется ряд лабораторных тестов. В большинстве случаев используются тесты для определения токсинов непосредственно в образцах просветных фекалий. Тесты для лабораторной диагностики CDI представлены в табл. 1.

Таблица 1

Тесты для лабораторной диагностики CDI

Тест	Цель исследования	Чувствительность, %	Специфичность, %	Время исследования	Примечание
Культуральный метод	Выделение токсигенной культуры, определение антибиотикограммы	89-100	84-99	48-72 часа	Высокая чувствительность и специфичность, можно определять резистентность к антибактериальным препаратам. Трудность культивирования, необходимость использования специального оборудования.
ЦПД в культуру	Токсин В	67-100	85-100	28-48 часов	Рекомендуется использовать в сочетании с

ре кле-ток					культуральным методом. Возможно полуколичественное определение путём титрования проб.
РН ток-сина (на культу-ре кле-ток)	Токсин В	67-80	85-90	28-48 часов	Хорошая чувствительность и специфичность. Целесообразно использовать в сочетании с ЦПД.
РАЛ	ГДГ	58-92	80-96	30 ми-нут	Низкая чувствительность и специфичность. Применяется только для экспресс-диагностики
ИФА	ГДГ, токсины А и В	63-99	75-100	2-4 часа	Скринговый тест
ИХА	ГДГ, токсины А и В	93	75	15 ми-нут	Скринговый тест
ПЦР	Ген токсина А, В, бинарного	95-98	99	2-4 часа	Хорошая чувствительность и специфичность, возможно определение бинарного токсина.

Ни один из лабораторных тестов не может быть использован в качестве самостоятельного метода диагностики CDI.

Изучив имеющиеся источники в базах данных Cochrane library, PubMed, EMBASE, MEDLINE, электронную библиотеку (www.e-library.ru), основываясь на опыте по диагностике CDI мы сочли возможным представить трёхэтапный алгоритм диагностики:

1. Определение ГДГ в просветных фекалиях.
 - серологическим методом – ИХА или ИФА.
 - молекулярно-генетическим методом - ПЦР.
2. Определение токсинов А и В в просветных фекалиях.
 - серологическим методом – ИХА или ИФА,
 - молекулярно-генетическим методом - ПЦР.
3. Выделение токсигенной культуры *C. difficile* и определение её чувствительности к антибактериальным препаратам - культуральный метод.

Серологический метод — простой и доступный метод индикации ГДГ и токсинов А/В в образцах просветных фекалий посредством ИХА и ИФА. ИХА и ИФА позволяют получить быстрый ответ, но у каждой реакции есть свои достоинства и недостатки. ИФА обладает высокой специфичностью (до 95%), при низкой чувствительности (70-80%) обусловленной большим количеством ложноотрицательных результатов. ИХА при низкой специфичности показывает более высокую чувствительность по сравнению с ИФА [22].

Определение ГДГ *C. difficile* в образцах просветных фекалий [22; 23; 24]

ГДГ - фермент, превращающий глутамат в α -кетоглутарат. ГДГ присутствует у многих эукариот и прокариот включая некоторые виды рода *Clostridium* в том числе *C. difficile*. ГДГ кодируется геном *Glud*. ГДГ присутствует у всех штаммов *C. difficile* вне зависимости от выработки токсинов. Определение ГДГ имеет высокую прогностическую ценность при диагностике CDI. Специфичность данного теста снижается из-за наличия ГДГ у других представителей рода *Clostridium* (например, *C. sordellii*) и обуславливает перекрестное реагирование. Для определения ГДГ используют ИХА и/или ИФА.

Обнаружение ГДГ для диагностики CDI подходит в качестве первого этапа скрининговой индикации *C. difficile*, при этом положительные результаты должны тестироваться на наличие токсинов другими методами [21; 25]. Определение ГДГ отсеивает отрицательные результаты. Себестоимость теста низкая.

Выпускаются коммерческие наборы реагентов для определения ГДГ *C. difficile* в кале. Положительный результат подтверждает наличие *C. difficile*, отрицательный результат указывает на её отсутствие.

Латекс-агглютинация

Первым доступным коммерческим тестом для диагностики CDI являлась РАЛ. В основе РАЛ лежит связывание токсина А *C. difficile*, который присутствует в кале, со специфическими АТ, фиксированными на частицах латекса. РАЛ имеет низкую стоимость, проста в применении, результаты исследования оцениваются через 30 минут. Положительная реакция наблюдается как с токсигенными, так и с не токсигенными штаммами *C. difficile*, а также некоторыми другими микроорганизмами, вследствие того что, АГ, распознаваемый РАЛ - ГДГ, присутствует у микроорганизмов многих видов.

Принцип ИХА

ИХА предложен в начале 80-х годов. ИХА относится к реакциям с мечеными антителами. В качестве метки используют окрашенный латекс или частицы коллоидного золота. ИХ-тест представляет пластиковую пластину с окнами для внесения материала для учёта результата и для внутреннего контроля.

В ИХА используются специфические АТ к искомому АГ, иммобилизованные в виде полосы на хроматографическом носителе в окне для учёта результата (выше окна для внесения материала); АТ к тому же АГ, адсорбированные на микрочастицах золота или латекса (размещаются в окне для внесения материала). Внутренний контроль включает выявляемый АГ, нанесённый после окна для учёта результата (положительный контроль, контроль протекания всех этапов основной реакции). Антиглобулиновые АТ про-

тив меченых АТ, закреплённые в виде полосы на носителе (отрицательный контроль, контроль переноса ингредиентов по носителю, адекватность внесения материала); неспецифические АТ того же происхождения (контроль специфичности связывания АТ).

Исследуемый материал в небольшом количестве (5-7 капель) суспензируется в экстрагенте и вносится в стартовое окно тест-системы. Происходит взаимодействие АГ с АТ, адсорбированными на частицах, начинается движение образовавшихся иммунных комплексов за счёт капиллярности носителя. Дойдя до АТ, расположенных на носителе в окне учёта результата, иммунные комплексы связываются, при этом частицы латекса или коллоидного золота проявляются в виде линии голубого, зелёного или коричневого цвета. Поскольку частицы, нагруженные АТ, берутся в избытке, часть их движется дальше и связывается в окне (окнах) внутреннего контроля реакции. Полоса в этом окне свидетельствует о правильной работе тест-системы (рис. 1).

Достоинства ИХ-тест-систем: высокая скорость получения результата; доступность, простота интерпретации результата; не требуют специально обученного медицинского персонала. По чувствительности ИХ-системы уступают другим методам иммуноанализа, что позволяет применять их лишь в качестве скринингового теста.



Рис. 1. ИХА-тест система для диагностики *C. difficile*.

Принцип ИФА

ИФА основан на специфическом распознавании и взаимодействии АГ и АТ. Процесс образования иммунных комплексов носит равновесный характер и зависит от аффинности компонентов, их концентрации и других условий реакции. Для оценки их количества возможно прямое определение концентрации образующихся иммунных комплексов либо измерение оставшихся свободными мест специфического связывания. Второй общей стадией ИФА является формирование связи меченого ферментом соединения со специфическим комплексом или свободными центрами связывания. Заключительным обязательным процессом в ИФА является трансформация ферментной метки в соответствующий сигнал, измеряемый каким-либо физико-химическим методом

(спектрофотометрическим, флуориметрическим и т. д.), что достигается путём измерения скорости превращения субстрата или количества продукта, образующегося за фиксированный промежуток времени. Достоинства ИФА высокая чувствительность, позволяющая детектировать до 10 пг/мл АГ; стандартность и воспроизводимость; возможность использовать минимальные объёмы исследуемого материала; стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (срок годности составляет год и более); простота проведения реакции; наличие как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учёта; возможность автоматизации всех этапов ИФА (автоматические ИФА-анализаторы невилирующие человеческий фактор при интерпретации результатов); относительно низкая стоимость диагностических наборов и оборудования.

Определение токсинов *Clostridium difficile* в образцах просветных фекалий

Определение ГДГ в образцах просветных фекалиях не позволяет судить о токсигенности *C. difficile*. Токсины А/В в стуле больных определяют в ИФА и/или ИХА, культуральным методом, с последующим определением токсигенности чистой культуры *C. difficile*, ПЦР, биологическим методом на культуре клеток по ЦПД [11].

ИФА для детекции токсинов быстр и не трудоёмок по сравнению с бактериологическим методом, но имеет низкую чувствительность. Чувствительность ИФА составляет 75-95%, специфичность 83-98% [53; 54]. Индикация токсинов *C. difficile* в образцах кала в ИФА получила широкое распространение. Коммерческие ИФА тест-системы хотя несколько различаются по чувствительности и специфичности, обладают высокой сходимостью результатов [66].

