

Clostridium difficile-ассоциированная болезнь*

В.Т. Ивашкин¹, О.С. Шифрин¹, А.С. Тertychny², Е.А. Полуэктова¹,
Т.Л. Лапина¹, О.С. Ляшенко¹, К.В. Ивашкин¹

¹ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»
Минздрава РФ, кафедра пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета и НИО
инновационной терапии, Москва, Российская Федерация

²ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»
Минздрава РФ, кафедра патологической анатомии, Москва, Российская Федерация

Clostridium difficile-associated disease*

V.T. Ivashkin¹, O.S. Shifrin¹, A.S. Tertychny², Ye.A. Poluektova¹, T.L. Lapina¹,
O.S. Lyashenko¹, K.V. Ivashkin¹

¹ State educational government-financed institution of higher professional education
«Sechenov First Moscow state medical university», Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
Chair of internal diseases propedeutics, medical faculty, Scientific and educational clinical center of innovative therapy,
Moscow, the Russian Federation

² Chair of pathological anatomy, medical faculty, State educational government-financed institution
of higher professional education «Sechenov First Moscow state medical university», Moscow, the Russian Federation

Цель обзора. Обобщить накопленные сведения об инфекции *C. difficile*, диагностике, лечению и профилактике *C. difficile*-ассоциированной болезни.

Основные положения. *C. difficile* — плохо растущая на питательных средах, облигатно-анаэробная, грамположительная, спорообразующая, цитотоксинпродуцирующая палочка. Токсины А и В *C. difficile* — белковые молекулы, относящиеся к гликозилтрансферазам. Воздействие токсинов вызывает повреждение кишечной стенки и воспаление в ней вследствие нарушения кишечного эпителиального барьера, индукции провоспалительных цитокинов, апоптоза и некроза эпителиоцитов. Основным клиническим симптом *C. difficile*-ассоциированной болезни (в зависимости от степени ее тяжести) — диарея или диарея с кровью. Материал для обнаружения токсинов *C. difficile* — фекалии пациентов с диареей.

The aim of review. To generalize accumulated data on *C. difficile* infection, diagnostics, treatment and prevention of *C. difficile*-associated disease.

Summary. *C. difficile* is unthrifty on breeding grounds, obligate anaerobic, gram-positive, spore-forming, cytotoxin-producing bacterium. *C. difficile* toxins A and B are protein molecules, classified as glycosyltransferases. Influence of toxins induces damage and inflammation of intestinal wall due to impairment of intestinal epithelial barrier, stimulation of proinflammatory cytokine production, apoptosis and necrosis of epithelial cells. Basic clinical symptom of *C. difficile*-associated disease is diarrhea or diarrhea with hematochezia (according to severity of the case). Feces of patients with diarrhea are sampled for *C. difficile* toxin detection.

Nowadays there are several laboratory diagnostic tests for Clostridial infection: testing for *C. difficile* glu-



*Статья подготовлена Рабочей группой по изучению микробиома Российской гастроэнтерологической ассоциации (РГА).

Полуэктова Елена Александровна — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник Научно-образовательного центра инновационной терапии, врач-терапевт отделения хронических заболеваний кишечника и поджелудочной железы Клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им В.Х. Василенко УКБ № 2 ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова». Контактная информация: poluektova@rambler.ru; 119991, Москва, ул. Погодинская, д. 1, стр. 1

Poluektova Yelena A. — MD, leading research associate, Scientific and educational clinical center of innovative therapy, physician of chronic bowel and pancreatic diseases department, Vasilenko Clinic of internal diseases propedeutics, gastroenterology and hepatology, UCH No 2, «Sechenov First Moscow state medical university», Ministry of Healthcare of the Russian Federation. Contact information: poluektova@rambler.ru; 119991, Moscow, Pogodinskaya street, 1, bld 1.

В настоящее время предлагается несколько лабораторных методов для диагностики клостридиальной инфекции — исследование глутаматдегидрогеназы *C. difficile*, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция для токсигенного штамма *C. difficile*. Однако ответ на вопрос, какой из данных методов можно считать «золотым стандартом», пока не получен.

Препаратами для лечения больных служат метронидазол, ванкомицин, диоктаэдрический смектит, пробиотики. Для уменьшения риска развития клостридиальной инфекции рекомендовано рациональное назначение антибактериальных препаратов, сокращение по возможности сроков госпитализации, особенно у лиц старше 65 лет. В медицинских учреждениях должна проводиться предварительная, текущая и генеральная уборка, а также обработка рук медицинского персонала и медицинского инвентаря в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативами.

Заключение. С начала XXI века во многих странах мира отмечается стремительное нарастание случаев *C. difficile*-ассоциированной болезни. Рассматриваемая патология служит наиболее частой причиной внутрибольничной диареи, приводящей к значительному числу смертельных исходов. В этой связи представляется крайне важным уметь своевременно диагностировать, лечить данное заболевание и осуществлять его профилактику.

Ключевые слова: *C. difficile*-ассоциированная болезнь, псевдомембранозный колит, токсины А и В *C. difficile*, лечение, ванкомицин, метронидазол, диоктаэдрический смектит, Флорасан Д.

tamate dehydrogenase, enzyme-linked immunoassay, polymerase chain reaction for toxigenic strain of *C. difficile*. However, which of these methods may be considered to be «the gold standard» is unclear yet.

Metronidazole, vancomycin, dioctaedric smectite and probiotics are used for treatment of *C. difficile* infection. Rational use of antibiotics, shortening of hospital stay terms whenever possible, especially for patients of 65 years of age and older is recommended to reduce the risk of clostridial infection development. Preliminary, routine and general cleaning should be carried out in medical institutions as well as the cleaning of hands of medical personnel and medical stock according to sanitary-and-epidemiologic rules and specifications.

Conclusion. From the beginning of XXI century in many countries of the world prompt increase of *C. difficile*-associated disease cases is marked. This disease is the most frequent cause of intrahospital diarrhea resulting in significant mortality. This is why it is extremely important to be able to diagnose, treat in due terms this disease and to carry out prophylactic procedures.

Key words: *C. difficile*-associated disease, pseudomembranous colitis, toxins A and B of *C. difficile*, treatment, vancomycin, metronidazole, dioctaedric smectite, florasan D.

В 1935 г. Ivan C. Hall и Elizabeth O'Toole впервые описали *Bacillus difficilis*, плохо растущую на питательных средах, облигатно-анаэробную, грамположительную, спорообразующую, цитотоксинпродуцирующую палочку, выделенную из *желудочно-кишечного тракта* (ЖКТ) здорового новорожденного [31]. Свое название она получила в связи с трудностями культивирования и выделения в чистом виде.

В дальнейшем была установлена принадлежность бактерии к классу *Clostridia*, в связи с чем название изменилось на *Clostridia difficile* (*C. difficile*). Однако вследствие того, что микроорганизм был получен из фекалий здоровых новорожденных, не предполагалось наличия у него патогенных свойств.

В 1978 г. J.D. Bartlett и соавт. обнаружили *C. difficile* в образцах фекалий четырех пациентов с псевдомембранозным колитом и у одного с антибиотикоассоциированной диареей, развившейся после назначения клиндамицина. Выделенная культура бактериальных клеток вводилась лабораторным животным (грызунам) интрацекально, что приводило в последующем к возникновению

у них воспаления в кишечной стенке. Полученные в данном исследовании результаты позволили сделать вывод о причастности *C. difficile* к развитию *псевдомембранозного колита* (ПМК) — заболевания, связанного с применением антибиотиков.

Микробиологические особенности бактерии *C. difficile*

В 2001–2003 гг. в Голландии проводилось когортное исследование KOALA, в рамках которого у 1032 детей в возрасте от одного до шести месяцев исследовались образцы кала. В фекальной микрофлоре *Bifidobacteria* были выявлены у 98,6%, *E. coli* — у 87,7%, *Bacteroides fragilis* — у 81,6%, *C. difficile* — у 25,0% и *Lactobacilli* — у 32,4% из числа обследованных. Причем у детей, появившихся на свет при помощи кесарева сечения, в сравнении с младенцами, рожденными через естественные родовые пути, в образцах кала несколько реже выявлялись *Bifidobacteria* и достоверно чаще *C. difficile*; у детей, находившихся на искусственном вскармливании частота колонизации *C. difficile* была достоверно выше по сравнению с находившимися на грудном вскармливании (табл. 1).

