

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

***Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)***



2013 * № 1

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© А.В. Шиповской, С.Б. Фадеев, 2013

УДК 616.34-008.314.4-078

А.В. Шиповской¹, С.Б. Фадеев²

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АНТИБИОТИКОАССОЦИИРОВАННЫХ ДИАРЕЙ

¹ Оренбургская государственная медицинская академия, Оренбург, Россия

² Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Цель. Оценка эффективности иммуноферментного анализа для диагностики антибиотикоассоциированных диарей.

Материалы и методы. Произведено бактериологическое исследование фекальных масс 18 пациентов, у которых на фоне применения антибиотиков развился диарейный синдром. Параллельно методом иммуноферментного анализа производилась детекция токсинов А и В *Clostridium difficile*.

Результаты. Бактериологическое обследование позволило выявить *C. difficile* в фекалиях у 16 пациентов, в то время как определение токсинов возбудителя диареи показало положительный результат в 17 пробах ($p > 0,95$). При продукции возбудителем только токсина В (цитотоксина) наблюдалось более раннее исчезновение признаков синдрома системного воспалительного ответа и нормализация стула ($p < 0,05$). Все изоляты *C. difficile* были чувствительны к метронидазолу и ванкомицину, что обеспечило высокую эффективность этиотропной терапии больных антибиотикоассоциированными диареями.

Заключение. Установлена высокая информативность бактериологической и иммуноферментной (с определением токсинов А и В) методик диагностики *Clostridium difficile* - ассоциированных диарей, однако второй способ позволял получать более ранние результаты. Наиболее выраженная клиника заболевания отмечалась при продукции *C. difficile* токсинов А и В, а наименее тяжелая – в случаях в продукции только токсина В.

Ключевые слова: диарея, антибиотики, токсины, микроорганизмы, диагностика.

A.V. Shipovskoy¹, S.B. Fadeev²

EXPERIENCE OF IMMUNOASSAY FOR DIAGNOSTICS OF ANTIBIOTIC-ASSOCIATED DIARRHEA

¹ Orenburg State Medical Academy, Orenburg, Russia

² Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

Aim. Evaluating the effectiveness of enzyme immunoassay for the diagnosis of antibiotic-associated diarrhea.

Materials and methods. Bacteriological examination of faeces of 18 patients with antibiotic-associated diarrhea was conducted. Parallel detection of toxins A and B of *Clostridium difficile* was performed by enzyme immunoassay.

Results. Bacteriological examination revealed *C. difficile* in faeces in 16 patients, while the definition of diarrhea pathogen toxins produced positive results in 17 samples ($p > 0,95$). When production agent only toxin B (cytotoxin) was observed earlier disappearance of symptoms of the syndrome system inflammatory response and normalization of stool ($p < 0,05$). All strains of *C. difficile* were susceptible to metronidazole and vancomycin, ensuring high efficiency of causal treatment of patients with antibiotic-associated diarrhea.

Conclusion. The high information content of bacteriological and immunoassay (identifying toxins A and B) diagnostic techniques *Clostridium difficile* - associated diarrhea, but the second method, which gives the earlier results. The most severe clinical disease was observed in production *C. difficile* toxins A and B, and the least severe - in the case of a product only toxin B.

Key words: diarrhea, antibiotics, toxins, bacteria, diagnostics.

Введение.

Одной из актуальных проблем клинической медицины является развитие у пациентов на фоне применения антимикробных препаратов антибиотикоассоциированных диарей (ААД), часто вызываемых *Clostridium difficile*. По данным разных авторов, частота развития ААД у госпитализированных пациентов в зависимости от их профиля, класса используемых препаратов и действия predisposing факторов может варьировать от 3 до 29% [24]. Причем ААД могут протекать в различных формах – от нетяжелой самокупирующейся диареи до псевдомембранозного и фульминантного колита.

Широкое применение антибактериальных препаратов в стационарах различного профиля придает данной проблеме общеклиническое значение. Как показывают многочисленные клинические наблюдения, не только спорадические, но и групповые случаи ААД регистрируются в хирургических, урологических, терапевтических и других стационарах [14].

Целесообразность определения токсинов *C. difficile* в кале пациентов с ААД с помощью иммуноферментного анализа обусловлена неоспоримыми преимуществами ИФА по сравнению с другими методами лабораторной диагностики – простота использования, высокая скорость получения результатов (в течение 2-3 часов) и специфичность (достигает 100%), относительно невысокая стоимость и отсутствие необходимости работать с культурами клеток [15]. Всё это в совокупности позволяет в кратчайшие сроки лабораторно подтвердить диагноз и своевременно начать антимикробную химиотерапию, что крайне важно при данном заболевании в связи с быстрым прогрессированием и высоким уровнем летальности при несвоевременном распознавании диареи [17].