За рубежом разработан двухэтапный алгоритм позволяющий исключить наличие *C. difficile* без дополнительных исследований и отказаться от культурального метода в 92% случаях [27]. Данный алгоритм не позволяет определить чувствительность *C. difficile* к антибактериальным препаратам.

В большинстве зарубежных лабораторий для детекции токсинов А и В *C. difficile* используется ИФА [28]. Коммерческие ИФА тест-системы позволяют определять токсин А, либо токсин В или оба токсина. Предпочтительнее использовать тест-системы, детектирующие оба токсина одновременно.

Встречаются токсигенные штаммы *C. difficile*, вызывающие заболевания и продуцирующие токсин А, который не детектируется серологическим методом. Такие штаммы имеют мутацию гена *tcdA* в 139-й позиции [68].

Культуральный метод

Золотым стандартом лабораторной диагностики CDI является выделение токси-

генной культуры и определение её цитотоксичности в РН на культуре клеток. Чувствительность и специфичность метода превышает 97%. Культуральный метод позволяет идентифицировать возбудитель, определить его токсигенность, чувствительность к антибактериальным препаратам. Культуральный метод исследования используется для диагностики CDI и для эпидемиологического надзора.

C. difficile — грамположительная спорообразующая палочка. По типу дыхания облигатный анаэроб. Впервые выделена в 1935 году Hall I. C. и O'Toole E. из фекалий здоровых новорожденных. В 1970 году Bartlett J. связал наличие этого возбудителя с возникновением колита, развившегося после применения клиндамицина [16]. Изначально микроорганизм назван *Bacillus difficilis* на основании морфологии и трудности культивирования [27]. Для выделения *C. difficile* используется питательная среда ССФА.

Образцы просветных фекалий засеваются на ССФА, инкубируются в условиях строго анаэробнозиса при температуре 35-37⁰ С в течение 24-48 часов согласно стандартным лабораторным методам.

C. difficile на среде ССФА образует бело-жёлтые колонии диаметром 2-4 мм, плоские, округлой или неправильной формы, с неровным или ризоидным краем, матовые. Рост сопровождается появлением характерного запаха, подобного запаху р-крезола или лошадиного помёта.

Использование для выделения возбудителя других питательных сред, например агара с циклосерином и маннитом, кровяного агара с циклосерином и маннитом, не имеет преимуществ перед ССФА.

Идентификация *C. difficile* проводится на основании культуральных, морфологических и тинкториальных, ферментативных, антигенных свойств. Определяют специфические рибосомальные белки методом MALDI-ToF MS, ПЦР и/или продукты метаболизма (жирные кислоты) методом ГЖХ.

Изоляты *C. difficile* должны тестироваться на токсигенность *in vitro*. Для этого отбирают 4-6 колоний, которые культивируют в сердечно-мозговом бульоне в анаэробных условиях при температуре 35-37⁰ С в течении 24 час. Фильтраты суточной бульонной культуры тестируют на наличие токсина по ЦПД в культуре клеток, либо определяют ген токсина А, В или бинарного в ПЦР. Описаны штаммы *C. difficile* не вызывающие ЦПД в культуре клеток, продуцирующие токсин *in vitro*, хотя его титр у таких штаммов ниже, чем у штаммов, вызывающих ЦПД [69], что может объяснить расхождение между клиническими и лабораторными данными.

Изоляты *C. difficile* должны тестироваться на присутствие генов токсина А и В (*tcdA* и *tcdB*) с помощью различных методов, в том числе мультиплексной ПЦР при этом

используется суспензия от 5 до 10 колоний [26].

Несмотря на длительность исследования (продолжительность 2-3 суток) культуральный метод является надёжным методом лабораторной диагностики. Многие лаборатории в России не имеют оборудования для работы с облигатными анаэробами. Это ведёт к некорректной диагностике, отсутствию мониторинга антибактериальной резистентностью изолированных токсигенных штаммов и эпидемиологического надзора. Для решения этой проблемы требуются дополнительные капиталовложения.

Недостатком культурального метода диагностики является его трудоёмкость, необходимость наличия специальных навыков работы с культурой и анаэробного оборудования. Выделение токсигенной культуры *C. difficile* возможно только в хорошо оснащённых лабораториях имеющих высококвалифицированный персонал и анаэробную бактериологическую технику.

У выделенных штаммов необходимо определять резистентность к антимикробным препаратам. Спектр противомикробных препаратов для лечения тяжёлой CDI ограничен. Штаммы *C. difficile* резистентные к ванкомицину и метронидазолу всё ещё сохраняют чувствительность к тайгециклину. Большинство изолятов *C. difficile* резистентны к цефалоспорином, 83,3% к клиндамицину, 66,7% к хлорамфениколу, 19% штаммов к метронидазолу, 6% к ванкомицину.

Молекулярно-генетический метод диагностики CDI

Молекулярные методы позволяют детектировать присутствие генома *C. difficile* и его репликацию. К ним относятся: ПЦР, риботипирование, гель-электрофорез в пульсирующем поле, мультилокусный анализ и определение мультилокусной последовательности [25]. ПЦР — перспективный метод для диагностики CDI. Для детекции токсигенных штаммов *C. difficile* используется амплификация специфических участков генома возбудителя, кодирующих токсин А и/или В или бинарный токсин. Разработана методика, позволяющая амплифицировать специфический для *C. difficile* участок гена, кодирующий токсин А и не имеющий перекрёстной реакции с фрагментом ДНК токсигенных штаммов *C. sordellii* [64]. В ПЦР определяется токсигенность *C. difficile* и наличие других факторов патогенности. ПЦР анализ просветных фекалий используется для определения источника инфекции при CDI [14].

Известны различные модификации ПЦР, обладающие высокой чувствительностью - 95,5% и специфичностью - 99,0%. Корреляции между положительной детекцией и выделением токсигенного штамма *C. difficile* составляет 98,5% [31].

Применение антибактериальных препаратов способствует селекции резистентных микроорганизмов, что лежит в основе появления бактерий с множественной лекар-

ственной устойчивостью. Популяция *C. difficile* синтезирует токсин-индуцирующий мессенджер, относящийся к группе ТЛ, который накапливается во внеклеточной среде. При достижении популяцией *C. difficile* определённой плотности активируется двухкомпонентная система AgrC2A2. В результате этого усиливается транскрипция генов, кодирующих токсины. Детекция ТЛ методом ПЦР в образцах стула у пациентов с CDI указывает, что данный процесс, играет ключевую роль в патогенезе клостридиального колита.

Резистентность к антибиотикам вызывает растущее беспокойство здравоохранения, поскольку появляется много панрезистентных штаммов бактерий, что затрудняет лечение, повышает смертность и расходы на здравоохранение [22; 23]. Выпускаются коммерческие наборы для оценки резистентности *C. difficile* к антибиотикам.

Детекция генов антибиотикорезистентности важна для диагностики и лечения CDI.

Принцип ПЦР

Принцип ПЦР — многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического фрагмента ДНК, катализируемое ферментом ДНК-полимеразой. ПЦР происходит в буферном растворе с участием термостабильной ДНК-полимеразы, четырёх типов нуклеотидов, двух синтетических олигонуклеотидных праймеров, каждый из которых комплиментарен специфическому для выявляемого микроорганизма участку одной из цепей ДНК. ПЦР включает три циклически повторяющихся этапа: разделение (денатурацию) двухцепочечной молекулы ДНК на одиночные цепи; гибридизацию (отжиг) праймеров со специфическими участками своих цепей; полимеризацию - синтез ДНК-полимеразой новых цепей с присоединившихся праймеров и появлением новых двухцепочечных молекул ДНК. ПЦР проводится в программируемых термоциклерах (амплификаторах). В результате повторяющихся 30-45 циклов амплификации концентрация специфических фрагментов экспоненциально увеличивается и достигает 10^9 - 10^{11} копий. Детекция продуктов амплификации осуществляется одним из способов. При электрофоретическом способе детекции продукты ПЦР анализируются электрофорезом в агарозном геле. В лунки агарозного геля, помещённого в камеру с буферным раствором и интеркалирующим красителем, вносится аликвота продукта ПЦР. Электроды камеры подключаются к источнику постоянного тока, в поле которого в геле молекулы ДНК, заряженные отрицательно, движутся в направлении анода. Скорость движения зависит от длины фрагмента ДНК. Присутствующий в растворе интеркалирующий краситель связывается с двухцепочечной ДНК и флуоресцирует оранжевым цветом в УФ. Наличие специфического продукта ПЦР в исследуемых образцах определяется по наличию флуоресцирующей полосы, расположенной в геле на одном уровне с продуктом амплифи-