Таблица 1

Состав фекальной микрофлоры (%) у новорожденных в зависимости от способа родоразрешения и вида вскармливания [58]

Показатель	<i>Bifidobacteria</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. difficile</i>	<i>B. fragilis Group</i>	<i>Lactobacilli</i>
Естественные роды	99	94	26	85	34
Кесарево сечение	96	91	34	87	30
Грудное вскармливание	99	85	21	79	29
Искусственное вскармливание	97	94	33	88	41

Однако уже на втором году жизни кишечная микрофлора начинает изменяться и походить на микрофлору взрослого, но изменения ее протекают медленно и зависят от факторов внешней среды (контакта с энтеропатогенной флорой), особенностей питания, приема антибиотиков, нарушения взаимодействия бактериальных клеток с иммунной системой организма хозяина [20].

C. difficile определяется в составе кишечного микробиома в количестве не более 10^7 КОЕ/мл у 3–15% взрослых лиц. При этом бессимптомное носительство у здоровых взрослых, а также среди госпитализированных пациентов и больных, длительно находящихся в стационаре, составляет 3%, 20–30% и 50% соответственно [29]. Тем не менее наличие эндогенного резервуара не является обязательным условием формирования клинических симптомов *C. difficile*-ассоциированной болезни.

Основной путь передачи инфекции — фекально-оральный в результате загрязнения поверхностей и медицинского инвентаря как медицинским персоналом, так и инфицированными пациентами [16].

Существуют две формы жизни *C. difficile* — неактивная (споры) и активная (вегетативная). Споры бактерии могут выживать в неблагоприятной внешней среде, а также при применении распространенных методов стерилизации — высоких температур, химических веществ, ультрафиолетового облучения. Кроме того, споры устойчивы к воздействию антибиотиков, могут длительное время сохраняться в желудочно-кишечном тракте человека и в дальнейшем привести к рецидиву заболевания после эрадикации вегетативных форм микроорганизма [38]. Созревание до вегетативных форм происходит в анаэробной среде толстой кишки за счет воздействия солей желчных кислот (холат, таурохолат, гликохолат, деоксихолат) и L-глицина.

Для адаптации к среде обитания бактерия экспрессирует несколько факторов адгезии, таких как белки поверхностного слоя (*surface-layer proteins*, SLPs), жгутиковые белки FliC (*flagellin structural monomer*) и FliD (*flagellar cap protein*), Cwp66 (*cell-wall proteins 66*), адгезин, фибронектин-связывающий протеин Fbp68 (*fibronectin-binding protein 68*), белок теплового шока GroEL и некоторые гидролитические ферменты, такие

как Cwp84 (*cell-wall proteins 84*) [13, 33, 34, 67]. Причем белки поверхностного слоя (SLPs) играют главную роль в обеспечении бактериальной колонизации [13]. Так, в исследовании D. Drudy и соавт. показано, что высокий уровень антител IgM к SLPs был связан с достоверно меньшим риском рецидива *C. difficile*-ассоциированной диареи [23].

Прием антибиотиков вызывает нарушение состава микробиома толстой кишки, что снижает колонизационную резистентность и обеспечивает формирование «ниши» для колонизации *C. difficile*, приводит к изменению соотношения солей желчных кислот и холевой кислоты в толстой кишке, позволяя спорам прорасти в вегетативные формы [12, 57, 63]. Прием антисекреторных препаратов — ингибиторов протонной помпы (ИПП), H₂-блокаторов позволяет спорам проходить через желудок «транзитом» и беспрепятственно достигать благоприятных условий толстой кишки [26, 70]. Однако в литературе приводятся данные о том, что споры *C. difficile* устойчивы к воздействию кислой среды желудка, поэтому механизм влияния ИПП на развитие заболевания не до конца ясен. В исследовании *in vitro* было установлено, что снижение кислотности желудочного сока при применении ИПП может привести к увеличению экспрессии генов, отвечающих за продукцию бактериальных токсинов, и, следовательно, к росту их выработки [66].

Основными факторами вирулентности *C. difficile* (вирулентность — степень патогенности микроорганизма, его потенциальная возможность вызывать при благоприятных условиях специфический инфекционный процесс) служат токсин А (TcdA) и токсин В (TcdB). Это большие белковые молекулы (308 и 270 кДа соответственно), относящиеся к гликозилтрансферазам (гликозилтрансферазы — класс ферментов, катализирующих перенос моносахаридов от углевода-донора на молекулу-акцептор; таким образом устанавливаются гликозидные связи, в том числе с компонентами клеточной стенки). Гены, кодирующие токсины А и В, обладают 66%-ной идентичностью нуклеотидной последовательности. В исследованиях *in vivo* показано, что токсин В имеет более важное значение для вирулентности данного микроор-

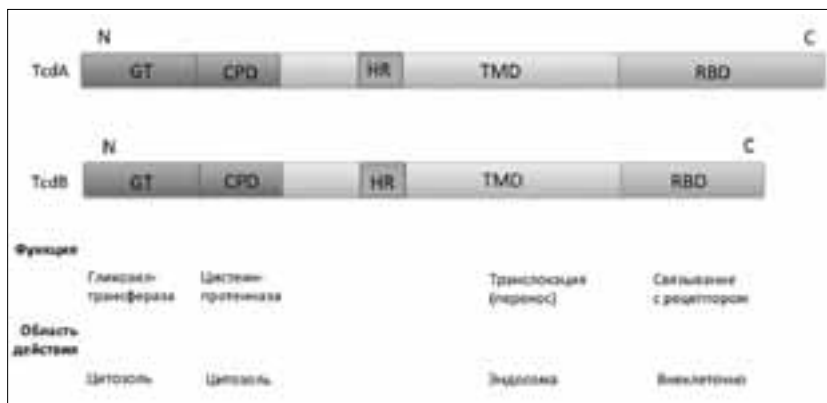


Рис. 1. Структура токсинов А и В *C. difficile*

TcdA — токсин А; TcdB — токсин В; GT (*glucosyltransferase domain*) — домен гликозилтрансферазы; CPD (*cysteine protease domain*) — домен цистеин протеиназы; HR (*hydrophobic region*) — гидрофобная область; TMD (*central translocation domain*) — центральный транслокационный домен; RBD (*receptor binding domain*) — рецепторсвязывающий домен

ганизма [6, 46]. Воздействие токсинов вызывает повреждение кишечной стенки и воспаление в ней вследствие нарушения кишечного эпителиального барьера, индукции провоспалительных цитокинов, апоптоза и некроза эпителиоцитов.

Оба токсина структурно похожи и включают следующие фрагменты:

- С-концевой *рецепторсвязывающий домен* (RBD), состоящий из повторяющихся *клуберидиальных олигопептидов* (CROPs), — отвечает за связывание токсина с клеточной стенкой, что приводит к рецепториндуцированному эндоцитозу;

- *центральный транслокационный домен* (TMD), содержащий *гидрофобную область* (HR), — облегчает проникновение N-конца через клеточную мембрану;

- аутокаталитический *цистеин протеиназный домен* (CPD) — способствует высвобождению домена N-концевой *гликозилтрансферазы* (GT) в цитозоль клетки-хозяина;

- N-концевой фрагмент гликозилтрансферазы — отличается способностью передавать остатки глюкозы от субстрата-донора УДФ-глюкозы (*уридиндифосфат глюкоза*) к радикалу треонина (*threonine residue* — Thr-37 в RhoA) и таким образом инактивировать внутриклеточные сигнальные белки, что способствует нарушению функций клетки [67, 68] (рис. 1).

Для проникновения в клетку токсины А и В используют различные типы рецепторов. Считается, что рецепторы для токсина В расположены в клетках-

мишенях (энтероцитах) базолатерально, а для токсина А — на верхушечных, апикальных участках. Однако точных данных о природе рецепторов не приводится.