Об ААД, обусловленной *C. difficile*, следует думать во всех случаях, когда диарейный синдром развился у пациентов, получавших антибактериальную терапию в течение предшествующего месяца, либо если диарея появилась спустя 72 часа после госпитализации. Хотя имеются наблюдения, когда клинически манифестные формы инфекции *C. difficile* регистрировались даже через 2 и более месяцев после прекращения приема антибиотиков [5].

Диагностика *C. difficile*-ассоциированных болезней основана на комплексной оценке анамнестических, клинических, лабораторных и эндоскопических данных. Используемые на практике некоторые общеклинические и инструментальные методы исследования имеют ограниченное значение в диагностике этой инфекции. Типичными изменениями в крови являются лейкоцитоз с нейтрофильным сдвигом лейкоформулы влево, ускоренная СОЭ, иногда гипохромная анемия и гипопротейнемия [3].

Рентгенологические признаки, выявляемые при *C. difficile*-ассоциированном колите, как правило, неспецифичны. На обзорной рентгенограмме органов брюшной полости может обнаруживаться отечная толстая кишка с участками утолщения кишечной стенки и нарушенной гаустрацией. При ирригографии могут обнаруживаться округлые «дефекты наполнения», соответствующие расположению псевдомембран. У части (30-35%) пациентов с клинически манифестными формами доказанной инфекции *C. difficile* выявляются рентгенологические признаки тонко и толстокишечной непроходимости [5].

Компьютерная томография и УЗИ позволяют обнаружить утолщение кишечной стенки, сужение просвета кишки, выпот в брюшной полости [16, 21]. При эндоскопическом исследовании (фиброколоноскопия) выявляются диффузная гиперемия и отечность слизистой кишечника с утолщением стенки кишки, на слизистой обнаруживаются характерные фибриновые бляшки желтовато-белого цвета диаметром 2-20 мм и более, покрывающие язвы слизистой кишечника. Бляшки, сливаясь, образуют псевдомембраны, располагающиеся преимущественно в левой половине толстой кишки [13, 20].

Однако ведущую роль в установлении и подтверждении диагноза инфекции *C. difficile* играют специфические лабораторные методы исследования по обнаружению возбудителя и его токсинов.

Ещё 10 лет назад ежегодно в России регистрировались 2-3 случая диарей в год, связанных с применением антибиотиков, а диагноз у таких больных устанавливался, как правило, на аутопсии. Сейчас, в связи с возрастающим применением антибиотиков и улучшением диагностической практики, это заболевание регистрируется повсеместно, в том числе во многих стационарах г. Оренбурга и Оренбургской области [10, 11].

ААД, занимая одно из ведущих мест в структуре заболеваемости и летальности среди инфекционных диарей, представляют серьёзную проблему ан-

тимикробной терапии в условиях стационара. В большинстве стационаров не проводится диагностика и регистрация случаев данного заболевания. Связано это, в первую очередь, с отсутствием соответствующей лабораторной базы, что не позволяет проводить микробиологическую диагностику болезни. Н. Vanproucke et al. [23] считают особо ценным в диагностике инфекции *C. difficile* использование иммуноферментного анализа (ИФА).

Целью нашей работы явилась оценка эффективности иммуноферментного анализа (ИФА) для диагностики антибиотикоассоциированных диарей.

Материалы и методы.

Обследовано 18 пациентов (11 мужчин и 7 женщин, средний возраст $49 \pm 1,3$ лет), находившихся на стационарном лечении в хирургическом отделении ГБУЗ ГKB №1 в 2011-2012 гг., у которых после парентерального введения антибиотиков развился диарейный синдром. У всех больных отмечались: общая слабость, болевой синдром (спастические боли в животе), водянистая или кровавая диарея, лихорадка, лейкоцитоз до $30,7 \times 10^9$ кл/л с нейтрофильным сдвигом лейкоформулы влево, гипопроотеинемия.

Всем больным после отмены «причинных» антибиотиков проводилось лечение [1]: метронидазол по 0,5 г х 3 раза в сутки внутрь в течение 4-14 дней ($6,9 \pm 1,3$ сут.); ванкомицин по 0,125 г х 4 раза в сутки внутрь в течение 10 дней. Четырем пациентам, состояние которых расценивалось как тяжелое, дополнительно применяли дексаметазон по 0,004 г на 100,0 мл физиологического раствора ректально капельно 3 раза в день в течение периода этиотропной терапии, трое из них дополнительно получали преднизолон по 60 мг в сутки внутрь [11, 12]. По показаниям больным проводилась спазмолитическая и/или дезинтоксикационная терапия, включающая инфузии коллоидов и кристаллоидов, [7].