кации положительного КО, содержащего нативный, либо рекомбинантный препарат ДНК выявляемого микроорганизма. При гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации ПЦР проводится в присутствии олигонуклеотидных ДНК-зондов, комплементарных специфическому участку ДНК микроорганизма, расположенному между праймерами. Зонды содержат флуоресцентную метку и тушитель флуоресценции, которые при накоплении специфического продукта амплификации и гибридизации зонда обеспечивают появление и накопление флуоресцентного сигнала заданной длины волны. Для амплификации и детекции флуоресцентного сигнала используются приборы, позволяющие регистрировать флуоресцентный сигнал. Использование флуоресцентных меток с разной длиной волны испускания сигнала в составе гибридизационных зондов и нескольких пар праймеров, каждая из которых направлена на амплификацию своего специфического фрагмента, позволяет проводить в одной реакции амплификацию фрагментов ДНК одновременно нескольких микроорганизмов (мультиплексная ПЦР). В этом случае регистрация сигнала флуоресценции происходит по одному из нескольких каналов детекции. Существует два способа регистрации флуоресцентного сигнала – «по конечной точке» (ПЦР-КТ) или в «режиме реального времени» (ПЦР-РВ). В случае ПЦР-КТ регистрация флуоресцентного сигнала осуществляется после окончания реакции в флуоресцентном ПЦР-детекторе (согласно инструкции к прибору). Результаты ПЦР-КТ интерпретируются автоматически с помощью программного обеспечения прибора на основании отношения уровня флуоресцентного сигнала в исследуемом образце и уровнем фонового сигнала, в образце, не содержащем препарат ДНК. В случае ПЦР-РВ регистрация флуоресцентного сигнала(-ов) осуществляется в процессе реакции, после каждого цикла амплификации. Используются амплификаторы, имеющие модуль для регистрации флуоресцентного сигнала в режиме реального времени. При проведении мультиплексной ПЦР-РВ регистрация сигнала осуществляется по каждому из каналов детекции в соответствии с количеством выявляемых мишеней и длиной волны флуоресцентной метки. Появляющаяся в этом случае кривая, описывающая накопление флуоресцентного сигнала(-ов) отражает накопление специфических продуктов ДНК возбудителей. Результаты ПЦР-РВ анализируют на основании наличия/отсутствия кривой флуоресцентного сигнала, пересекающей линию порога базовой флуоресценции с определением значения порогового цикла (С_t-цикла), при котором это пересечение происходит.

СОП молекулярно-биологическая детекция ДНК методом ПЦР; выделение и очистка нуклеиновых кислот

Биологический материал содержит вещества, ингибирующие ПЦР, ДНК и РНК

находятся внутри клеток микроорганизмов, поэтому первым этапом ПЦР является получение НК, очищенных от ингибиторов ПЦР. Существует две группы методов очистки НК – методы сорбционной экстракции НК и методы термической обработки биоматериала. В основе методов сорбционной экстракции лежит лизис и денатурации компонентов биологического материала с помощью хаотропных агентов - высоко концентрированных растворов солей (гуанидин хлорид, гуанидин изоционат) с одновременной избирательной сорбцией НК на твёрдой фазе (частицах силикагеля, нейлоновых или нитроцеллюлозных мембранах). Отмывкой в спирте ингибиторы удаляются, а НК снимаются с твёрдофазных носителей путём растворения их в воде или низкосолевого буфера. Данные методы очистки высокоэффективны, как в отношении ДНК, так и РНК. За счёт высокой воспроизводимости результатов экстракции возможна количественная оценка содержания ДНК возбудителей в биологическом материале. Для наборов реагентов, включающих в составе сорбентов магнитные частицы или нитроцеллюлозные (нейлоновые) мембраны в составе микроколонок, разработаны автоматизированные варианты экстракции с использованием автоматизированных станций. При термической обработке биоматериала проводится нагревание и инкубация (от 5 до 15 мин) образцов биологического материала при температурах от 95⁰ до 100⁰ С, в присутствии детергентов. В результате этого происходит разрушение мембран клеток, выход НК в раствор и инактивации (иногда обратимая и частичная) ингибиторов. Так как ингибиторы не удаляются из раствора, а некоторые из них, в первую очередь РНК-азы, устойчивы к нагреванию, данный способ не может использоваться для очистки и экстракции РНК. Данные методы относятся к экспресс-методам экстракции, поскольку просты в исполнении и позволяют за короткое время обработать большое количество образцов. В связи с тем, что количество не инактивированных ингибиторов может значительно варьировать от образца к образцу, эффективность очистки ДНК такими методами трудно стандартизовать, поэтому их не рекомендуется использовать в тех случаях, когда необходима количественная оценка содержания ДНК в биологическом материале. Препараты ДНК, полученные при сорбционной экстракции, можно хранить в течение 1 недели при температуре от 2⁰ С до 8⁰ С или в течение года при температуре -20⁰ С. Препараты ДНК, полученные с помощью термической обработки следует хранить при температуре не выше -16⁰ С. Для более длительного хранения образцы ДНК замораживают и хранят при -60⁰ С.

СОП требования к выделению и очистке НК

При работах по выделению и очистке НК из биологического материала на всех этапах необходимо использовать расходные материалы (пластиковые пробирки, наколничники с фильтрами) только с маркировкой «DNase, RNase- free» («свободные от ДНК-

аз, РНК-аз»). Очистку и выделения нуклеиновых кислот необходимо проводить с использованием КО. Внутренний КО - образец, содержащий рекомбинантный препарат НК в зависимости от типа исследуемой НК микроорганизма и особенностей методики. Внутренний КО добавляется в каждую пробу на этапе выделения НК, и проходит все этапы ПЦР в составе биологического образца. Назначение КО: служит для контроля потерь НК в процессе пробоподготовки, качества очистки ДНК/РНК от ингибиторов реакции амплификации.

Отрицательный КО – образец, заведомо не содержащий искомым возбудитель или его НК. Служит для контроля возможной контаминации во время выделения и очистки НК, при приготовлении амплификационных смесей.

Мультиплексные решения для диагностики CDI

Лабораторная диагностика CDI базировалась на одном из методов микробиологической диагностики: микроскопическом, серологическом (определение ГДГ и токсинов в стуле пациента), культуральном (выделение токсигенной культуры), молекулярно-биологическом (ПЦР). Эти методы показали хорошую производительность [30; 31; 45; 46] и ряд недостатков: низкую чувствительность и специфичность, трудоёмкость, времязатратность. Их выбор осуществляется врачом-бактериологом.

В обзоре Binnicker M.J. (2015 г.) сравнивается использование трёх коммерческих мультиплексных панелей (FilmArray GI панель [BioFire Диагностика, Солт-Лейк-Сити, штат Юта], Luminex xTag GI патоген панель [GPP] [Luminex Corporation, Торонто, Канада], Nanosphere Verigene кишечно-патоген [EP] тест [Nanosphere, Inc., Northbrook, IL]), которые одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) для детекции возбудителей желудочно-кишечных заболеваний из клинических образцов стула.

Каждая из мультиплексных панелей для диагностики CDI утверждена FDA в качестве дополнительного средства диагностики, их использование при скрининге у бессимптомных пациентов не утверждены и требуют дальнейшего изучения [30].

Существующие проблемы, связанные с интерпретацией результатов мультиплексных панелей, не позволяют использовать их для скрининга.

В будущем мультиплексные панели получат широкое распространение в лабораториях.

Несмотря на увеличение скорости исследования, удобства использования ПЦР, культуральный метод диагностики остаётся необходимым для определения чувствительности возбудителя к противомикробным препаратам и эпидемиологического надзора за CDI.

Заключение

Важной, до сих пор нерешённой проблемой, является отсутствие в Российской Федерации единого подхода к лабораторной микробиологической диагностике CDI. Возникает порочный круг, что ведёт к запаздыванию в постановке диагноза и нерациональной терапии.

Для лабораторной микробиологической диагностики CDI следует использовать несколько методов. Алгоритм лабораторной микробиологической диагностики CDI представлен в ФКР. Исследование начинается с определения ГДГ серологическим методом и заканчивается либо выделением токсигенного штамма *C. difficile* и определением его чувствительности к антибактериальным препаратам, либо отрицательным результатом при котором возбудитель отсутствует или его этиологическая роль вызывает сомнение. Продолжительная лабораторная микробиологическая диагностика CDI обуславливает несвоевременное проведение профилактических и санитарно-эпидемиологических мероприятий, что создает предпосылки к персистенции возбудителя и его широкому распространению, как в пределах отделения, так и в рамках ЛПУ.

В зарубежных клинических рекомендациях предлагается комбинировать тесты в двух- или трёхэтапном алгоритме диагностики CDI. На первом этапе определяют ГДГ *C. 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) [28; 54].

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.