После проникновения в кислую эндосомальную полость молекула токсина подвергается конформационным изменениям, что приводит к образованию пор в эндосомальной мембране и последующей транслокации через нее домена каталитической GT. Освобождение ферментной части гликозилтрансферазы в цитозоль происходит путем аутопротеолитического расщепления, которое, как считается, требует *инозитол-гексакисфосфата* (InsP6) — рис. 2.

Мишенями для токсинов А и В в клетке служат Rho

ГТФазы (семейство клеточных сигнальных белков, играющих важную роль в таких процессах, как клеточная пролиферация, апоптоз, экспрессия генов и др.). Описано около 20 Rho ГТФаз, в том числе RhoA (*Ras homolog gene family, member A*), Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin*

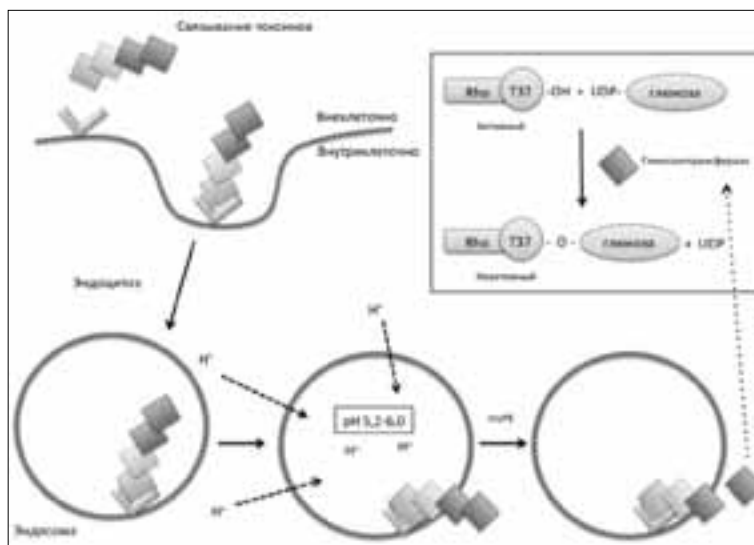


Рис. 2. Механизм действия токсинов А и В *C. difficile*

Токсины связываются с поверхностью эпителиальной клетки с помощью С-концевого рецепторсвязывающего домена. Связывание токсина вызывает интернализацию (*перемещение рецептора, связанного с доменом внутрь клетки*) с помощью клатрин-опосредованного эндоцитоза. Подкисление эндосомы создает поры, что позволяет димену *гликозилтрансферазы* (GT) переместиться в цитозоль. Воздействие домена цистеин протеазы с *инозитол-гексакисфосфатом* (InsP6) активизирует аутопротеолитическое расщепление, в результате чего гликозилтрансфераза выходит в цитозоль. Домен GT передает остаток глюкозы от субстрата-донора *уридиндифосфатглюкозы* (UDP) к треониновому остатку (Thr-37 в RhoA), тем самым инактивируя внутриклеточную Rho и Ras семейства ГТФаз (сигнальных белков)

substrate 1) и Cdc42 (*Cell division control protein 42 homolog*).

Проникая внутрь клетки путем рецепторопосредованного эндоцитоза, токсины А и В катализируют перенос глюкозы от УДФ-глюкозы к Thg-37 (*threonin 37*) в RhoA и к Thg-35 (*threonin 35*) в Rac1 и Cdc42, тем самым необратимо инактивируя эти сигнальные белки, что снижает функцию эпителиального барьера, поскольку ГТФазы — основные регуляторы плотных контактов. Следствием данного процесса служит разрушение цитоскелета и плотных контактов, повышение парацеллюлярной проницаемости и в результате гибель клетки. Повышение парацеллюлярной проницаемости обеспечивает выход форменных элементов крови, в том числе нейтрофилов, в просвет кишки, а также массивную секрецию жидкости.

В дополнение к нарушению плотных контактов воздействие токсина А приводит к отделению эпителиальной клетки от базальной мембраны (поверхностного эпителия, но не эпителия крипт) за счет связывания Src-тирозинкиназы колоноцитов, основного регулятора белков фокальных контактов (киназы фокальной адгезии, *focal adhesion kinase*) и паксиллина, которые не зависят от Rho-гликозилирования.

Кроме того, оба токсина индуцируют апоптоз и некроз эпителиальных клеток. По данным литературы, токсин А индуцирует апоптоз посредством активации каспаз 3, 6, 8 и 9, повреждения митохондрий и выделения цитохрома С. Токсин В способен индуцировать апоптоз за счет активации каспазы 3, а также каспаз-независимым путем. Некроз эпителия при воздействии токсина А происходит за счет индукции провоспалительных медиаторов — цитокинов (ИЛ-8), молекул адгезии, таких как ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), опосредованно обеспечивающих воспаление слизистой оболочки.

Нарушение барьера слизистой оболочки позволяет токсинам непосредственно воздействовать на иммунные клетки (тучные клетки, макрофаги) и нейроны, вызывая секрецию провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-8, ИЛ-1 β , TNF- α), нейропептидов и других медиаторов, что приводит к миграции нейтрофилов с последующей деструкцией и некрозом эпителиальных клеток [68].

Токсины *C. difficile* способны также изменить защитные свойства слоя слизи, покрывающей слизистую оболочку кишечника, вследствие снижения экзоцитоза муцина в муцинпродуцирующих (бокаловидных) клетках. Антимикробные пептиды, дефензины и каталепидины эпителиальных клеток хозяина могут значительно снизить токсин-индуцированное повреждение тканей. Так, при бессимптомном носительстве и первом эпизоде инфекции без рецидива в крови пациентов достаточно часто обнаруживаются TcdA-антитела

IgG в отличие от больных с выраженными симптомами заболевания и/или его рецидивирующим течением. Имеются также сообщения о наличии взаимосвязи между высоким уровнем TcdB-антител и более легким течением заболевания. Однако причина такой ассоциации остается недостаточно ясной. У лиц пожилого возраста, больных с сопутствующими заболеваниями, женщин и пациентов пониженного питания защитная реакция в отношении клостридиальной инфекции ослаблена [40, 43, 47].

Помимо этого, по данным литературы, с 1999 г. в странах Европы и Америки зафиксировано появление нового, гипервирулентного штамма *C. difficile*, которому было дано несколько названий в зависимости от способа его типирования — NAPI/B1/027 (рестрикционно-нуклеазный анализ), тип NAP1 (*North American pulsed-field gel electrophoresis type 1*) и риботип 027 (*полимеразная цепная реакция*, ПЦР) [50, 51]. К особенностям указанного штамма можно отнести резистентность к фторхинолонам и наличие мутированного гена *tcdC*, который, как было показано в исследованиях *in vivo*, отвечает за выработку в 16 раз больше токсина А и в 23 раза больше токсина В по сравнению с другими штаммами.

Кроме того, этот штамм продуцирует третий, бинарный, токсин CDT (*cytolethal distending toxin*), состоящий из двух независимых белковых цепей, — CDTa (ферментный компонент) и CDTb (связывающий компонент) [24, 73]. Хотя биологическое значение CDTa и b до сих пор не выяснено, в отдельных исследованиях было установлено, что очищенные CDT могут повышать адгезию *C. difficile* к эпителиальным клеткам кишечника путем формирования сетчатоподобной микротубулярной протрузии (*netlike microtube protrusion*) [30], вследствие чего штаммы, несущие данный токсин, вызывают более тяжелые случаи клостридиальной инфекции [28, 48].

В целом, *Clostridium difficile*-ассоциированная болезнь имеет широкий спектр клинических проявлений — от бессимптомного носительства, легкой, умеренной диареи до синдрома системной воспалительной реакции со смертельным исходом [9].

Эпидемиология инфекции *C. difficile*

С начала XXI века во многих странах мира отмечается стремительное нарастание случаев *C. difficile*-ассоциированной болезни [4, 5, 19, 52, 61].