Эффективность лечения оценивалась по следующим критериям: уровень летальности, сроки исчезновения синдрома системного воспалительного ответа, нормализации стула и стихания болевого абдоминального синдрома.

До начала лечения проведено двойное диагностическое исследование, включившее стандартное бактериологическое исследование фекальных масс, а также выявление токсинов А и В *C. difficile*. Материалом для исследования являлись фекальные пробы, полученные от госпитализированных пациентов с клиникой диареи, возникшей на фоне приема антибиотиков или после их отмены. Выделение *C. difficile* из первичного материала проводили общепринятым

бактериологическим методом с использованием как селективных, так и селективно-дифференциально-диагностических сред [8]. Идентификация выделенных штаммов микроорганизмов проводилась общепринятыми методами на основании морфологических, тинкториальных, культуральных свойств и биохимического профиля [4], который оценивался с помощью коммерческих тест-систем фирмы «BioMerieux» (Франция). Антибиотикочувствительность к гентамицину, метронидазолу, ванкомицину и цефтриаксону методом серийных разведений в агаре [6, 21].

Параллельно методом иммуноферментного анализа производилась детекция токсинов А и В *C. difficile* [9].

При статистическом сравнении полученных результатов использовали U-критерий Манна-Уитни и критерий знаков [2]. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение.

Бактериологическое обследование позволило выявить *C. difficile* в фекалиях у 16 пациентов, в то время как определение токсинов возбудителя ПМК показало положительный результат в 17 пробах ($Z=0$, $p > 0,95$), что свидетельствует о сопоставимой эффективности обоих методов. Длительность проведения традиционного бактериологического исследования минимально составила 5 суток, определение ИФА токсинов *C. difficile* – не более 5 часов.

При оценке антибиотикочувствительности выделенных штаммов *C. difficile* был установлен высокий уровень резистентности к гентамицину у 10 (55,6%) культур и цефтриаксону у 13 (72,2%) изолятов. Все изученные штаммы *C. difficile* проявляли чувствительность к метронидазолу и ванкомицину, что позволяет рекомендовать оба эти препарата для лечения больных с ААД [19].

Проводимая эмпирическая терапия с использованием метронидазола показала достаточно высокую эффективность, что выражалось, прежде всего, в отсутствии летальных исходов и выздоровлении всех больных. Однако динамика клинической картины диарейного синдрома различалась по ряду показателей в зависимости от типа продуцируемого *C. difficile* токсина (табл.). Так, при продукции возбудителем только токсина В (цитотоксина) наблюдалось более раннее исчезновение признаков синдрома системного воспалительного ответа и нормализация стула ($p < 0,05$). Это, по-видимому, связано с тем, что действие некротоксина не может реализоваться в полной мере при интактной сли-

зистой оболочке кишечника, хотя на культурах клеток действие токсина В в 100-1000 раз превосходит эффект токсина А [3, 18]. В тех случаях, когда *C. difficile* продуцировал оба типа токсинов, клиническая картина характеризовалась наиболее длительным сохранением признаков системного воспалительного ответа и наиболее выраженной клиникой.

Таблица. Особенности клинического течения антибиотикассоциированной диареи в зависимости от продукции токсинов *C. difficile*

Тип продукции токсинов <i>C. difficile</i>	Клинические критерии			
	Летальность (%)	Сроки исчезновения ССВО (сут., $M \pm m$)	Сроки нормализации стула ($M \pm m$)	Сроки стихания болевого синдрома ($M \pm m$)
Продукция токсина А, n=7	0	1,8±0,2	2,7±0,2	2,1±0,2
Продукция токсина В, n=4	0	1,2±0,3*	1,1±0,3*	0,9±0,3
Продукция Токсинов А и В, n=6	0	2,9±0,3*	2,8±0,3	2,5±0,3

Примечание: * - $p < 0,05$ при сравнении со значениями первого ряда (продукция токсина А).

Выводы.

1. Установлена высокая информативность бактериологической и иммуноферментной (с определением токсинов А и В) методик диагностики *Clostridium difficile*-ассоциированных диарей, однако второй способ позволял получать более ранние результаты.

2. Все изоляты *C. difficile* были чувствительны к метронидазолу и ванкомицину, что обеспечивало высокую эффективность этиотропной терапии больных антибиотикассоциированными диареями.

3. Наиболее выраженная клиника заболевания отмечалась при продукции *C. difficile* токсинов А и В, а наименее тяжелая – в случаях в продукции только токсина В.

(Работа выполнена при поддержке Гранта Правительства Оренбургской области в сфере научной и научно-технической деятельности № 14-г, 2012.)