В России на сегодняшний день, по данным Государственного реестра медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей) осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий (www.roszdravnadzor.ru/services/misearch), зарегистрировано четыре коммерческих ИФА тест-системы и одна ИХА тест-система для детекции токсинов А и В в фекалиях. Индикация токсигенных штаммов *C. difficile* продуцирующих бинарный токсин в ЛПУ возможна только с использованием ПЦР тест-систем. Регистрационное удостоверение выдано на единственную ПЦР - систему для анализатора GeneXpert DX, который разрешён в установленном порядке к применению в РФ и имеет регистрационное удостоверение. Заключительный этап микробиологической

диагностики CDI – выделение токсигенной культуры и определение её чувствительности к антибактериальным препаратам.

Нецелесообразно проводить повторные лабораторные исследований после курса антибиотикотерапии; при клиническом улучшении серологические реакции остаются положительными на протяжении 30 дней. При развитии у пациента клинической картины CDI лечение начинается до получения лабораторного подтверждения. Отрицательные результаты лабораторных тестов не исключают наличия возбудителя [19]. Необходимо лабораторное подтверждение и мониторинг за CDI.

Для проведения лабораторной микробиологической диагностики CDI оптимален трёхэтапный алгоритм лабораторного микробиологического исследования, включающий сочетание лабораторных методов для достижения максимально высокой чувствительности и специфичности исследования.

Схема трёхэтапного алгоритм лабораторного микробиологического исследования просветных фекалий при подозрении на CDI

Вариант 1.

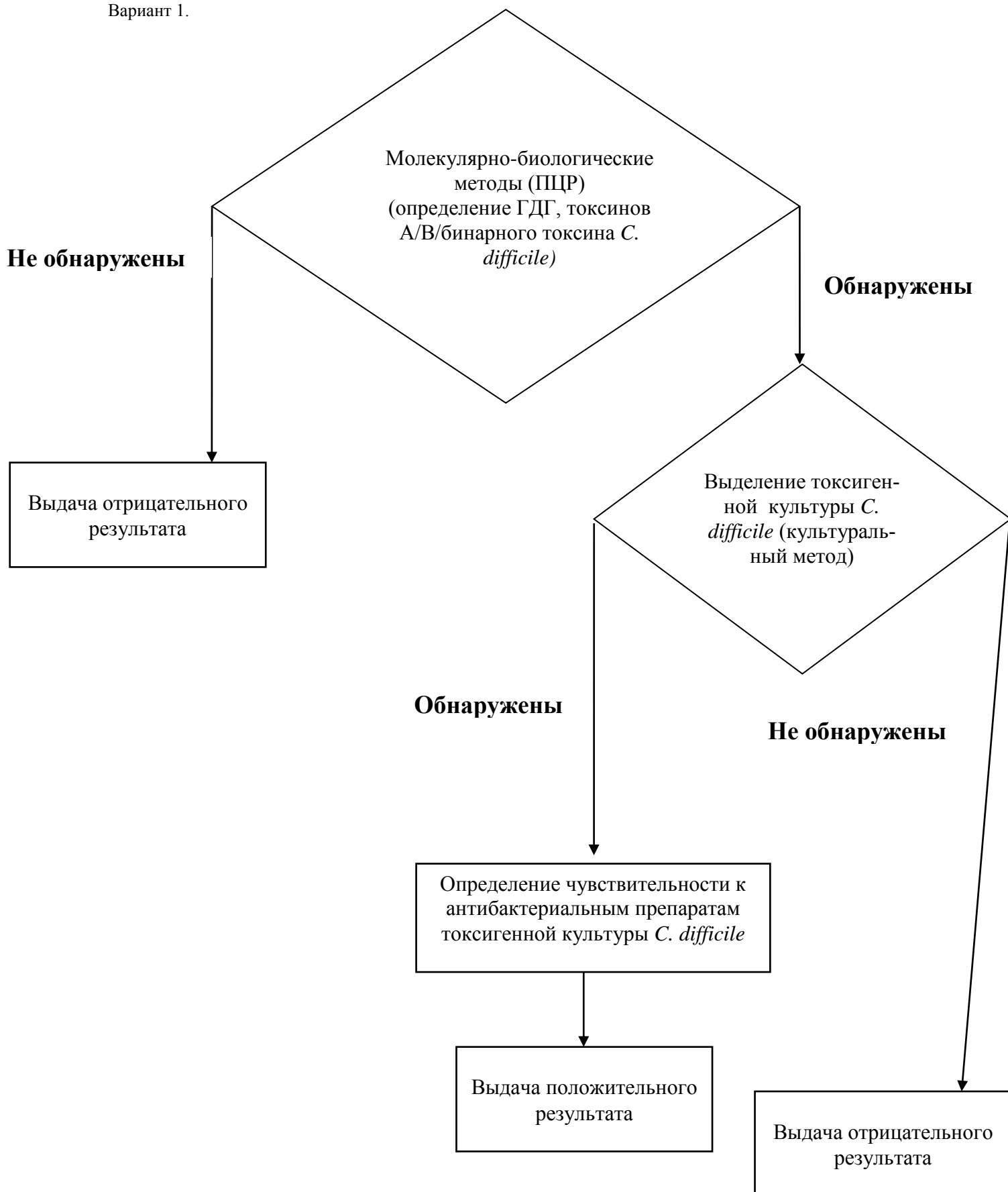
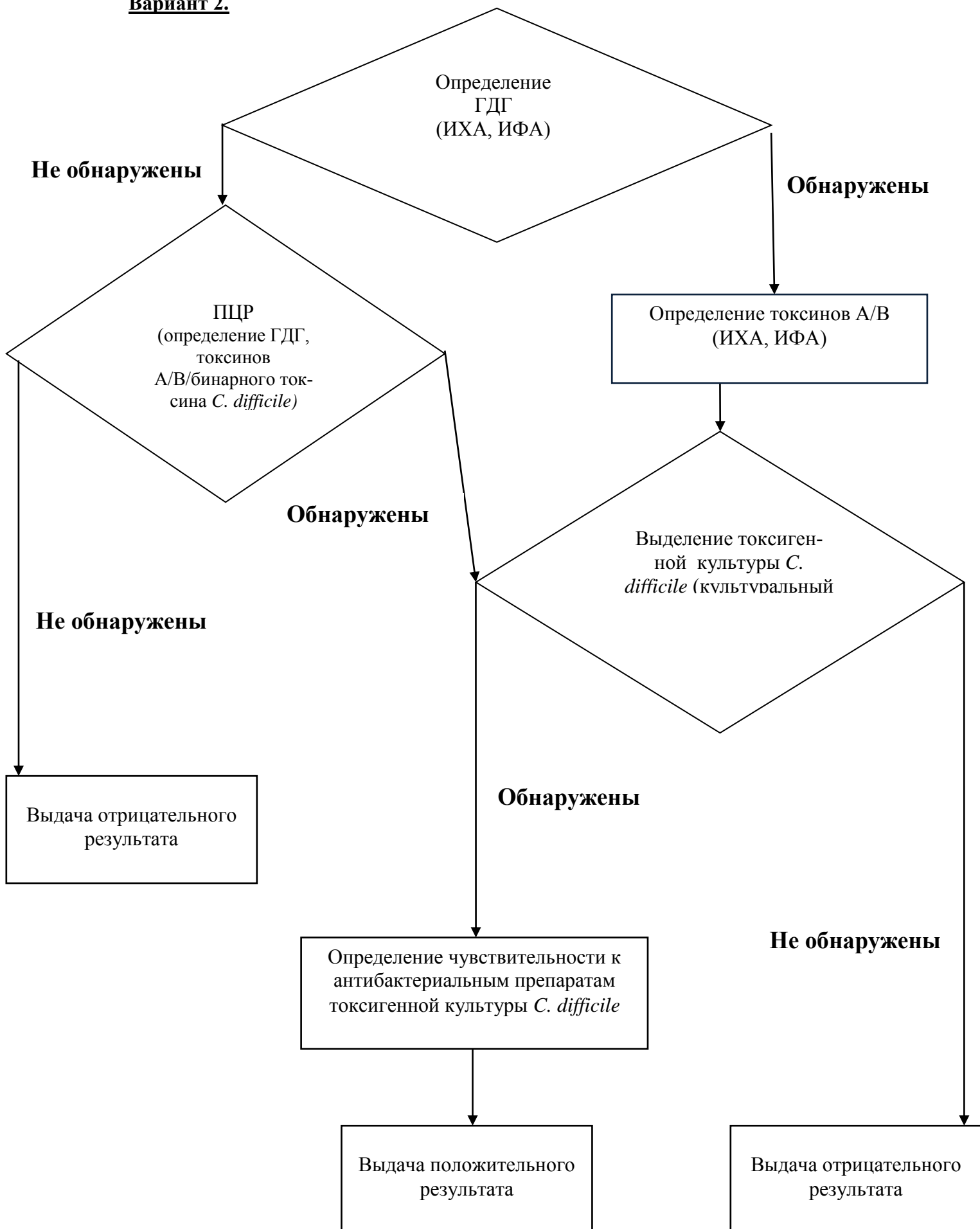


Схема трёхэтапного алгоритм лабораторного микробиологического исследования просветных фекалий при подозрении на CDI

Вариант 2.