Так, в 2007 г. в США клостридиальная инфекция оказалась главной причиной смертельных исходов у пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта [25]. С 2009 г. в стране проводится скрининг для определения распространенности *C. difficile*-ассоциированной болезни, характера ее течения, а также летальности

при данном заболевании среди всех амбулаторных и госпитализированных пациентов в 7, а с 2011 г. — в 10 штатах. Согласно подсчетам, за период с 1 января по 31 декабря 2011 г. распространенность инфекции *C. difficile* среди всех пациентов в 10 штатах (общая численность населения около 11,2 млн человек) составила 453 000 случаев [95% ДИ 397 100; 508 500]. При этом установлено, что болезнь чаще развивается у женщин — 1,26 [95% ДИ 1,25; 1,27], лиц старше 65 лет — 8,65 [95% ДИ 8,16; 9,31] и представителей белой расы — 1,72 [95% ДИ 1,56; 2,0]. Заболеваемость на 100 000 населения колеблется от 30 до 120 случаев при внебольничной инфекции и от 50 до 160 среди госпитализированных больных. Рецидивы отмечаются в 13,5%, а летальность в течение 30 дней после постановки диагноза — в 1,3% случаев. Причем рецидивы и смертельные исходы наблюдаются чаще при развитии состояний, связанных с оказанием медицинской помощи [25].

Данное заболевание служит наиболее частой причиной внутрибольничной диареи в Великобритании (60 000 случаев за 2007–2008 гг.). В 2007 г., например, было зарегистрировано 49 785 эпизодов клостридиальной инфекции, смертельных исходов — 8324, что на 27% выше, чем в 2006 г. [27].

По сообщению Федерального статистического управления, в Германии с 2000 по 2012 г. самой частой причиной диареи у госпитализированных пациентов оказалась инфекция *C. difficile* — 99 779 случаев, число умерших при этом возросло с 401 человека в 2001 г. до 4152 в 2011 г. [45].

В России в настоящее время проводятся исследования частоты *C. difficile*-ассоциированной болезни и многочисленные данные свидетельствуют об угрожающем росте заболеваемости.

Таким образом, современные эпидемиологические тенденции, касающиеся *C. difficile*-ассоциированной инфекции, характеризуются следующими положениями:

- увеличение внутри- и внебольничной заболеваемости;
- расширение групп риска;
- рост более тяжелых форм заболевания, в том числе обусловленных более вирулентным штаммом BI/NAP1/027;
- склонность к рецидивированию;
- рост летальности [5].

Факторы риска *C. difficile*-ассоциированной болезни

Выделяют два основных фактора риска развития клостридиальной инфекции — применение антибиотиков (особенно широкого спектра действия) и госпитализация в стационар.

В 7–10 раз риск повышается во время проведения курса лечения антибиотиками и в течение месяца после их отмены; в 2–3 раза он остается повышенным на протяжении 3 месяцев после завершения антибиотикотерапии [14]. Каждая последующая неделя госпитализации увеличивает риск инфицирования на 8%.

К другим факторам риска развития инфекции относят:

- пожилой возраст;
- хирургические вмешательства на органах ЖКТ;

Таблица 2

Проявления болезни в зависимости от тяжести ее течения

Течение заболевания	Критерии
Легкое	Диарея (неоформленный стул 3 или более раз в сутки)
Средней степени тяжести	Диарея (неоформленный стул 3 или более раз в сутки) в сочетании с болью в животе
Тяжелое	Водянистая диарея с кровью Снижение уровня альбумина до 30 мг/дл в сочетании с одним из следующих симптомов: — лейкоцитоз более 15 000 клеток/мм ³ — болезненность при пальпации живота
Осложненное	Водянистая диарея с кровью Один из нижеперечисленных симптомов: — гипотензия — лихорадка >38,5 °C — илеус — изменение сознания — лейкоцитоз более 25 000 или менее 2000 клеток/мм ³ — органная недостаточность (необходимость искусственной вентиляции легких, почечная недостаточность)
Рецидив	Повторное развитие <i>C. difficile</i> -ассоциированной болезни менее, чем через 8 недель после окончания терапии

- применение назогастрального зонда для парентерального питания;
- снижение кислотности желудочного сока (прием ИПП);
- наличие конкурирующих заболеваний, в числе которых воспалительные заболевания кишечника, ВИЧ, сахарный диабет [7, 10, 22, 35, 37, 54, 62, 71, 72]. В Рекомендациях РГА и Ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению взрослых больных язвенным колитом и пациентов с болезнью Крона исследование токсинов А и В *C. difficile* названо обязательным для пациентов при обострении заболевания без видимых причин, после проведенного курса антибиотикотерапии или пребывания в стационаре [1, 2];
- прием иммуносупрессивных препаратов (глюкокортикостероиды, такролимус, противоопухолевые средства [18, 26, 41, 60, 65, 70, 74].

Прогностические факторы тяжелого течения уже развившегося заболевания:

- возраст ≥ 65 лет;
- лейкоцитоз $>15 \times 10^9/\text{л}$; гипоальбуминемия (<30 г/л); повышение содержания креатинина крови (≥ 133 мкмоль/л или $\geq 1,5$ раза от преморбидного уровня);
- сопутствующие тяжелые заболевания [21].

Факторами риска развития рецидива (повторный эпизод заболевания менее чем через 8 недель после начала предыдущего при условии успешного лечения) служат:

- возраст ≥ 65 лет;
- продолжение применения антибиотиков (не для лечения клостридиальной инфекции) после установления диагноза и/или после лечения клостридиальной инфекции;
- тяжелое сопутствующее заболевание и/или почечная недостаточность;
- наличие клостридиальной инфекции в анамнезе (более одного рецидива);
- одновременное применение антисекреторных препаратов (ИПП);
- тяжелое течение первого эпизода клостридиальной инфекции [21].

Приводятся также данные о том, что инфицирование высоковирулентным штаммом VI/NAP1/027 связано с более тяжелым развитием заболевания и смертельным исходом у пациентов всех возрастов [55].

Клиническая картина инфекции *C. difficile*

Симптоматика заболевания характеризуется значительным разнообразием (табл. 2) [3, 4, 16].

Диагностические тесты

Материал для обнаружения токсинов *C. difficile* — фекалии пациентов с диареей [17].

В настоящее время предлагается несколько **лабораторных методов** для диагностики кло-

стридиальной инфекции, однако ответ на вопрос, какой из них можно считать «золотым стандартом», пока не получен.

Иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления токсинов А+В *C. difficile*. Это наиболее широко распространенный диагностический тест, чувствительность которого составляет 75–95%, специфичность 83–98% [59]

Тест амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР) для токсигенного штамма *C. difficile*. Метод обладает достаточно высокой чувствительностью и специфичностью [16]

Исследование глутаматдегидрогеназы (GDH) *C. difficile*. Глутаматдегидрогеназа — фермент, продуцируемый как токсигенными, так и нетоксигенными штаммами микроорганизма. Чувствительность метода обнаружения антител к GDH в случае отрицательного результата составляет 75–90%, в то время как при положительном результате снижается до 50% [64].

Оптимальным в настоящее время считается двух- или трехступенчатый алгоритм диагностики:

1. Исследование глутаматдегидрогеназы *C. difficile* (в случае отсутствия антител к GDH дальнейшего обследования больного не требуется).

2. При наличии антител проводятся подтверждающие тесты — ПЦР или ПЦР + ИФА.

Следует избегать выполнения повторных тестов в том случае, если результаты первого были отрицательными. При последующих исследованиях повышается вероятность получения ложноположительных результатов [44]; кроме того, нет необходимости в повторных лабораторных исследованиях после проведенного лечения; при наступлении клинического улучшения — тесты (ИФА) могут оставаться положительными на протяжении 30 дней [69].

Если у пациента развилась клиническая картина *C. difficile*-ассоциированной болезни, лечение должно быть начато до получения лабораторного подтверждения. Отрицательные результаты лабораторных тестов не исключают диагноза [16].