Литература.

1. Дёмин А.А., Руднов В.А. Колит, ассоциированный с *Clostridium difficile*, после операций по поводу рака толстой кишки. Инфекции в хирургии. 2007. Т.5, №2: 29-33.
2. Ланг Т.А., Сесик М. Как описывать статистику в медицине. Руководство для авторов, редакторов и рецензентов: Пер с англ.. М.: Практическая медицина, 2011. 480 с.
3. Лобзин Ю.В., Захаренко С.М., Иванов Г.А. Современные представления об инфекции, вызванной *Clostridium difficile*. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2002. Т.4, №3: 200-232.
4. Малов В.А. Антибиотикоассоциированные диареи. Клин. микробиол. и антимикроб. химиот. 2002. Т.4, №1: 22-32.
5. Малов В.А., Пак С.Г., Беликов Д.В. Псевдомембранозный колит. Лечащий врач. 1999. №2-3: 4-10.
6. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2. 1890-04). Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2004. Том 6, №4: 306-359.
7. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б.Белоусовой, С.Н. Козлова. НИИАХ СГМА, 2007. 464 с.
8. Приказ МЗ РФ № 231 «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника», Москва, 09.06.2003 г.
9. Скала Л.З., Сидоренко С.В., Нехорошева А.Г., Лукин И.Н., Грудина С.А. Практические аспекты современной клинической микробиологии. Тверь: «Триада», 2004. 312 с.
10. Тарасенко В. С. Антибиотикоассоциированные диареи. Псевдомембранозный колит. Хирург. 2010. № 11: 62-74.
11. Фадеев С.Б. Антибиотикассоциированная диарея у хирургических больных: клинические случаи. Мат. межд. конф. «Новые технологии в военно-полевой хирургии и хирургии повреждений мирного времени», СПб, 2006: 230-231.
12. Шевяков М.А. Антибиотикоассоциированная диарея и кандидоз кишечника: возможности лечения и профилактики. Антибиотики и химиотерапия. 2004. Т.49, № 10: 26-29.
13. Шульпекова Ю.О. Антибиотикоассоциированная диарея. Русский медицинский журнал. 2007. Т.15, №6: 467-473.
14. Bartlett J.G., Perl T.M. The new *Clostridium difficile* – what does it mean? N. Engl. J. Med. 2005. Vol.353: 2503-2505.
15. Boyce, J. M., N. L. Havill, J. A. Otter, et al. Impact of hydrogen peroxide vapor room decontamination on *Clostridium difficile* environmental contamination and transmission in a healthcare setting. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2008. Vol. 29:723-739.
16. Downey D.B., Wilson S.R. Pseudomembranous colitis: sonographic features. Radiology. 1991. Vol. 180: 61.
17. Fekety R., Kim K.M., Brown D. et al. Epidemiology of antibiotic associated colitis. Isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. Am. J. Med. 1981. Vol.70: 906-908.
18. George W.L., Rolfe R.D., Finegold S.M. *Clostridium difficile* and its cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated diarrhea and miscellaneous conditions. J. Clin. Microbiol. 1982. Vol.15: 1049-1053.
19. Hecht, D. W., M. A. Galang, S. P. Sambol et al. In vitro activities of 15 antimicrobial agents against 110 toxigenic *Clostridium difficile* clinical isolates collected from 1983 to 2004. Antimicrob. Agents Chemother. 2007. 51:2716-2719.
20. Hogenauer C., Hammer H.F., Krejs G.J. et al. Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea. Clin. Infect. Dis. 1998. Vol. 27(4): 702-710.
21. Kelly, C.P. Associated Diarrhea: Review of *C. difficile* Infection. A 76-Year-Old Man With Recurrent *Clostridium difficile*. JAMA. 2009. Vol. 301(9): 954-962.
22. Pepin J., Valiquette L., Alary M.E. Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. Clin. Infect. Dis. 2005. Vol. 40: 1591-1597.

23. Vanpoucke H., De Baere T., Claeys G. et al. Evalution of six commercial assays for the rapid detection of Clostridium difficile toxin and/ or antigen in stool specimens. Clin. Microbiol. Infect. 2001. Vol. 7: P.55-64.

24. Wistrom J., Norrby S.R., Myhre E.B. et al. Frequency of antibiotic-associated diarrhea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. J. Antimicrob. Chemother. 2001. Vol. 47: 43-50.

Поступила 29.03.2013

(Контактная информация: Шиповской Александр Вячеславович - клинический ординатор кафедры госпитальной хирургии, урологии Оренбургской государственной медицинской академии; 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6; тел. 8 (3532) 35-88-90, e-mail: alexandr_doc@mail.ru)