Интерпретация результатов

При детекции ГДГ и токсинов А/В результат исследования - положительный, дальнейшее исследование направлено на выделение *C. difficile* и определение её чувствительности к антибактериальным препаратам.

При отрицательном результате серологического исследования просветных фекалий на ГДГ необходима постановка ПЦР для верификации отрицательного результата.

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

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

При выделении нетоксигенного штамма *C. difficile* результат расценивается как сомнительный и требует дополнительного подтверждения.

При отсутствии ГДГ, токсинов А/В/бинарного токсина, возбудителя результат - отрицательный.

Оценка методики

Разработанный диагностический алгоритм оценён по следующим параметрам:

- чувствительность
- специфичность
- точность теста
- положительное прогностическое значение
- отрицательное прогностическое значение
- воспроизводимость

В качестве методики сравнения («Золотого стандарта») использовались американские и европейские рекомендации по диагностике CDI.

Проведён анализ результатов исследований изучения 578 образцов просветных фекалий полученных от пациентов, поступивших в стационар и пациентов с клинической картиной CDI (табл. 2).

Таблица 2

Оценка трёхэтапного алгоритма

Параметр	Трёхэтапный алгоритм
Чувствительность	98,7±1,2%
Специфичность	99,2±0,8%
Диагностическая точность	99±0,9%
Положительное прогностическое значение	98,7±1,2%
Отрицательное прогностическое значение	99,2±0,8%
Воспроизводимость	95,4±2,4%

Алгоритм характеризуется высокими значениями воспроизводимости результатов исследований, чувствительности и специфичности.

Трёхэтапный алгоритм исследования предназначен для лабораторной диагностики CDI. Использование трёхэтапного алгоритма исследования обеспечит правильную и своевременную диагностику, локальный микробиологический мониторинг и эпидемиологический надзор за CDI.

3. Лечение

Для прогнозирования эффективности антибактериальной терапии используют данные определения чувствительности *C. difficile* к антибактериальным препаратам.

Пациентам с легкой и среднетяжёлой формой заболевания следует назначать метронидазол в дозе 500 мг внутрь три раза в день в течение 10 дней. При отсутствии клинического эффекта через 5-7 дней производят смену препарата в связи с клинической неэффективностью на ванкомицин - внутрь в дозе 125 мг 4 раза в день в течение 10 дней. Пациентам с тяжёлой формой CDI изначально показано назначение ванкомицина в дозе 125 мг внутрь четыре раза в день в течение 10 дней.

Необходимо помнить, что больным с CDI при гипотонии, повышении температуры тела выше 38,5⁰С, задержке стула, выраженном вздутии живота, изменении сознания, лейкоцитозе свыше 15 x10⁹ или лейкопении ниже 2x10⁹, повышении уровня лактата в сыворотке крови выше 2,2 ммоль/л, развитии синдрома полиорганной недостаточности требуется перевод в отделение интенсивной терапии для дальнейшего лечения. В подобной ситуации производят назначение ванкомицина внутрь в дозе 500 мг 4 раза в день и метронидазола в дозе 500 мг три раза в день внутривенно. При невозможности введения препарата через рот ванкомицин назначается ректально в микроклизмах. При этом препарат в дозе 500 мг разводится в 500 мл 0,9% раствора хлорида натрия и вводится в виде клизм четыре раза в день.

При рецидивах CDI следует использовать ванкомицин в дозировке 500 мг 4 раза в день, в течение 10 дней.

Следует знать, что дальнейшее использование антибактериальных препаратов, не активных против *C. difficile* нецелесообразно, и ведёт к ухудшению клинической картины. Так, их применение связано с высоким риском развития рецидива CDI. При этом необходимо помнить, что если клиническое течение заболевания позволяет отменить антибактериальный препарат, то необходимо сделать.

В 2011 году Управление по санитарному надзору над качеством пищевых продуктов и медикаментов США одобрило новый препарат из группы макролидов для лечения CDI - фидаксомицин. Он демонстрирует высокие фекальные концентрации препарата при минимальной системной абсорбции. В Российской Федерации фидаксомицин в настоящее время не зарегистрирован.

Ещё один препарат, который необходимо упомянуть, говоря о тяжёлых формах клостридиальной инфекции - тигециклин. По своей химической структуре он относится к производным миноциклина, и является перспективным препаратом при лечении CDI у пациентов после неэффективной терапии первой линии. Фармакокинетика препарата, обуславливает его высокую концентрацию в просвете кишечника, до 59% назначенной дозы поступает в желчь. Режим дозирования тигециклина особенный. Начальная доза препарата для взрослых составляет 100 мг вводят в/в капельно в течение 30-60 мин., далее по 50 мг через каждые 12 ч. Продолжительность терапии определяется степенью тяжести инфекции и клинической реакцией больного на лечение и составляет в среднем 5-14 дней.

Несмотря на высокую эффективность, показания для лечения CDI тигециклином должны быть ограничены из-за широкого спектра активности препарата и возможности формирования антибиотикорезистентности других микроорганизмов.

В Российской Федерации традиционно для лечения клостридиального колита используют Альфа нормикс (Рифаксимин), хотя в рекомендациях американской ассоциации гастроэнтерологов 2013 года по лечению CDI его применение не регламентировано.

Помимо перечисленных ранее, скоро в спектр препаратов для лечения CDI может быть включен кадазолит, являющийся антибиотиком из группы оксазолидинона, проходящий в настоящее время клинические испытания. В Российской Федерации кадазолит не зарегистрирован.

Альтернативным антибиотикотерапии методом лечения CDI является трансплантация фекальной микробиоты. Данный метод применяется в основном для лечения тяжёлых и рецидивных форм заболевания, при неэффективности стандартной терапии. Остается дискуссионным вопрос об обеспечении безопасности пациента от патогенной микробиоты, включая вирусы, бактерии, грибы. Так и возможной генетической нагрузке, получаемой от реципиента (лейкоциты, кишечный эпителий и др.).

Использование бактериофагов является важным направлением в лечении CDI. Фаг специфичен и направлен на определённый микроорганизм, при этом никак не влияя на другие. Он размножается и обеспечивает постоянную популяцию в просвете кишечника. Способность проникать через биоплёнки выгодно отличает фаг от антибактериальных препаратов. Трудоёмкость его культивирования обуславливает небольшое количество работ, посвященных этому вопросу.

Применение пробиотиков может значительно снизить заболеваемость антибиотик-ассоциированной диареей и является эффективным средством для лечения CDI. *Saccharomyces boulardi*, *Lactobacillus rhamnosus* GG и пробиотические смеси обладают профилактическим действием и могут помочь предотвратить развитие антибиотико-

ассоциированной диареи, *Saccharomyces boulardi* проявляют свою эффективность в лечении CDI.

Перспективным направлением в профилактике и лечении CDI, является использование аутоштаммов *Lactobacillus spp.* с лабораторной оценкой их антагонистической активности против *Clostridium spp.*, включая *Clostridium difficile*. Методика является трудоёмкой, но весьма эффективной и безопасной.

В тяжёлых случаях при возникновении осложнений CDI, таких как перфорация, токсическая дилатация, при неэффективности консервативной терапии требуется экстренная операция. Вопрос об объёме оперативного вмешательства решается индивидуально, исходя из объёма поражения толстой кишки. Описаны операции с выведением кишечной стомы, последние использовались в качестве возможного пути введения препаратов для лечения CDI.

4. Реабилитация

Пациенты с CDI в анамнезе, должны знать, что они имеют высокий риск рецидива заболевания. Применения антибактериальных препаратов у данной группы строго по показаниям с учётом данных оценки чувствительности *Clostridium difficile* к антимикробным препаратам. После проведения эффективной этиотропной терапии требуется качественная и количественная оценка состава кишечной микробиоты. В случае обнаружения низкого содержания бифидо- и лактобактерий, низкой антагонистической активности лактофлоры, либо её отсутствие, требуется назначение пробиотических, пребиотических и синбиотических препаратов.

Больным, у которых выполнялось хирургическое лечение, возможно проведение реконструктивно-восстановительных операций, однако последние выполняют при купировании воспаления в слизистой толстой кишки.

5. Профилактика

Профилактические мероприятия чрезвычайно важны в борьбе с CDI.

Способность *Clostridium difficile* к образованию спор и биопленок являются основными факторами, влияющими на распространение микроорганизма. Мероприятия, направленные на предупреждение реализации этих путей, могут быть весьма эффективны в борьбе с клостридиальной инфекцией.

Выделяют первичную и вторичную профилактику клостридиальной инфекции.

Первичная профилактика – система мер, направленных на предупреждение возникновения и воздействия факторов риска развития заболевания на организм. К ней причисляют вакцинацию, рациональный режим труда и отдыха, качественное питание, физи-

ческую активность, охрану окружающей среды и т. д.