Эндоскопия

Классическая эндоскопическая картина псевдомембранозного колита представлена очаговыми плотно спаянными с подлежащей слизистой оболочкой желто-зелеными и кремовыми наложениями, между которыми отмечается гиперемия слизистой. При попытках удаления пленок обнажаемая поверхность кровоточит. Часто наложения описываются как бляшки, имеющие диаметр от нескольких миллиметров до 1–2 см. При прогрессировании процесса они сливаются и полностью покрывают поверхность слизистой оболочки, которая подвергается некрозу и при отторжении экссудата становится изъязвленной [15] (рис. 3).

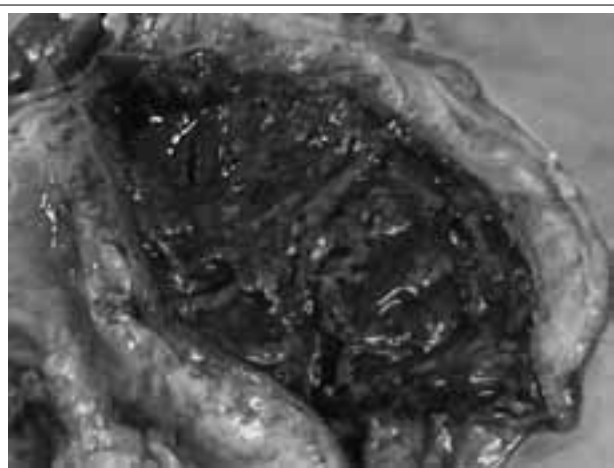


Рис. 3. Макропрепарат толстой кишки пациента 72 лет. Классическая эндоскопическая картина псевдомембранозного колита представлена очаговыми плотно спаянными с подлежащей слизистой оболочкой наложениями, между которыми отмечается гиперемия слизистой оболочки. Слизистая всей толстой кишки черного цвета за счет множественных кровоизлияний.

Секционный случай представлен на клинко-анатомической конференции ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» под руководством академика РАН, профессора В.Т. Ивашкина и профессора В.С. Паукова

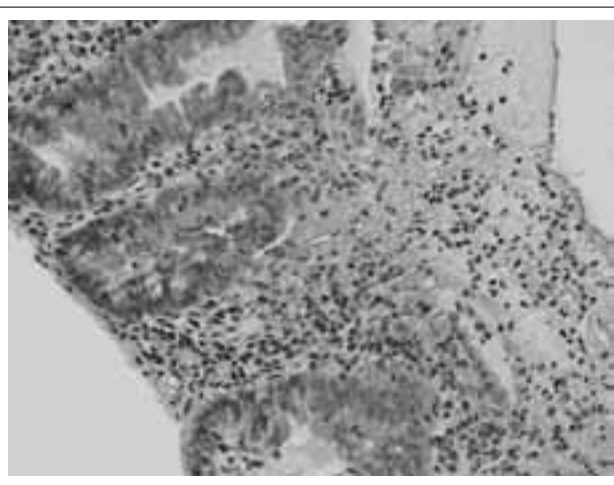


Рис. 4. Микроскопически в ранней (первой) стадии заболевания определяется выход фибрина, муцина и нейтрофилов на участках между криптами. Наблюдение профессора кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» А.С. Тertyчного (зав. кафедрой — профессор В.С. Пауков)

Морфология

Некоторые авторы считают, что диагноз ПМК может быть с уверенностью установлен при морфологическом исследовании биоптатов, и в этом случае не требуется анализа анамнестических данных о предшествующем назначении антибиотиков и/или выявления токсинов *C. difficile* [56]. Это утверждение справедливо для второй стадии

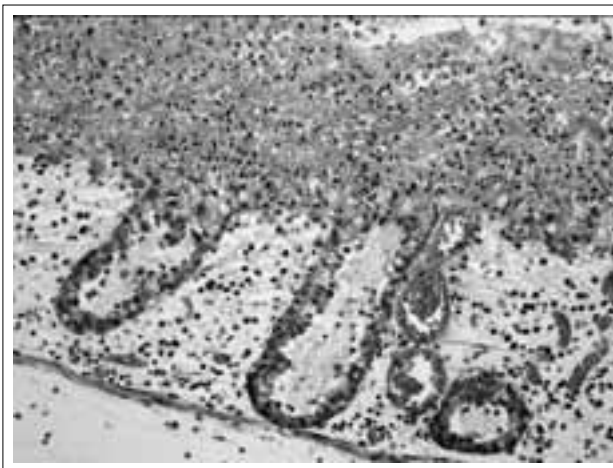


Рис. 5. Поверхностная часть крипт оказывается включенной в мембрану. Эпителий нижних отделов крипт сохранен, а просвет их расширен. Наблюдение профессора кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» А.С. Тertyчного (зав. кафедрой — профессор В.С. Пауков)

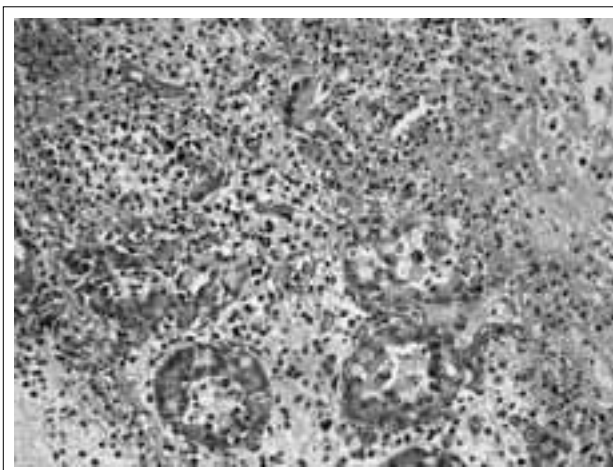


Рис. 6. Слизистая оболочка частично некротизирована, замещена массами фибрина со скоплениями нейтрофилов, видны сохранившиеся основания крипт, в которых десквамированные эпителиоциты, напоминающие перстневидные клетки, обнаруживаются в просвете. Наблюдение профессора кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» А.С. Тertyчного (зав. кафедрой — профессор В.С. Пауков)

ПМК, но при первой и третьей стадиях не всегда возможно.

При *первой стадии* заболевания определяются скопления фибрина, муцина и нейтрофилов на участках между криптами (рис. 4). На *второй стадии* поверхностная часть крипт оказывается включенной в мембрану, эпителий нижних отделов крипт сохранен, а просвет их расширен (рис. 5). При *третьей стадии* (рис. 6) слизистая оболочка и подслизистый слой некротизированы,

замещены массами фибрина со скоплениями нейтрофилов, видны многочисленные кровоизлияния в слизистой оболочке, в более глубоких отделах (мышечный слой) — полнокровные сосуды, кровоизлияния, лимфоцитарная инфильтрация преимущественно очагового характера.

Лечение

Для лечения *C. difficile*-ассоциированной болезни применяют ванкомицин, метронидазол, сорбенты и пробиотики [3, 4, 16, 48].

Легкое/средней тяжести течение заболевания

Назначают метронидазол 500 мг 3 раза в сутки на протяжении 10 дней. Если к 5–7-му дню не удастся добиться улучшения в самочувствии пациента, показана смена антибиотика на ванкомицин в дозе 125 мг 4 раза в сутки на срок до 10 дней.

При непереносимости метронидазола лечение следует начинать с ванкомицина в вышеуказанной дозе. Беременным и кормящим женщинам при наличии отчетливой клиники клостридиальной инфекции также рекомендуют ванкомицин в дозе 125 мг 4 раза в сутки.

Как метронидазол, так и ванкомицин эффективны при *C. difficile*-ассоциированной болезни, однако оба препарата вызывают нарушение состава кишечной микрофлоры, что может приводить в последующем к рецидиву.

Метронидазол хорошо абсорбируется из ЖКТ, в связи с чем может вызывать такие побочные реакции, как диарея, снижение аппетита, тошнота, рвота, запор, неприятный «металлический» привкус и сухость во рту, глоссит, стоматит, но интенсивность их редко бывает выраженной [42].

Абсорбция ванкомицина существенно ниже, действующее вещество определяется в сыворотке крови в минимальных концентрациях. Вместе с тем наличие воспалительных изменений в кишке, особенно в сочетании с хронической почечной недостаточностью, может способствовать большей абсорбции препарата и развитию побочных эффектов [8].