К мерам вторичной профилактики – относят комплекс мероприятий, направленных на устранение факторов риска, которые в условиях стресса, ослабления иммунитета, чрезмерных нагрузок на любые другие функциональные системы организма могут привести к возникновению, обострению и рецидиву заболевания. Наиболее эффективным методом вторичной профилактики считается диспансеризация, как комплексный метод раннего выявления заболеваний, динамического наблюдения, направленного лечения, рационального последовательного оздоровления.

Учитывая фекально-оральный механизм передачи *Clostridium difficile*, необходимо тщательно следить за гигиеной рук медицинского персонала. Мытье рук с мылом и применение медицинских перчаток является эффективным мероприятием для уничтожения спор *Clostridium difficile*, чем использование спиртовых антисептиков.

Доказана эффективность бактерицидного и спороцидного действия аэрозоля 7,5% перекиси водорода на CD, полученного с помощью специальной автоматизированной системы для дезинфекции воздуха и поверхностей. После воздействия аэрозоля перекиси водорода в течение 3 часов в помещении регистрируется гибель всех спор микроорганизма.

Так же доказана эффективность импульсной ксеноновой ультрафиолетовой установки для дезинфекции поверхностей от спор *Clostridium difficile*.

Перспективным методом профилактики CDI может стать создание вакцины.

Список литературы

1. Ивашкин В. Т., Шельгин Ю. А., Абдулганиева Д. И., Абдулхаков Р. А., Алексеева О. П., Ачкасов С. И., Барановский А. Ю., Белоусова Е. А., Головенко О. В., Григорьев Е. Г., Костенко Н. В., Лапина Т. Л., Маев И. В., Москалёв А. И., Низов А. И., Николаева Н. Н., Осипенко М. Ф., Павленко В. В., Парфёнов А. И., Полуэктова Е. А., Румянцев В. Г., Тимербулатов В. М., Тertyчный А. С., Ткачёв А. В., Трухманов А. С., Халиф И. Л., Хубезов Д. А., Чашкова Е. Ю., Шифрин О. С., Щукина О. Б. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению взрослых больных язвенным колитом. Российский журнал гастроэнтерологии гепатологии и колопроктологии 2015; 25(1):48-65.
2. Ивашкин В. Т., Шельгин Ю. А., Абдулганиева Д. И., Абдулхаков Р. А., Алексеева О. П., Ачкасов С. И., Барановский А. Ю., Белоусова Е. А., Головенко О. В., Григорьев Е. Г., Костенко Н. В., Низов А. А., Николаева Н. Н., Осипенко М. Ф., Павленко В. В., Парфёнов А. И., Полуэктова Е. А., Румянцев В. Г., Тимербулатов В. М., Ткачёв А. В., Халиф И. Л., Хубезов Д. А., Чашкова Е. Ю., Шифрин О. С., Щукина О. Б. Рекоменда-

ции Российской гастроэнтеро-логической ассоциации и Ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению взрослых пациентов с болезнью Крона. <http://www.gastro.ru/>.

3. Корнеева О. Н., Ивашкин В. Т. Антибиотикоассоциированный колит: патоморфология, клиника, лечение. Российский журнал гастроэнтерологии гепатологии и колопроктологии 2007; 17(3):65-70.
4. Лобзин Ю. В., Захаренко С. М., Иванов Г. А. Современные представления об инфекции *Clostridium difficile*. Клиническая микробиология и антимикробная терапия, № 3, Том 4, 2002, С. 200-232.
5. Рациональная фармакотерапия заболеваний органов пищеварения / Под ред. В. Т. Ивашкина. М.: Литтерра, 2011; 522-6.
6. Шептулин А. А. Рефрактерные и рецидивирующие формы колита, ассоциированного с *Clostridium difficile*. Российский журнал гастроэнтерологии гепатологии и колопроктологии 2011; 21(2):50-3.
7. Wright Donna F .R. Largest ever European clinician consensus report on *Clostridium difficile* infection provides recommendations for improved management of CDI *pressemitteilung astellas EMEA*. 2014.
8. Shah D. N. et al. Economic burden of primary compared with recurrent *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients: a prospective cohort study. // *J. Hosp. Infect.* Elsevier, 2016. Vol. 93, № 3. P. 286-289.
9. McFarland L. V. Emerging therapies for *Clostridium difficile* infections // *Expert Opin. Emerg. Drugs.* Taylor & Francis, 2011. Vol. 16, № 3. P. 425-439.
10. Kutty P. Risk factors for and estimated incidence of community-associated *Clostridium difficile* infection, North Carolina, USA // *CME*. 2010.
11. Knight D. R. et al. Diversity and evolution in the genome of *clostridium difficile* // *Clin. Microbiol. Rev.* 2015. Vol. 28, № 3. P. 721-741.
12. Tschudin-Sutter S. et al. Growth Patterns of *Clostridium difficile* – Correlations with Strains, Binary Toxin and Disease Severity: A Prospective Cohort Study // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, № 9. P. e0161711.
13. Judith A.; Brien et al. The emerging infectious challenge of *Clostridium difficile*-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. // *Infect. Control & Hosp. Epidemiol.* Cambridge University Press, 2007. Vol. 28, № 11. P. 1219-1227.
14. Arimoto J. et al. Diagnostic test accuracy of glutamate dehydrogenase for *Clostridium difficile*: Systematic review and meta-analysis // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6. P. 29754

15. Na X. et al. A multi-center prospective derivation and validation of a clinical prediction tool for severe *Clostridium difficile* infection // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 4.
16. Kurti Z. et al. Burden of *Clostridium difficile* infection between 2010 and 2013: Trends and outcomes from an academic center in Eastern Europe. // World J. Gastroenterol. 2015. Vol. 21, № 21. P. 6728-6735.
17. Kazanowski M. et al. *Clostridium difficile*: Epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities - A systematic review // Tech. Coloproctol. 2014. Vol. 18, № 3. P. 223-232.
18. Hassan S.A. et al. Hospital-acquired *Clostridium difficile* infection among patients with type 2 diabetes mellitus in acute medical wards // J. R. Coll. Physicians Edinb. 2013. Vol. 43, № 2. P. 103-107.
19. Martin J., Monaghan T., Wilcox M. H. *Clostridium difficile* infection: advances in epidemiology, diagnosis and understanding of transmission. // Nat. Rev. Gastro. Hep. Nature Publishing Group, 2016. Vol. In press
20. Na X. et al. A multi-center prospective derivation and validation of a clinical prediction tool for severe *Clostridium difficile* infection // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 4.
21. Benedek O., Podbielski A., Warnke P. Laboratory experience with the liaison analyzer in the diagnosis of *Clostridium difficile* -associated diarrhea // Eur. J. Microbiol. Immunol. 2016. Vol. 6, № 3. P. 215-218.
22. Turgeon D. K. et al. Six Rapid tests for direct detection of *Clostridium difficile* and its toxins in fecal samples compared with the fibroblast cytotoxicity assay // J. Clin. Microbiol. 2003. Vol. 41, № 2. P. 667-670.
23. Yoldas O. et al. A diagnostic algorithm for the detection of *Clostridium difficile*-associated diarrhea // Balkan Med. J. 2016. Vol. 33, № 1. P. 80-86.
24. Russello G. et al. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* associated diarrhoea and molecular characterization of clinical isolates. // New Microbiol. 2012. Vol. 35. P. 307-316.
25. Beneš J. et al. [Diagnosis and therapy of *Clostridium difficile* infection: Czech national guidelines]. // Klin. Mikrobiol. Infekc. Lek. 2014. Vol. 20, № 2. P. 56-66.
26. LaSala P. R. et al. Comparison of analytical and clinical performance of three methods for detection of *Clostridium difficile* // Arch. Pathol. Lab. Med. College of American Pathologist 325 Waukegan Rd, Northfield, IL 60093, 2012. Vol. 136, № 5. P. 527-531.
27. Johansson K., Karlsson H., Norén T. *Clostridium difficile* infection diagnostics - evaluation of the *C. DIFF* Quik Chek Complete assay, a rapid enzyme immunoassay for detection of toxigenic *C. difficile* in clinical stool samples // APMIS. 2016. Vol. 124, № 11. P. 1016-1020.
28. Fenner L. et al. Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of *Clostridium difficile*

- // J. Clin. Microbiol. Am. Soc. Microbiol., 2008. Vol. 46, № 1. P. 328-330.
29. Burnham C.-A. D., Carroll K. C. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories. // Clin. Microbiol. Rev. American Society for Microbiology, 2013. Vol. 26, № 3. P. 604-630.
 30. Moon H.-W. et al. Comparison of diagnostic algorithms for detecting toxigenic *Clostridium difficile* in routine practice at a tertiary referral hospital in Korea // PLoS One. 2016. Vol. 11, № 8. P. e0161139.
 31. Kachrimanidou M., Malisiovas N. *Clostridium difficile* Infection: A comprehensive review // Crit. Rev. Microbiol. 2011. Vol. 37, № 3. P. 178-187.
 32. Collins D. A., Elliott B., Riley T. V. Molecular methods for detecting and typing of *Clostridium difficile* // Pathology. 2015. Vol. 47, № 3. P. 211-218.
 33. Ananthakrishnan A. N., Issa M., Binion D. G. *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease // Med. Clin. North Am. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 94, № 1. P. 135-153.
 34. Binnicker M. J. Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection: Performance, result interpretation, and cost-effectiveness // J. Clin. Microbiol. 2015. Vol. 53, № 12. P. 3723-3728.
 35. Cunningham S. A. et al. Three-hour molecular detection of *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia* and *Shigella* species in feces with accuracy as high as that of culture // J. Clin. Microbiol. 2010. Vol. 48, № 8. P. 2929-2933.
 36. Karre T. et al. Comparison of two commercial molecular assays to a laboratory-developed molecular assay for diagnosis of *Clostridium difficile* infection // J. Clin. Microbiol. 2011. Vol. 49, № 2. P. 725-727.
 37. Buckwalter S. P. et al. Real-time qualitative PCR for 57 human adenovirus types from multiple specimen sources // J. Clin. Microbiol. 2012. Vol. 50, № 3. P. 766-771.
 38. Buss S. N. et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis // J. Clin. Microbiol. 2015. Vol. 53, № 3. P. 915-925.
 39. Kapusinszky B., Minor P., Delwart E. Nearly constant shedding of diverse enteric viruses by two healthy infants // J. Clin. Microbiol. 2012. Vol. 50, № 11. P. 3427-3434.
 40. Mattila E. et al. A randomized, double-blind study comparing *Clostridium difficile* immune whey and metronidazole for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: Efficacy and safety data of a prematurely interrupted trial // Scand. J. Infect. Dis. Taylor & Francis, 2008. Vol. 40, № 9. P. 702-708.
 41. Aguado J. M. et al. Highlighting clinical needs in *Clostridium difficile* infection: the views of European healthcare professionals at the front line. // J. Hosp. Infect. Elsevier, 2015. Vol.

- 90, № 2. P. 117-125.
42. Turgeon D. K. et al. Six Rapid Tests for direct detection of *Clostridium difficile* and its toxins in fecal samples compared with the fibroblast cytotoxicity assay // J. Clin. Microbiol. 2003. Vol. 41, № 2. P. 667-670.
 43. Le R., Wallet G. F. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection // Ann. Biol. Clin. Synthèse Ann Biol Clin. 2013. Vol. 71, № 714. P. 395-400.
 44. Martin-Verstraete I., Peltier J., Dupuy B. The regulatory networks that control *Clostridium difficile* toxin synthesis // Toxins (Basel). 2016. Vol. 8, № 5. P. 1-24.
 45. Bomers M. K. et al. Using a dog's superior olfactory sensitivity to identify *Clostridium difficile* in stools and patients: proof of principle study // Bmj. 2012. Vol. 345, P. e7396.
 46. Maurer M. et al. Detection of bacteriuria by canine olfaction // Open Forum Infect. Dis. 2016. Vol. 3, № 2. P. ofw051.
 47. Novais R. C., Thorstenson Y. R. The evolution of Pyrosequencing?? for microbiology: From genes to genomes // J. Microbiol. Methods. Elsevier B. V., 2011. Vol. 86, № 1. P. 1-7.
 48. Ley R. E., Peterson D. A., Gordon J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine // Cell. 2006. Vol. 124, № 4. P. 837-848.
 49. Yoon S. S., Kim E. K., Lee W. J. Functional genomic and metagenomic approaches to understanding gut microbiota-animal mutualism // Curr. Opin. Microbiol. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 24. P. 38-46.
 50. Brown J. H. et al. Translating the human microbiome // Nat. Biotechnol. Nature Publishing Group, 2013. Vol. 31, № 4. P. 304-308.
 51. Martín R. et al. The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. // Virulence. 2014. Vol. 5, № 3. P. 413-423.
 52. Kostic A. D., Xavier R. J., Gevers D. The Microbiome in inflammatory bowel diseases: current status and the future ahead // Gastroenterology. 2015. Vol. 146, № 6. P. 1489-1499.
 53. Norman J. M. et al. Disease-specific Alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease // NIH Public Access. 2016. Vol. 160, № 3. P. 447-460.
 54. Qin J. et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes // Nature. Nature Publishing Group, 2012. Vol. 490, № 7418. P. 55-60.
 55. Karre T. et al. Comparison of two commercial molecular assays to a laboratory-developed molecular assay for diagnosis of *Clostridium difficile* infection // J. Clin. Microbiol. 2011. Vol. 49, № 2. P. 725-727.
 56. Buckwalter S. P. et al. Real-time qualitative PCR for 57 human adenovirus types from multiple specimen sources // J. Clin. Microbiol. 2012. Vol. 50, № 3. P. 766-771.
 57. Benedek O., Podbielski A., Warnke P. Laboratory experience with the liaison analyzer in

- the diagnosis of *Clostridium difficile* -associated diarrhea // Eur. J. Microbiol. Immunol. 2016. Vol. 6, № 3. P. 215-218.
58. Hassan S. A. et al. Hospital-acquired *Clostridium difficile* infection among patients with type 2 diabetes mellitus in acute medical wards // J. R. Coll. Physicians Edinb. 2013. Vol. 43, № 2. P. 103-107.
59. Martin J., Monaghan T., Wilcox M. H. *Clostridium difficile* infection: advances in epidemiology, diagnosis and understanding of transmission. // Nat. Rev. Gastro. Hep. Nature Publishing Group, 2016. Vol. In press.
60. A practical guidance document for the laboratory detection of toxigenic *Clostridium difficile*.-Washington, DC: American Society for Microbiology, 2010. -Режим доступа: <http://www.asm.org/images/pdf/Clinical/clostridiumdifficile9-21.pdf>.
61. Barbut F., Kajzer C., Planas N. et al. Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay and toxigenic culture for the diagnosis of *Clostridium difficile* – associated diarrhea. J. Clin Microbiol 1993; 31:963-71
62. Crobach M. J., Dekkers O. M., Wilcox M. H., Kuijper E. J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin Microbiol Infect. 2009; 15 (12): 1053-1066.
63. Gerding D. N., Johnson S., Peterson L. R., Mulligan M. E., Silva J. Jr. *Clostridium difficile* – associated diarrhea and colitis. Infect Control Hosp Epidemiol 1995; 16:459-77.
64. Kato N., Ou C-Y., Kato H., et al. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1991; 29:33-7
65. Peterson L. R., Holter J. J., Shanholtzer C. J., Garrett C. R., Gerding D. N. Detection of *Clostridium difficile* toxin A (enterotoxin) and B (cytotoxin) in clinical specimens. Evaluation of a latex agglutination test. Am. J. Clin. Pathol. 1986; 86:208-11
66. Peterson L. R., Kelly J. P., Nordbrock H. A. Role of culture and toxin detection in laboratory testing for diagnosis of *Clostridium difficile* – associated diarrhea. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996; 15: 330-6.
67. Peterson L. R., Olson M. M., Shanholtzer C. J., et al. Results of a prospective, 18-month clinical evaluation of culture, Cytotoxin testing and culturette brand (CDT) latex testing in the diagnosis of *Clostridium difficile* – associated diarrhea. Diagn Microbial Infect Dis 1988; 10: 85-91.
68. Sambol S. P., Merrigan M. M., Lyerly D., Gerding D. N., Johnson S. Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease. Infect Immun 2000; 68:5480-7

69. Staneck J. L., Weckbach L. S., Allen S. D., Siders J. A., Gilligan P. H. et al. Multicenter evaluation of four method for *Clostridium difficile* detection: ImmunoCard *C. difficile*, cytotoxin assay, culture, and latex agglutination. J. Clin Microbiol 1996; 34:2718-21.