В случае легкого течения клостридиальной инфекции, четко связанного с приемом антибиотиков, при отсутствии других заболеваний в данном месте и в данное время, возможна только отмена антибиотиков и наблюдение за пациентом на протяжении 48 часов, однако при даже незначительном ухудшении состояния необходимо назначение метронидазола [21].

Диоктаэдрический смектит нейтрализует активность токсинов *C. difficile* [49] и может применяться параллельно с метронидазолом или ванкомицином в дозе 1–2 пакетика 3 раза в сутки на протяжении 7 дней, не ранее чем через час после приема антибиотиков.

Пробиотики (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus rhamnosus*) назначаются для профилактики развития рецидива болезни после завершения курса лечения метронидазолом или ванкомицином на срок не менее 3 месяцев. При приеме препаратов данной группы не зарегистрировано серьезных побочных эффектов [32]. Пока недостаточно данных, подтверждающих необходимость назначения пробиотиков в сочетании с метронидазолом или ванкомицином [36].

Комбинированный пробиотик Флорасан Д, в состав которого входят штаммы *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* не менее 1×10^9 КОЕ/г в кишечнорастворимых капсулах, устойчивых к воздействию как низких, так и высоких значений pH, может рассматриваться в качестве препарата выбора для лечения *C. difficile*-ассоциированной болезни.

Следует избегать назначения лекарственных средств, угнетающих моторику ЖКТ, поскольку их применение может способствовать развитию осложнений *C. difficile*-ассоциированной болезни (илеус).

Тяжелое течение заболевания

Пациентам назначают ванкомицин 125 мг 4 раза в сутки в сочетании с метронидазолом 500 мг 3 раза в сутки в течение 10 дней [16]. Диоктаэдрический смектит принимают в дозе 1–2 пакетика 3 раза в сутки на протяжении 7 дней во время курса лечения ванкомицином и метронидазолом (не ранее чем через час после приема антибиотиков). Для профилактики рецидивов заболевания целесообразно применять пробиотик Флорасан Д в течение не менее 3 месяцев после завершения лечения метронидазолом или ванкомицином [32]. Также следует избегать назначения препаратов, угнетающих моторику ЖКТ, поскольку их прием может способствовать развитию осложнений (илеус).

Осложненное течение заболевания

В этой ситуации назначают метронидазол 500 мг каждые 8 часов в сочетании с ванкомицином 500 мг 4 раза в день + ванкомицин per rectum 500 мг 4 раза в сутки на протяжении 10 дней [16]. Проводится инфузионная терапия (коррекция белково-электролитных нарушений, дезинтоксикация) и коррекция анемии (гемотрансфузии при уровне гемоглобина ниже 80 г/л, далее — терапия препаратами железа, предпочтительно — парентерально). Пробиотики назначают после завершения курса лечения антибактериальными препаратами на срок не менее 3 месяцев.

Показаниями к выполнению колэктомии при осложненном течении заболевания служат следующие состояния:

- перфорация кишки;
- развитие синдрома системной воспалительной реакции;
- отсутствие улучшения самочувствия, несмотря на проводимое консервативное лечение на протяжении 5 дней;
- развитие токсического мегаколона, илеуса, симптомов «острого» живота.

Операцию следует выполнять до развития тяжелого или осложненного течения болезни. В качестве маркера тяжести заболевания может служить уровень лактата сыворотки крови (более 5 ммоль/л) [16, 21].

Первый рецидив

После первого эпизода *C. difficile*-ассоциированной болезни вероятность рецидива в последующие 8 недель составляет 10–20%, после первого рецидива возможность последующих достигает 40–65% [53].

Лечение при первом рецидиве проводится так же, как в случае первого эпизода заболевания в зависимости от степени его тяжести. При тяжелом течении первого рецидива показано назначение ванкомицина в связи с тем, что длительное применение метронидазола повышает риск развития периферической нейропатии [17].

Пробиотики после завершения курса терапии антибактериальными препаратами должны быть назначены на срок не менее 3 месяцев.

Последующие рецидивы заболевания

При повторных эпизодах легкого и средней тяжести течения болезни рекомендовано назначение ванкомицина в начальной дозе 500 мг в сутки в течение 10 дней. Затем прием препарата продолжается каждые 3 дня по 125 мг на протяжении 30 дней (до 10 доз) [16].

После завершения курса лечения ванкомицином, в случае неудовлетворительного результата, может быть проведен 2-недельный курс терапии рифаксиминном в дозе 400 мг 2 раза в сутки [36].

Пробиотики. После завершения курса лечения антибактериальными препаратами показано назначение пробиотиков (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus rhamnosus*) на срок не менее трех месяцев.

Лечение считается эффективным в том случае, если уменьшается частота стула, консистенция кала становится более плотной и не возникают новые симптомы заболевания.

Осмотр пациента следует проводить ежедневно, эффективность лечения оценивать на 3-й день приема ванкомицина или на 3–5-й день при применении метронидазола. Полная нормализация частоты и консистенции стула может произойти через несколько недель [21].

Необходимость лечения бессимптомных лиц с положительными анализами кала на токсины А и В *C. difficile* дискутируется.

Эффективность Флорасана Д для профилактики рецидива заболевания позволяет рассматривать этот пробиотик для назначения бессимптомным носителям, которым планируется госпитализация или курс антибиотикотерапии.

Профилактика

Для уменьшения риска развития клостридиальной инфекции рекомендовано рациональное назначение антибактериальных препаратов [16] и сокращение по возможности сроков госпитализации, особенно у лиц старше 65 лет.

Пациенты с подозрением на наличие у них *C. difficile*-ассоциированной болезни должны быть помещены в отдельную палату или в палату, где находятся больные с уже подтвержденным диагнозом.

В медицинских учреждениях должна проводиться предварительная, текущая и генеральная уборка, а также обработка рук медицинского персонала и медицинского инвентаря в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативами (СанПиН 2.1.3.2630-10).

Заключение

C. difficile — облигатно-анаэробная, грамположительная, спорообразующая, цитотоксинпродуцирующая палочка. Этот патоген служит причиной возникновения *C. difficile*-ассоциированной болезни. С начала XXI века во многих странах мира отмечается стремительное нарастание ее распространенности.

C. difficile-ассоциированная болезнь развивается чаще у пациентов, получающих антибактериальную терапию, у госпитализированных больных, лиц пожилого возраста, пациентов с тяжелыми сочетанными заболеваниями, а также находящихся на лечении иммуносупрессивными препаратами. Рассматриваемая патология служит наиболее частой причиной внутрибольничной диареи, приводящей к значительному числу смертельных исходов.

Основными факторами вирулентности *C. difficile* являются токсины А и В, вызывающие повреждение кишечной стенки и воспаление в ней вследствие нарушения кишечного эпителиального барьера, индукции провоспалительных цитокинов, апоптоза и некроза эпителиоцитов.

В настоящее время предлагается несколько лабораторных методов для диагностики клостридиальной инфекции (ИФА, ПЦР, исследование глутаматдегидрогеназы), однако ответ на вопрос, какой из них можно считать «золотым стандартом», пока не получен.

Эндоскопическим маркёром тяжелой *C. difficile*-ассоциированной болезни — псевдомембранозного колита — служит выявление при эндоскопическом исследовании плотно спаянных с подлежащей слизистой оболочкой желто-зеленых и/или кремовых наложений (псевдомембран).

Для лечения *C. difficile*-ассоциированной болезни применяют ванкомицин, метронидазол, сорбенты и пробиотики.