Приложение А1. Состав Рабочей группы

Разработаны коллективом авторов:

- Алёшкин В. А. Заслуженный деятель науки России, доктор биологических наук, профессор, директор ФБУН «Московский научно-исследовательский эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора
- Селькова Е. П. доктор медицинских наук, зам. директора ФБУН «Московский научно-исследовательский эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора
- Миронов А. Ю. доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела микробиологии ФБУН «Московский научно-исследовательский эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора
- Гренкова Т. А. кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФБУН «Московский научно-исследовательский эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора
- Шелыгин Ю. А. Заслуженный врач России, дважды Лауреат Премии Правительства РФ в области науки и техники, Главный внештатный специалист-колопроктолог Министерства здравоохранения России, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А. Н. Рыжих» Минздрава России
- Сухина М. А. кандидат биологических наук, руководитель отдела микробиологических и иммунологических исследований ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А. Н. Рыжих» Минздрава России
- Ачкасов С. И. доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела онкологии и хирургии ободочной кишки ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А. Н. Рыжих» Минздрава России
- Сафин А. Л. аспирант ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А. Н. Рыжих» Минздрава России

Экспертный совет: Брико Н. И. - академик РАН, д.м.н., проф., зав. кафедрой эпидемиологии и доказательной медицины ГБОУ ВПО ПМГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России, главный внештатный специалист эпидемиолог Минздрава России, председатель НП «НАСКИ» (Москва); Брусина Е. Б. - д.м.н., проф., зав. кафедрой ГБОУ ВПО КемГМА Минздрава России, главный внештатный специалист эпидемиолог Минздрава России в Сибирском Федеральном округе и в Кемеровской области (Кемерово);

Зуева Л. П. - д.м.н., проф., зав. кафедрой ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России, главный внештатный специалист эпидемиолог Минздрава России в Северо-Западном Федеральном округе (Санкт-Петербург); Стасенко В. Л. - д.м.н., проф., зав. кафедрой эпидемиологии ГБОУ ВПО ОГМУ Минздрава России, главный внештатный специалист эпидемиолог Минздрава Омской области (Омск); Фельдблюм И. В. - д.м.н., проф., зав. кафедрой эпидемиологии с курсом гигиены и эпидемиологии ФПК и ППС ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е. А. Вагнера Минздрава России (Пермь).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Согласованы на заседании Профильной комиссии Министерства здравоохранения Российской Федерации по эпидемиологии _____ 2017, протокол № ____.

Утверждены на Общем собрании членов Национальной ассоциации специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи __. __. 2017, протокол № __, в рамках *Всероссийской конференции с международным участием специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи*, . __. 2017 г., г. Пермь.

Приложение А2. Методология разработки клинических рекомендаций

Методы, использованные для сбора/селекции доказательств: поиск в электронных базах данных, материалы собственных исследований, электронная база данных результатов микробиологических показателей, положенных в основу отбора критериев и их референсных значений.

Описание методов, использованных для сбора/селекции доказательств:

Доказательной базой для рекомендаций являются публикации открытого доступа из ресурса Всемирной организации здравоохранения, публикации, вошедшие в Кокрановскую библиотеку, базы данных MedLine, EuroFlu, ECDC, PubMed, SciencDirect, EMBASE, eLibrary. Глубина поиска составляет более 10 лет. При отборе публикаций, как потенциальных источников доказательств, использованная в каждом исследовании методология изучалась для того, чтобы убедиться в её валидности. Результат изучения влиял на уровень доказательств, присваиваемый публикации, что в свою очередь влияет на силу вытекающих из неё рекомендаций.

Методы, использованные для оценки качества и силы доказательств:

- консенсус экспертов;
- оценка значимости в соответствии с рейтинговой схемой (таблица 3).

Таблица 3

Рейтинговая схема для оценки силы рекомендаций

Уровни доказательств	Описание
1a	Доказательства, полученные в мета-анализах рандомизированных исследований
1b	Доказательства, полученные как минимум в одном рандомизированном исследовании
2a	Доказательства, полученные как минимум в одном хорошо спланированном контролируемом исследовании без рандомизации
2b	Доказательства, полученные как минимум в одном хорошо спланированном полуэкспериментальном исследовании другого типа
3	Доказательства, полученные в хорошо спланированных не экспериментальных исследованиях, таких как сравнительные, корреляционные исследования и описания, клинических случаев (случай-контроль)
4	Доказательства, полученные из отчётов экспертных комиссий, на основе мнений или клинического опыта авторитетных специалистов

Методы, использованные для анализа доказательств:

- обзоры опубликованных мета-анализов;
- систематические обзоры с таблицами доказательств.

Описание методов, использованных для анализа доказательств.

Методологическое изучение базировалось на нескольких ключевых вопросах, сфокусированных на тех особенностях дизайна исследования, которые оказывают су-

ществленное влияние на валидность результатов и выводов. При отборе публикаций, как потенциальных источников доказательств, использованная в каждом исследовании методология изучалась для того, чтобы убедиться в её валидности. Результат изучения влиял на уровень доказательств, присваиваемый публикации, что в свою очередь влияло на силу вытекающих из неё рекомендаций.

Для исключения влияния на процесс оценки субъективного фактора каждое исследование оценивалось независимо, по меньшей мере, двумя несвязанными членами рабочей группы. Какие-либо различия в оценках обсуждались группой в полной составе. Для достижения консенсуса привлекался независимый эксперт.

Настоящие рекомендации в предварительной версии рецензированы независимыми экспертами, которые отметили доступность в понимании представленного материала и доказательств (таблица 4).

Таблица 4

Рейтинговая схема для оценки силы рекомендаций

Сила	Описание
A	По меньшей мере, один мета-анализ, систематический обзор, или РКИ, оцененные, как 1++, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие устойчивость результатов или группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные как 1+, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов
B	Группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные как 2++, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов или экстраполированные доказательства из исследований, оцененных как 1++ или 1+
C	Группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные, как 2+, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов; или экстраполированные доказательства из исследований, оцененных как 2++
D	Доказательства уровня 3 или 4 или экстраполированные доказательства из исследований, оцененных как 2+

Таблицы доказательств: таблицы доказательств заполнялись членами рабочей группы.

Методы, использованные для формулирования рекомендаций:

консенсус экспертов.

Индикаторы доброкачественной практики (Good Practice Points - GPP):

Рекомендуемая доброкачественная практика базируется на практическом опыте членов рабочей группы по разработке рекомендаций.

Экономический анализ: экономический анализ стоимости не проводился и публикации по экономике не анализировались.

Метод валидации рекомендаций:

➤ внешняя экспертная оценка;

➤ внутренняя экспертная оценка.

Описание метода валидации рекомендаций:

Настоящие рекомендации в предварительной версии рецензированы независимыми экспертами, которых просили прокомментировать прежде всего то, насколько интерпретация доказательств доступна для понимания и порядок действий выполним в практике.

Получены комментарии со стороны врачей многопрофильных и специализированных медицинских организаций, оказывающих медицинскую помощь детскому и взрослому населению, в отношении доходчивости изложения рекомендаций и их оценки важности рекомендаций, как рабочего инструмента повседневной практики.

Комментарии, полученные от экспертов, тщательно систематизировались и обсуждались членами рабочей группы. Каждый пункт анализировался, вносимые в рекомендации изменения регистрировались.

Рабочая группа:

Для окончательной редакции и контроля качества ФКР повторно проанализированы членами рабочей группы, которые пришли к заключению, что все замечания и комментарии экспертов приняты во внимание, риск систематических ошибок при разработке рекомендаций сведён к минимуму, рекомендации не противоречат действующим нормативно-правовым актам, направленным на охрану здоровья человека и санитарно-эпидемиологическое благополучие населения (ст. 41 Конституции Российской Федерации, ФЗ от 21. 11. 2011 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», ФЗ от 30. 03. 1999 «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

Основные рекомендации:

Сила рекомендаций (A-D) приводится в табл. 3 и частично при изложении текста ФКР.

Таблица 5

Сила рекомендаций	Тип рекомендаций	Сила
	Тест-системы, используемые для определения фермента ГДГ <i>C. difficile</i>	C
	Тест-системы, используемые для определения токсинов <i>C. difficile</i>	C
	Питательные среды для культивирования <i>C. difficile</i>	B
	Основные требования, предъявляемые при определении чувствительности <i>C. difficile</i> к антибактериальным препаратам	C
	Интерпретация результатов	C, GPP
	Оценка методики	C

Целевая аудитория данных клинических рекомендаций:

1. Врачи общей практики
2. Терапевты

3. Гастроэнтерологи
4. Инфекционисты
5. Педиатры
6. Бактериологи
7. Врачи КДЛ
8. Клинические эпидемиологи
9. Врачи различных специальностей с целью осуществления диагностики и профилактики заболеваний, сопровождающихся микроэкологическими нарушениями, в том числе для мониторинга дисбиозов желудочно-кишечного тракта в медицинской организации как компонента эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи.

Приложение А3. Связанные документы

1. Федеральный закон от 21 ноября 2011 года № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» с изменениями и дополнениями.
2. Федеральный закон от 31.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
3. СанПиН 2.1.3.2630-10. «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность».
4. СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
5. СП 1.2.036-95 «Санитарно-эпидемиологические правила «Порядок учёта, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».
6. СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
7. Национальный Стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Требования безопасности. ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003).
8. Национальный Стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности. ГОСТ Р (ИСО 15189-2009).
9. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».