Список литературы

1. Ивашкин В.Т., Шельгин Ю.А., Абдуганиева 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., Москалев А.И., Низов А.И., Николаева Н.Н., Осипенко М.Ф., Павленко В.В., Парфенов А.И., Полуэктова Е.А., Румянцев В.Г., Тимебулатов В.М., Тertychny A.S., Tkachev A.V., Trukhmanov A.S., Khalif I.L., Khubezov D.A., Chashkova Ye.Yu., Shifrin O.S., Shchukina O.B. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению взрослых больных язвенным колитом. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 2015; 25(1):48-65.
1. Ivashkin V.T., Shelygin Yu.A., Abdulganiyeva D.I., Abdulkhakov R.A., Alekseyeva O.P., Achkasov S.I., Baranovsky A.Yu., Belousova Ye.A., Golovenko O.V., Grigoryev Ye.G., Kostenko N.V., Lapina T.L., Mayev I.V., Moskaev A.I., Nizov A.I., Nikolayeva N.N., Osipenko M.F., Pavlenko V.V., Parfenov A.I., Poluektova E.A., Rumyantsev V.G., Timerbulatov V.M., Tertychny A.S., Tkachev A.V., Trukhmanov A.S., Khalif I.L., Khubezov D.A., Chashkova Ye.Yu., Shifrin O.S., Shchukina O.B. Guidelines of the Russian gastroenterological association and Association of coloproctologists of Russia on diagnostics and treatment of ulcerative colitis in adults. Ros zhurn gastroenterol gepatol koloproktol 2015; 25(1):48-65.
2. Ивашкин В.Т., Шельгин Ю.А., Абдуганиева 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., Парфенов А.И., Полуэктова Е.А., Румянцев В.Г., Тимебулатов В.М., Ткачев А.В., 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 пациентов с болезнью Крона. <http://www.gastro.ru/>.
2. Ivashkin V.T., Shelygin Yu.A., Abdulganiyeva D.I., Abdulkhakov R.A., Alekseyeva O.P., Achkasov S.I., Baranovsky A.Yu., Belousova Ye.A., Golovenko O.V., Grigoryev E.G., Kostenko N.V., Nizov A.A., Nikolayeva N.N., Osipenko M.F., Pavlenko V.V., Parfenov A.I., Poluektova E.A., Rumyantsev V.G., Timerbulatov V.M., Tkachev A.V., Khalif I.L., Khubezov D.A., Chashkova Ye.Yu., Shifrin O.S., Shchukina O.B. Guidelines of the Russian gastroenterological association and Association of coloproctologists of Russia on diagnostics and treatment of Crohn's disease in adults. <http://www.gastro.ru/>.
3. Корнеева О.Н., Ивашкин В.Т. Антибиотикоассоциированный колит: патоморфология, клиника, лечение. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 2007; 17(3):65-70.

В целях профилактики развития заболевания рекомендовано рациональное назначение антибактериальных препаратов, сокращение по возможности сроков пребывания в стационаре, своевременная диагностика *C. difficile*-ассоциированной болезни, а также соблюдение санитарно-эпидемиологических правил в медицинских учреждениях.

3. Korneyeva O.N., Ivashkin V.T. Antibiotic-associated colitis: pathomorphology, clinical presentation, treatment. Ros zhurn gastroenterol gepatol koloproktol 2007; 17(3):65-70.
4. Рациональная фармакотерапия заболеваний органов пищеварения / Под ред. В.Т. Ивашкина. М.: Литтерра, 2011; 522-6.
4. Rational pharmacotherapy of digestive diseases / Ed.: V.T. Ivashkin. M.: Litterra, 2011; 522-6.
5. Шенгулин А.А. Рефрактерные и рецидивирующие формы колита, ассоциированного с *Clostridium difficile*. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 2011; 21(2):50-3.
5. Sheptulin A.A. Refractory and relapsing forms of *Clostridium difficile*-associated colitis. Ros zhurn gastroenterol gepatol koloproktol 2011; 21(2):50-3.
6. Aktories K., Wegner A. Mechanisms of the cytopathic action of actin-ADP-ribosylating toxins. Mol. Microbiol. 1992; 6:2905-8.
7. Al-Eidan F.A., McElnay J.C., Scott M.G., et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. J Clin Pharm Ther 2000; 25:101-9.
8. Aradhyula S., Manian F.A., Hafidh S.A.S., Bhutto S.S., Alpert M.A. Significant absorption of oral vancomycin in a patient with *Clostridium difficile* colitis and normal renal function. South Med J 2006; 99:518-20.
9. Bartlett J.G., Gerding D.N. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis 2008; 46(Suppl 1):12-8.
10. Bavishi C., DuPont H.L. Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection. Aliment Pharmacol Ther 2011; 34:1269-81.
11. Biopsy pathology in colorectal disease. 2nd ed. / Eds. Ian Talbot, Ashley Price, Manuel Salto-Tellez. London, England: Hodder Arnold, 2007. 320 p.
12. Britton R.A., Young V.B. Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. Gastroenterology 2014; 146:1547-53.
13. Calabi E., Calabi F., Phillips A.D., Fairweather N.F. Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. Infect Immun 2002. 70:5770-8.
14. Centers for disease control and prevention. Vital signs: preventing *Clostridium difficile* infections. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2012; 61(9):157-62.
15. Cerilli L.A., Greenson J.K. The differential diagnosis of colitis in endoscopic biopsy specimens: a review article. Arch Pathol Lab Med 2012; 136:854-64.
16. Christina M. Surawicz, Lawrence J. Brandt, David G. Binion, Ashwin N. Ananthakrishnan, Scott R. Curry, Peter H. Gilligan, Lynne V. McFarland, Mark Mellow, Brian S. Zuckerbraun. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections Am J Gastroenterol advance online publication, 2013; doi:10.1038/ajg.2013.4.
17. Cohen S.H., Gerding D.N., Johnson S., et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults:2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious

- Diseases Society of America (IDSA). Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31:431-55.
18. Dallal R.M., Harbrecht B.G., Boujoukas A.J., Sirio C.A., Farkas L.M., Lee K.K., et al. Fulminant *Clostridium difficile*: An underappreciated and increasing cause of death and complications. Ann Surg 2002; 235:363-72.
 19. Daryl D. DePestel, David M. Aronoff. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. J Pharm Pract 2013; 26(5):464-75.
 20. De Filippo C., Cavalieri D., di Paola M., Ramazzotti M., Poullet J.B., Massart S., Collini S., Pieraccini G., Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. Proc Natl Acad Sci USA. 2010; 107:14691-6.
 21. Debast S.B., Bauer M.P., Kuijper E.J. On behalf of the Committee. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Treatment Guidance Document for *Clostridium difficile* Infection. Clin Microbiol Infect 2014; 20 (Suppl. 2):1-26.
 22. Deshpande A., Pant C., Pasupuleti V., et al. Association between proton pump inhibitor therapy and *Clostridium difficile* infection in a meta-analysis. Clin Gastroenterol Hepatol 2012; 10:225-33.
 23. Drudy D., Calabi E., Kyne L., Sougioultzis S., Kelly E., Fairweather N., Kelly C.P. Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 41(3):237-42.
 24. Drudy D., Quinn T., O'Mahony R., Kyne L., O'Gaora P., Fanning S. High-level resistance to moxifloxacin and gatifloxacin associated with a novel mutation in gyrB in toxin-A-negative, toxin-B-positive *Clostridium difficile*. J Antimicrob Chemother 2006; 58(6):1264-7.
 25. Fernanda C. Lessa, Yi Mu, Wendy M. Bamberg, Zintars G. Beldavs, Ghinwa K. Dumyati, John R. Dunn, Monica M. Farley, Stacy M. Holzbauer, James I. Meek, Erin C. Phipps, Lucy E. Wilson, Lisa G. Winston, Jessica A. Cohen, Brandi M. Limbago, Scott K. Fridkin, Dale N. Gerding, Clifford L. McDonald. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. N Engl J Med 2015; 372:825-34.
 26. Francis M.B., Allen C.A., Shrestha R., Sorg J.A. Bile acid recognition by the *Clostridium difficile* germinant receptor, CspC, is important for establishing infection. PLoS Pathog 2013; 9(5):e1003356.
 27. Gash K., Brown E., Pullyblank A. Emergency subtotal colectomy for fulminant *Clostridium difficile* colitis – is a surgical solution considered for all patients? Ann R Coll Surg Engl 2010; 92(1):56-60.
 28. Geric B., Rupnik M., Gerding DN., Grabnar M., Johnson S. Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital. J Med Microbiol. 2004; 53(Pt 9):887-94.
 29. Goudarzi M., Seyedjavadi SS, Goudarzi H, Adham EM, Nazeri S. *Clostridium difficile* Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Risk Factors, and Therapeutic Options. Scientifica Volume 2014 (2014), Article ID 916826, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/916826>
 30. Gülke I., Pfeifer G., Liese J., Fritz M., Hofmann F., Aktories K., Barth H. Characterization of the enzymatic component of the ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. Infect Immun 2001; 69:6004-11.
 31. Hall I.C., O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child 1935; 49:390-402.
 32. Hempel S., Newberry S.J., Maher A.R., et al. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. JAMA 2012; 307:1959-69.
 33. Hennequin C., Janior C., Barc M.C., Collignon A., Karjalainen T. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. Microbiology 2001; 149:2779-87.
 34. Hennequin C., Porcheray F., Waligora-Dupriet A., Collignon A., Barc M., Bourlioux P., Karjalainen T. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. Microbiology 2001; 147, 87-96.
 35. Issa M., Ananthakrishnan A.N., Binion D.G. *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2008;14:1432-42.
 36. Johnston B.C., Ma S.S.Y., Goldenberg J.Z., et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile* associated diarrhea. Ann Intern Med 2012; 157:878-88.
 37. Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. J Infect 2009; 58(6):403-10.
 38. Johnson S., Adelman A., Clabots C.R., et al. Recurrences of *Clostridium difficile* diarrhea not caused by the original infecting organism. J Infect Dis. 1989; 159:340-3.
 39. Johnson S., Schriever C., Galang M., et al. Interruption of recurrent *Clostridium difficile* -associated diarrhea episodes by serial therapy with vancomycin and rifaximin. Clin Infect Dis 2007; 44:846-8.
 40. Keller J.M., Surawicz C.M. *Clostridium difficile* infection in elderly. Clin Geriatr Med. 2014; 30:79-93.
 41. Keven K., Basu A., Re L. *Clostridium difficile* colitis in patients after kidney and pancreas-kidney transplantation. Transpl Infect Dis 2004;6:10-4.
 42. Lofmark S., Edlund C., Nord C.E. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. Clin Infect Dis 2010; 50 (Suppl. 1):16-23.
 43. Loo V.G., Bourgault A.M., Poirier L., Lamothe F., Michaud S., Turgeon N., et al. Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. N Engl J Med. 2011; 365:1693-703.
 44. Luo R.F., Banaei N. Is repeat PCR needed for diagnosis of *Clostridium difficile* infection? J Clin Microbiol 2010; 48:3738-41.
 45. Lynen Jansen P., Stallmach A., Lohse A.W., Lerch M.M. Development of gastrointestinal infectious diseases between 2000 and 2012. Z Gastroenterol 2014; 52 (6):549-57.
 46. Lyras D., O'Connor J.R., Howarth P.M., Sambol S.P., Carter G.P., Phumoonna T., Poon R., Adams V., Vedantam G., Johnson S., Gerding D.N., Rood J.I. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature 2009; 458(7242):1176-9.
 47. Mark F Wilcox. *Clostridium difficile* infection. Infectious Disease Clinics, Vol. 29, Issue 1, Mar, 2015 Mar;29(1):xiii-xiv. doi: 10.1016/j.idc.2014.12.001.
 48. Martin H., Willey B., Low D.E., Staempfli H.R., McGeer A., Boerlin P., Mulvey M., Weese J.S. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from patients in Ontario, Canada, from 2004 to 2006. J Clin Microbiol 2008; 46(9):2999-3004.
 49. Martirosian G., Rouyan G., Zalewski T., Meisel-Mikolajczyk F. Dioctahedral smectite neutralization activity of *Clostridium difficile* and *Bacteroides fragilis* toxins *in vitro*. Acta Microbiol Pol 1998; 47(2):177-83.
 50. McDonald L.C., Killgore G.E., Thompson A., et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med 2005; 353(23):2433-41.
 51. McDonald L.C., Killgore G.E., Thompson A., Owens R.C.Jr., Kazakova S.V., Sambol S.P., Johnson S., Gerding D.N. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med 2005; 353(23):2433-41.
 52. McDonald L.C., Owings M., Jernigan D.B. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. Emerg Infect Dis 2006; 12(3):409-15.
 53. McFarland L.V., Elmer G.W., Surawicz C.M. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. Am J Gastroenterol 2002; 97:1769-75.
 54. McFarland L.V., Surawicz C.M., Stamm W.E. Risk factors for *Clostridium difficile* carriage and *C. difficile*-associated diarrhea in a cohort of hospitalized patients. J Infect Dis 1990; 162:678-84.

55. Miller M., Gravel D., Mulvey M., et al. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in Canada: patient age and infecting strain type are highly predictive of severe outcome and mortality. Clin Infect Dis 2010; 50:194-201.
56. Olofinlade O., Chiang C. Cytomegalovirus infection as a cause of pseudomembrane colitis: a report of four cases. J Clin Gastroenterol 2001; 32(1):82-4.
57. Paredes-Sabja D., Shen A., Sorg J.A. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. Trends Microbiol 2014; 22:406-16.
58. Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F.F., Snijders B., Kummeling I., van den Brandt P.A., Stobberingh E.E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Pediatrics 2006; 118:511-21.
59. Planche T., Aghaizu A., Holliman R., et al. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. Lancet Infect Dis 2008; 8:777-84.
60. Preetika Sinh, Terrence A. Barrett, Laura Yun. *Clostridium difficile* infection and inflammatory bowel disease: A review. Gastroenterol Res Pract 2011; Article ID136064, 11 p.
61. Redelings M.D., Sorvillo F., Mascola L. Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999–2004. Emerg Infect Dis 2007; 13:1417-9.
62. Rodemann J.F., Dubberke E.R., Reske K.A., et al. Incidence of *Clostridium difficile* infection in inflammatory bowel disease. Clin Gastroenterol Hepatol 2007; 5:339-44.
63. Sarker M.R., Paredes-Sabja D. Molecular basis of early stages of *Clostridium difficile* infection: germination and colonization. Future Microbiol 2002; 7:933-43.
64. Shetty N., Wren M.W., Coen P.G. The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: a meta-analysis. J Hosp Infect 2011; 77:1-6.
65. Stevens V., Dumyati G., Brown J., Wijngaarden E. Differential risk of *Clostridium difficile* infection with proton pump inhibitor use by level of antibiotic exposure. Pharmacoepidemiol Drug Saf 2011; 20:1035-42.
66. Stewart D.B., Hegarty J.P. Correlation between virulence gene expression and proton pump inhibitors and ambient pH in *Clostridium difficile*: Results of an *in vitro* study. J Med Microbiol 2013; 62:1517-23.
67. Sun X. *Clostridium difficile* infection: Virulence factors, adaptive immunity and vaccine development. Austin J Infect Dis 2014; 1(1):7.
68. Sun X., Savidge T., Feng H. The enterotoxicity of *Clostridium difficile* toxins. Toxins 2010; 2:1848-80.
69. Surawicz C.M., McFarland L.V., Greenberg R.N., et al. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: the use of high dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. Clin Infect Dis 2000; 31:1012-7.
70. Tleyjeh I.M., Bin Abdulhak A.A., Riaz M., et al. Association between proton pump inhibitor therapy and *Clostridium difficile* infection: a contemporary systematic review and meta-analysis. PLoS ONE 2012; 7:.
71. Vecchio A.L., Zacur G.M. *Clostridium difficile* infection: an update on epidemiology, risk factors, and therapeutic options. Curr Opin Gastroenterol 2012; 28(1):1-9.
72. Vestciinsdottir I., Gudlaugsdottir S., Einarsdottir R., et al. Risk factors for *Clostridium difficile* toxin-positive diarrhea: a population-based prospective case-control study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(10):2601-10.
73. Warny M., Pepin J., Fang A., Killgore G., Thompson A., Brazier J., Frost E., McDonald L.C. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet 2005; 366(9491):1079-84.
74. Wong N.A., Bathgate A.J., Bellamy C.O. Colorectal disease in liver allograft recipients: A clinicopathological study with follow up. Eur J Gastroenterol Hepatol 2002; 14:231-6.